

# THÈSE

Pour obtenir le grade de  
**Docteur**

Délivré par l'**Université de Montpellier II**

Préparée au sein de l'école doctorale SPSA  
Et de l'unité de recherche Laboratoire de Biotechnologie  
de l'Environnement (INRA)

Spécialité : **Génie des Procédés**

Présentée par **Mélanie PIERRA**

**Couplage de la fermentation sombre et de  
l'électrolyse microbienne pour la  
production d'hydrogène :**  
**Formation et maintenance du biofilm  
électro-actif**

Soutenue le 6 Décembre 2013 devant le jury composé de :

<b>Mme Elisabeth LOJOU</b> , BIP – CNRS, Marseille	Rapporteur
<b>M. Pierre FONTANILLE</b> , Polytech' Clermont-Ferrand	Rapporteur
<b>M. Charles GHOMMIDH</b> , Polytech' Montpellier	Examineur
<b>M. Benjamin ERABLE</b> , LGC – CNRS, Toulouse	Examineur
<b>Mme Laurence PREZIOSI-BELLOY</b> , Polytech' Montpellier	Invitée
<b>M. Eric TRABLY</b> , LBE – INRA, Narbonne	Examineur
<b>M. Nicolas BERNET</b> , LBE – INRA, Narbonne	Directeur de thèse



---

## RESUME ETENDU

---

De nos jours, des solutions alternatives et durables sont proposées à l'usage d'énergies fossiles. L'hydrogène, qui constitue un vecteur énergétique d'avenir, est produit essentiellement par reformage de combustibles fossiles (95%). Des filières de production plus soucieuses de l'environnement doivent donc être envisagées. Deux familles de technologies sont explorées pour produire de l'hydrogène : 1) par décomposition thermochimique ou électrochimique de l'eau et 2) à partir de différentes sources de biomasse. Parmi celles-ci, les cellules d'électrolyse microbienne ou «Microbial Electrolysis Cell (MEC)» permettent de produire de l'hydrogène par électrolyse de la matière organique. Une MEC consiste en une cathode classique qui assure la production d'hydrogène par la réduction électrochimique de l'eau, associée à une bioanode qui oxyde des substrats organiques en dioxyde de carbone. Ce processus d'oxydation n'est possible que grâce au développement sur l'anode d'un biofilm microbien électroactif qui joue le rôle d'électro-catalyseur. Par rapport aux procédés courants d'électrolyse de l'eau, une MEC fonctionne sous des tensions 5 à 10 fois plus faibles, divisant d'autant le coût en énergie de l'hydrogène produit. En outre, les procédés « classiques » de production de biohydrogène par voie fermentaire en cultures mixtes convertissent des sucres (saccharose, glucose) avec des rendements limités à 2-3 moles d'hydrogène par mole d'hexose tout en coproduisant des acides organiques (acide acétique ou butyrique principalement). Alimenté par de l'acétate, une MEC produit au maximum 3 moles d'hydrogène /mole d'acétate. Le couplage de la fermentation à un procédé d'électrolyse microbienne pourrait donc produire de 8 à 9 moles d'hydrogène/mole d'hexose, soit un grand pas vers la limite théorique de 12 moles d'hydrogène/mole d'hexose.

L'objectif de cette thèse est d'analyser les liens entre la structure des communautés microbiennes dans les biofilms électroactifs et en fermentation, les individus qui les composent et les fonctions macroscopiques (propriétés électroactives du biofilm, potentiel de production d'hydrogène) qui leur sont associées dans des conditions permettant de réaliser le couplage des deux procédés. L'originalité de cette étude a été de travailler en milieu salin (30-35 g<sub>NaCl</sub>/L), favorable au transport de charges dans l'électrolyte de la MEC.

Dans un premier temps, la faisabilité de la fermentation en conditions salines (3-75 g<sub>NaCl</sub>/L) a été démontrée en lien avec l'inhibition de la consommation de l'hydrogène produit et une forte prédominance d'une nouvelle souche de *Vibrionaceae* à des concentrations en sel supérieures à 58 g<sub>NaCl</sub>/L. D'autre part, la mise en œuvre de biofilms électroactifs dans des conditions compatibles avec la fermentation sombre (pH 5.5 à 7 et alimenté avec différents acides organiques) a permis la sélection d'espèces microbiennes dominantes dans les biofilms anodiques et présentant des propriétés électroactives très prometteuses (*Gealkalibacter subterraneus* et *Desulfuromonas acetoxidans*) avec des densités de courant pouvant atteindre jusqu'à 8,5 A/m<sup>2</sup>. En parallèle, la sélection microbienne opérée lors d'une méthode d'enrichissement utilisée pour sélectionner ces espèces à partir d'une source d'inoculum naturelle sur leur capacité à transférer leurs électrons à des oxydes de Fer(III) a été étudiée. Une baisse des performances électroactives du biofilm liée à une divergence de sélection microbienne dans ces deux techniques de sélection mène à limiter le nombre de cycle d'enrichissement sur Fer(III). Cependant, l'enrichissement sur Fer(III) reste une alternative efficace de pré-sélection d'espèces électroactives qui permet une augmentation de rendement faradique de 30±4% à 99±8% par rapport au biofilm obtenu avec un inoculum non pré-acclimaté. Enfin, l'ajout d'espèces exogènes issues de la fermentation sombre sur le biofilm électroactif a révélé une baisse de l'électroactivité du biofilm se traduisant par une diminution de la densité de courant maximale produite. Cette baisse pourrait s'expliquer par une diminution de la vitesse de transfert du substrat due à un épaissement apparent du biofilm. Cependant, un maintien de sa composition microbienne et de la quantité de biomasse laisse supposer une production d'exopolymères (EPS) dans le biofilm en situation de couplage.

---

### Mots clés :

Biohydrogène, fermentation, électrolyse microbienne, biofilms électroactifs, bio-électrochimie, cultures mixtes, empreinte moléculaire, CE-SSCP



---

## EXTENDED ABSTRACT

---

Nowadays, alternative and sustainable solutions are proposed to avoid the use of fossil fuel. Hydrogen, which constitutes a promising energy vector, is essentially produced by fossil fuel reforming (95%). Environmentally friendly production systems have to be studied. Two main families of technologies are explored to produce hydrogen: 1) by thermochemical and electrochemical decomposition of water and 2) from different biomass sources. Among those last ones, microbial electrolysis cells (MEC) allow to produce hydrogen by electrolysis of organic matter. A MEC consists in a classical cathode, which provides hydrogen production by electrochemical reduction of water, associated to a bio-anode that oxidizes organic substrates into carbon dioxide. This process is only possible because of the anodic development of an electroactive microbial biofilm which constitutes an electrocatalyst. In comparison to classical water electrolysis process, a MEC requires 5 to 10 times less electrical energy and therefore reduces the energetic cost of produced hydrogen. Furthermore, classical process of dark fermentation in mixed cultures converts sugars (saccharose, glucose) to hydrogen with a limited yield of 2-3 moles of hydrogen per mole of hexose because of the coproduction of organic acids (mainly acetic and butyric acids). Fed with acetate, a MEC can produce up-to 3 moles of hydrogen per mole of acetate. Therefore, the association of these two processes could permit to produce 8 to 9 moles of hydrogen per mole of hexose, which represents a major step toward the theoretical limit of 12 moles of hydrogen per mole of hexose.

Therefore, this work aims at analyzing the relationship between microbial community structures and compositions and the associated macroscopic functions (biofilm electroactive properties, hydrogen production potential) in electroactive biofilms and in dark fermentation in conditions allowing the coupling of the two processes. The originality of this study is to work in saline conditions (30-35 g<sub>NaCl</sub>/L), which favors the charges transfer in the MEC electrolyte.

First of all, feasibility of dark fermentation in saline conditions (3-75 g<sub>NaCl</sub>/L) has been shown. This was linked to an inhibition of produced hydrogen consumption and the predominance of a new *Vibrionaceae* species at salt concentrations higher than 58 g<sub>NaCl</sub>/L. Secondly, electroactive biofilm growth in conditions compatibles to dark fermentation (pH 5.5-7 and fed with different organic acids) allowed to select dominant microbial species in anodic biofilms that present promising electroactive properties (*Gealkalibacter subterraneus* and *Desulfuromonas acetoxidans*) with maximum current densities up to 8.5 A/m<sup>2</sup>. In parallel, the microbial selection occurring during iron-reducing enrichment method used to select species from a natural inoculum source and based on their capacity to transfer electrons to iron oxides (Fe(III)) has been studied. A decrease of electroactive performances of the biofilm linked to the divergence of microbial selection led to a limitation of the number of iron-enrichment steps. However, enrichment on Fe(III) presents an efficient alternative to pre-select electroactive species with an increase of coulombic efficiency from 30±4% to 99±8% in comparison with a biofilm obtained with a non-acclimated inoculum. Finally, the addition of exogenous bacteria from a dark fermenter on the electroactive biofilm revealed a decrease of electroactivity with a decrease of maximum current density produced. This diminution could be explained by a lower substrate transfer due to an apparent thickening of the biofilm. Nevertheless, the stability of microbial composition and of bacterial quantity on the anode suggests that a production of exopolymers (EPS) occurred.

---

### Key words:

Biohydrogen, dark fermentation, microbial electrolysis, electroactive biofilms, bio-electrochemistry, mixed cultures, fingerprinting, CE-SSCP



*A Jean-Christophe Fernandes*



*« Liés à nos frères par un but commun et qui se situe en dehors de nous, alors seulement nous respirons et l'expérience nous montre qu'aimer ce n'est pas nous regarder l'un l'autre mais regarder ensemble dans la même direction. Pourquoi nous haïr ? Nous sommes emportés par la même planète, équipage d'un même navire. Et s'il est bon que des civilisations s'opposent pour favoriser des synthèses nouvelles, il est monstrueux qu'elles s'entre-dévorent. »*

*Terre des hommes d' Antoine de Saint-Exupéry*



---

## REMERCIEMENTS

---



Au terme de ces trois années de recherche, je souhaite adresser mes remerciements à tous celles et ceux qui ont participé, de près ou de loin, à cette aventure. Bien que ce travail soit un marathon solitaire, je suis convaincue qu'il n'aurait pu être réalisé sans le soutien de bon nombre de personnes dont la générosité, l'enthousiasme et l'intérêt témoignés à l'égard de ma recherche m'ont permis de cheminer jusqu'à l'achèvement de ce travail.

Tout d'abord mes sincères remerciements à mon directeur de thèse Nicolas Bernet, ainsi qu'à mon encadrant Eric Trably pour la confiance qu'ils m'ont accordée. Merci de m'avoir donnée cette opportunité de travailler dans ce beau projet et de participer à ce nouveau challenge de travailler avec des biofilms électroactifs au sein du labo.

Je tiens à remercier aussi les membres de mon jury de thèse, Mme Elisabeth LOJOU (du BIP – CNRS, Marseille), M. Pierre FONTANILLE (de Polytech' Clermont-Ferrand), M. Charles GHOMMIDH (de Polytech' Montpellier), M. Benjamin ERABLE (du LGC – CNRS, Toulouse), Mme Laurence PREZIOSI-BELLOY (de Polytech' Montpellier) pour leur investissement dans l'évaluation de ce travail.

Merci à Jean Jacques Godon pour sa participation dans ma thèse et son aide.

Merci à Jean-Philippe Steyer, Directeur du Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement de l'INRA de Narbonne (LBE), de m'avoir donné l'opportunité de poursuivre ma thèse au sein du laboratoire. Merci aussi à tout le LBE pour son accueil.

Je remercie l'ensemble des partenaires du projet Défi H12 et l'Agence Nationale de Recherche, financeur de ce projet.

Je remercie aussi mes professeurs de l'ENSIL (Ecole Nationale Supérieure de Limoges) en particulier Magali Casellas, Christophe Dagot, Geneviève Feuillade, Guy Matechka et également Julien Laurent.

Merci à Celine Cosseau qui m'a permis de faire des enseignements à l'IUT de Narbonne et qui partage volontier son intérêt pour la transmission du savoir.

Au sein du Labo je tiens à remercier tout particulièrement Anais Bonnafous, Pascal Gras et Philippe Sousbie pour leur aide technique. Merci également à Nadine Delgenès pour sa bienveillance et son soutien.

Je remercie Caro, ma voisine au grand cœur, toujours présente quand on a besoin d'aide ou juste pour passer un bon moment, Virginie, ma coach perso, qui n'a pas cessé de me soutenir, même depuis le Mexique ! Florence pour son amitié et ses conseils avisés et Valentin pour son enthousiasme et sa joie de vivre si communicatifs. Merci Flo et Val pour votre maison toujours ouverte et chaleureuse. Je remercie Xin Mei, pour sa bonne humeur et son positivisme, Micol, pour son soutien, Yan le fou chantant du labo, Amel, ma voisine mamie Guendouz chouilla comère. Benoit et ses « p'tits catanes », Guillaume K et ses soirées choucroute Fleischnaka, Emilie la biteroise, Florian, le petit prince ensilien qui m'a transmis ces petites astuces au labo, et Marie Laure pour ces derniers mois de marathon ensemble. Merci à Violette pour nos week end studieux et pour nos fous rires. Merci à Claire Dumas pour son soutien, Fred, le fou de sport qui vient dans le bureau au ravito quand il est « en hypo »... Merci aussi à Mathieu L. et Sophie, Maialen, Alexis, Alice,

Mathieu M, Bruno, Steph, Amandine, Antonella, Juliana, Rim, Julie, Cecilia, Enrica, Elsa, Elizabeth, Marianne, Juliette, Mathilde, Marie Lou, Lucille, Mohanna et les autres ...

Je tiens à remercier Caro (la grande), ma première stagiaire. Tu resteras toujours ma préférée...

Un grand merci à Alessandro pour son aide, sa patience et sa gentillesse. Merci d'avoir toujours pris le temps de m'aider quand j'en avais besoin et d'avoir partagé ton savoir-faire et ta passion pour les petites bêtes électroactive avec moi. J'en profite pour remercier Virginia, également une belle rencontre tout en sourire de la Rioja.

Je voudrai bien sûr remercier mes amis de plus longue date, mes colocs limougeauds, ma seconde famille pour leur présence et leur soutiens, et les bons moments passés ensemble. Merci Guigui, Louise, mon éternelle binôme et Romain. Merci Bruno pour ton soutien de chaque instant.

Merci à Claire mon herboriste attirée grâce à qui je ne suis presque pas tombée malade pendant ce marathon. Pour son soutien et nos fous rires. Ah... rien ne vaut les vieilles copines...

Je remercie bien sûr Amélie, la sœur que j'ai eu la chance de trouver. Merci pour ton soutien et tes encouragements sans aucune limite. Merci d'être toujours là. Et c'est sans oublier Alan, la force tranquille. Merci à tous les deux d'avoir été toujours présents pour moi.

Je remercie mon frère, Jérôme, pour ses encouragements. Merci aussi à Aurore pour son intérêt et sa présence. Enfin bien sûr, merci à mes parents, qui m'ont toujours soutenue dans ce que j'entreprends. Merci pour tout votre amour et la bienveillance dont vous m'entourez.

D'une manière générale je voudrai remercier ceux qui ont su partager mes victoires et mes joies et qui, également, m'ont soutenue pendant mes combats et les moments plus difficiles.

*« Ce n'est pas tant l'aide de nos amis qui nous aide que notre confiance dans cette aide. »*

*Epicure*

---

## LISTE DES ABREVIATIONS ET SYMBOLES

---



## Unités :

---

<b>A</b> : Ampère	<b>kV</b> : kilovolt	<b>mol</b> : mole
<b>A/m<sup>2</sup></b> : Ampère par mètre carré	<b>L</b> : litre	<b>mS/cm</b> : millisiemens par centimètre
<b>Å</b> : ångström	<b>Nm<sup>3</sup></b> : normaux mètre cube	<b>mV</b> : millivolt
<b>atm</b> : atmosphère	<b>M</b> : molaire	<b>ng</b> : nanogramme
<b>C</b> : Coulomb	<b>m</b> : mètre	<b>nm</b> : nanomètre
<b>°C</b> : Degré Celsius	<b>mA</b> : milliampère	<b>rpm</b> : rotation par minute
<b>g</b> : gramme	<b>mbar</b> : millibar	<b>s</b> : seconde
<b>h</b> : heure	<b>mg</b> : milligramme	<b>U</b> : unité
<b>J</b> : Joule	<b>min</b> : minute	<b>W</b> : Watt
<b>j</b> : jour	<b>mL</b> : millilitre	
<b>kg</b> : kilogramme	<b>mM</b> : milliMolaire	
	<b>mm</b> : millimètre	

## Abréviations :

---

### A

**Acétyl-CoA** : Acétyl-coenzyme A  
**ADN** : Acide désoxyribonucléique  
**ADNr** : ADN ribosomal  
**AEM** : Anion Exchange Membrane  
**AGV** : Acides Gras Volatils  
**ANR** : Agence National de la Recherche  
**ARB** : Anode Respiring Bacteria (bactéries électroactives)  
**ARN** : Acide ribonucléique  
**ATP** : Adénosine triphosphate

### B

**BES** : Bioelectrochemical system  
**BioH<sub>2</sub>** : Biohydrogène

### C

**CE** : Coulombic Efficiency (Rendement faradique)

**CE-SSCP** : Capillary Electrophoresis Single Strand Conformation Polymorphism

**CNTP** : Conditions Normales de Température et de Pression.

**CO<sub>2</sub>** : Dioxyde de Carbone

**CNRS** : Centre National de la Recherche Scientifique

**CPG** : Chromatographie en Phase Gazeuse

**CTC** : Cytochrome de Type C

### D

**DCO** : Demande Chimique en oxygène

**DGGE** : Denaturing Gradient Gel electrophoresis

**dNTP** : Désoxyribonucléotides triphosphate

**DMRB** : Dissimilatory Metal Reducing Bacteria

### E

**ECS** : Electrode au Calomel Saturé

**EPS** : Extracellular Polymeric Substance / polymère extra-cellulaire

**ESH** : Electrode Standard à Hydrogène

## F

**FID** : Flame Ionization Detector (détecteur à ionisation de flamme)

## G

**GC** : Gas Chromatography (Chromatographie en phase gazeuse)

## H

**H<sub>2</sub>** : Hydrogène / Dihydrogène

**HPLC** : High Performance Liquid Chromatography (chromatographie liquide haute performance)

## I

**INRA** : Institut National de la Recherche Agronomique

## M

**MEC** : Microbial Electrolysis Cell

**MES** : Matières en suspension

**MFC** : Microbial Fuel Cell (traduction de PACM en français)

**MS** : Matières sèches

**MV** : Matières volatiles

**MVS** : Matières volatiles en suspension

## N

**NADH** : Nicotinamide adénine dinucléotide

## P

**PACM** : Pile à combustible microbienne

**PCR** : Polymerase Chain Reaction (Réaction en chaîne par polymérase)

**PEMFC** : Proton Exchange Membrane fuel cells (Pile à combustible à membrane échangeuse d'ions)

**pH** : Potentiel Hydrogène

**PPi** : Pyrophosphate

**ppi** : (eau) pour préparations injectables

**PVPP** : Poly Vinyl Poly Pyrrolidone

## Q

**qPCR** : Quantitative Polymerase Chain Reaction (Réaction en chaîne par polymérase quantitative)

## R

**RNA** : Ribonucleic acid (acide ribonucléique)

## S

**SCE** : Saturated calomel electrode

**SSCP** : Single Strand Conformation Polymorphism

## T

**TCD** : Thermal Conductive Detector (détecteur de conductivité thermique)

**TGGE** : Temperature Gradient Gel Electrophoresis

**TTGE** : Temporal Temperature Gel Electrophoresis

## V

**VFA** : Volatile Fatty Acids

**VS** : Volatile Solid

---

## LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

---



## Publications soumises dans des journaux à comité de lecture ou en préparation :

---

**PIERRA M.**, BERNET N., GODON J-J., TRABLY E. Fermentative hydrogen production under moderate halophilic conditions, International Journal of Hydrogen Energy (2013), DOI: 10.1016/j.ijhydene.2013.08.035

CARMONA A., **PIERRA M.**, TRABLY E., BERNET N. High current density via direct electron transfer by the halophilic anode respiring bacterium *Geoalkalibacter subterraneus*. Physical Chemistry Chemical Physics. (2013) DOI: 10.1039/c3cp54045f

**PIERRA M.**, TRABLY E., CARMONA A., GODON J-J, BERNET N. Electrochemical growth of high current producing biofilms under saline conditions drives the efficient selection of *Geoalkalibacter subterraneus*. Soumis à Journal of Applied Microbiology

**PIERRA M.**, TRABLY E., GODON J-J, CARMONA A., BERNET N. Iron-enrichment strategy for selecting electroactive microorganisms: New insight in microbial community characterization. En préparation pour Bioresource Technology (soumission prévue en novembre 2013)

**PIERRA M.**, RIVALLAND C., TRABLY E., GODON J.J., BERNET N. Influence of dark fermentative biomass on electroactive biofilm fonction and composition. En préparation

## Communication orale (orateur):

---

### Conférences internationales:

**PIERRA M.**, TRABLY E., GODON J.J., BERNET N. Successful enrichment procedure for electroactive biofilm formation from environmental sample. MFC4 / 4th International Microbial Fuel Cell Conference, 1-4 Septembre, 2013 Cairns, Queensland, AUSTRALIE

CARMONA A., **PIERRA M.**, TRABLY E., BERNET N. Electrochemical and microscopic characterization of the novel anode-respiring bacterium *Geoalkalibacter subterraneus*. MFC4 / 4th International Microbial Fuel Cell Conference, 1-4 Septembre 2013, Cairns, Queensland, AUSTRALIE

PIERRA M., TRABLY E., GODON J.J., BERNET N. Successful enrichment procedure for enhancing electron transfer in electroactive biofilms. Biofilm 5. 10-12 Décembre 2012 Paris, FRANCE

**PIERRA M.**, TRABLY E., GODON J.J., BERNET N. Fermentative hydrogen production under moderate halophilic conditions. ICABHPA conference, 14-15 Décembre, Hyderabad, INDE.

## **Conférence nationale:**

**PIERRA M.**, TRABLY E., BONNAFOUS A., ABOUAKIL M., GODON J.J., BERNET N. Sélection et identification de bactéries électro-actives sur des anodes en graphite à potentiel contrôlé. 24-26 Janvier 2012 –Les Biofilms au service des Biotechnologies. Narbonne, FRANCE.

## **Posters (personne ayant présenté le poster):**

---

**PIERRA Mélanie**, TRABLY Eric, BONNAFOUS Anaïs, GODON Jean-Jacques, **BERNET Nicolas**. High selection and identification of electricigen bacteria from graphite anode biofilm under a controlled potential: *Geoalkalibacter subterraneus* as a new electricigen. European International Society for Microbial Electrochemical Technologies Meeting, 27-28 Septembre 2012, Ghent, BELGIQUE.

**PIERRA Mélanie**, TRABLY Eric, GODON Jean-Jacques, **BERNET Nicolas**. Enrichment method for selecting efficient electroactive biofilms. European International Society for Microbial Electrochemical Technologies Meeting, 27-28 Septembre 2012, Ghent, BELGIQUE.

**PIERRA Mélanie**, **TRABLY Eric**, GODON Jean-Jacques, BERNET Nicolas. Efficient hydrogen production by dark fermentation in saline environment. WHEC / World hydrogen Energy Conference, 3-7 juin 2012, Toronto, CANADA.

---

## TABLE DES MATIÈRES

---



---

<b>Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>Chapitre I. Synthèse bibliographique</b> .....	<b>9</b>
<b>I.1. L'hydrogène : un combustible d'avenir</b> .....	<b>11</b>
<i>I.1.1. L'hydrogène : un vecteur énergétique</i> .....	12
<i>I.1.2. Les utilisations de l'hydrogène</i> .....	12
<b>I.1.2.1. Utilisation en synthèse chimique</b> .....	12
<b>I.1.2.2. Utilisation comme carburant</b> .....	13
<i>I.1.2.2.1. Combustion dans un moteur</i> .....	13
<i>I.1.2.2.2. Pile à combustible</i> .....	14
<b>I.2. Les procédés de production d'hydrogène</b> .....	<b>15</b>
<i>I.2.1. Production d'hydrogène par décomposition électrochimique de l'eau</i> .....	17
<i>I.2.2. Voies biologiques de production d'hydrogène</i> .....	18
<b>I.2.2.1. Les Photo-bioprocédés</b> .....	18
<b>I.2.2.2. Fermentation</b> .....	18
<b>I.2.2.3. Electrolyse microbienne</b> .....	20
<b>I.3. Production de biohydrogène par voie fermentaire</b> .....	<b>21</b>
<i>I.3.1. Principe</i> .....	21
<i>I.3.2. Voies métaboliques de production d'hydrogène par fermentation</i> .....	21
<i>I.3.3. Voies de consommation</i> .....	24
<i>I.3.4. Voies concurrentes</i> .....	25
<i>I.3.5. Conditions opératoires</i> .....	28
<b>I.3.5.1. pH</b> .....	28
<b>I.3.5.2. Température</b> .....	29
<b>I.3.5.3. Pression partielle en hydrogène</b> .....	29
<b>I.3.5.4. Salinité</b> .....	31
<i>I.3.6. Microorganismes impliqués</i> .....	32
<b>I.3.6.1. Généralités en cultures mixtes</b> .....	32
<b>I.3.6.2. Clostridium sp.</b> .....	34
<b>I.3.6.3. Enterobacter sp.</b> .....	34

<b>1.3.6.4. Escherichia coli</b> .....	34
<b>I.4. Production de biohydrogène par électrolyse microbienne</b> .....	35
1.4.1. Principe.....	35
1.4.2. Biofilms.....	36
<b>1.4.2.1. Généralités sur les biofilms</b> .....	36
1.4.2.1.1. Formation des biofilms .....	37
1.4.2.1.2. Biofilms négatifs .....	39
1.4.2.1.3. Biofilms positifs.....	40
<b>1.4.2.2. Biofilms électroactifs</b> .....	42
1.4.2.2.1. Historique .....	42
1.4.2.2.2. Des bactéries qui génèrent de l'électricité .....	43
1.4.2.2.3. Biofilms électroactifs en cultures mixtes .....	45
1.4.2.2.4. Biofilms électroactifs en cultures pures.....	47
<b>1.4.2.3. Mécanismes de transfert d'électrons</b> .....	52
1.4.2.3.1. Transfert indirect par l'intermédiaire de médiateurs .....	53
1.4.2.3.2. Transfert direct .....	54
1.4.2.3.1. Respiration sur électrode.....	57
<b>1.4.2.4. Caractérisation thermodynamique et électrochimique des MEC</b> .....	58
1.4.2.4.1. Détermination thermodynamique de la tension à appliquer .....	58
1.4.2.4.2. Détermination électrochimique de la tension à appliquer .....	59
1.4.2.4.3. Calcul du rendement faradique du biofilm.....	61
<b>1.4.2.5. Conditions opératoires</b> .....	62
1.4.2.5.1. Nature du substrat.....	62
1.4.2.5.1. pH du compartiment anodique .....	66
1.4.2.5.2. Influence du potentiel à l'anode .....	67
1.4.2.5.3. Exposition à la lumière .....	68
<b>1.4.2.6. Influence des méthanogènes</b> .....	69
<b>I.5. Couplage de la production de biohydrogène par électrolyse microbienne et par voie fermentaire</b> .....	71
1.5.1. état de l'art.....	72
1.5.2. Impact du pH dans le cadre du couplage .....	75

1.5.3. Impact de la salinité sur l'activité électroactive du biofilm.....	76
1.5.4. Impact des espèces exogènes sur le biofilm.....	78
<b>Chapitre II. Matériel et Méthodes.....</b>	<b>79</b>
<b>II.1. Dispositifs expérimentaux .....</b>	<b>81</b>
<b>II.1.1. Production de biohydrogène en réacteur discontinu.....</b>	<b>81</b>
<b>II.1.1.1. Mise en œuvre.....</b>	<b>81</b>
<b>II.1.1.2. Analyse des données de production d'hydrogène.....</b>	<b>82</b>
<b>II.1.2. Electrolyse microbienne .....</b>	<b>84</b>
<b>II.1.2.1. Réacteurs électrochimiques .....</b>	<b>84</b>
<b>II.1.2.1.1. Cellule à trois électrodes.....</b>	<b>84</b>
<b>II.1.2.1.2. N-Stat : Réacteur à plusieurs électrodes de travail .....</b>	<b>84</b>
<b>II.1.2.2. Matériel électrochimique .....</b>	<b>86</b>
<b>II.1.2.2.1. Electrodes .....</b>	<b>86</b>
<b>II.1.2.2.2. Chrono-ampérométrie.....</b>	<b>87</b>
<b>II.2. Inocula et milieux.....</b>	<b>88</b>
<b>II.3. Analyses Physico-chimiques .....</b>	<b>89</b>
<b>II.3.1. Mesure de la concentration en acides gras volatils (AGV) par CPG.....</b>	<b>89</b>
<b>II.3.2. Mesure de la concentration des acides organiques par HPLC.....</b>	<b>89</b>
<b>II.3.3. Mesure de la concentration en biomasse .....</b>	<b>90</b>
<b>II.3.4. Mesure de la composition de biogaz.....</b>	<b>91</b>
<b>II.3.5. Mesure de la conductivité.....</b>	<b>91</b>
<b>II.4. Analyses microbiologiques .....</b>	<b>92</b>
<b>II.4.1. Extraction de l'ADN .....</b>	<b>92</b>
<b>II.4.2. Amplification de l'ADN par PCR.....</b>	<b>93</b>
<b>II.4.3. Quantification des communauté microbiennes par PCR quantitative.....</b>	<b>94</b>
<b>II.4.4. Caractérisation de la communauté microbienne par CE-SSCP .....</b>	<b>95</b>
<b>II.4.5. Pyroséquençage .....</b>	<b>98</b>
<b>Chapitre III. Fermentation en milieu salin .....</b>	<b>99</b>
<b>III.1. Etude de la production fermentaire d'hydrogène en milieu salé .....</b>	<b>101</b>

<b>III.1.1. Avant-propos</b> .....	101
<b>III.1.2. Production d'hydrogène par fermentation en conditions Salines à pH 8</b> ....	103
<b>III.1.2.1. Introduction</b> .....	104
<b>III.1.2.2. Materials and Methods</b> .....	107
III.1.2.2.1. Source of inoculum .....	107
III.1.2.2.2. Hydrogen production in batch tests .....	107
III.1.2.2.3. Chemical analyses.....	108
III.1.2.2.4. Data analysis .....	108
III.1.2.2.5. DNA extraction, PCR amplification and CE-SSCP fingerprinting.....	109
III.1.2.2.6. Statistical analyses of CE-SSCP fingerprints .....	110
<b>III.1.2.3. Results and Discussion</b> .....	111
III.1.2.3.1. Hydrogen production performances according to NaCl concentrations .....	111
III.1.2.3.2. Shift of microbial fermentative metabolism with NaCl concentration .....	113
III.1.2.3.3. Shift of the bacterial community composition towards the emergence of <i>Vibrio</i> subspecies as main hydrogen-producing bacteria in moderate halophilic environment .....	115
<b>III.1.2.4. Conclusion</b> .....	121
<b>III.1.3. Production d'hydrogène par fermentation en conditions Salines à pH 6</b> ....	122
<b>III.1.3.1. Mise en œuvre</b> .....	122
<b>III.1.3.2. Performances de production d'hydrogène en fonction de la salinité à pH 6</b> .....	122
<b>III.1.3.3. Impact de la salinité sur les voies métaboliques fermentaires liées à la production d'hydrogène à pH 6</b> .....	125
<b>III.1.3.4. Impact de la salinité sur les communautés microbiennes fermentaires à pH 6</b> .....	128
<b>III.1.3.5. Conclusion</b> .....	130
<b>III.1.4. Discussion de synthèse sur le Chapitre III</b> .....	131
<b>III.1.4.1. Production d'hydrogène</b> .....	131
<b>III.1.4.2. Sélection microbienne</b> .....	131
<b>III.1.5. Conclusion sur le Chapitre III</b> .....	132

---

<b>Chapitre IV. Etude du biofilm électroactif .....</b>	<b>133</b>
IV.1. Sélection et identification de microorganismes électro-actifs.....	135
IV.1.1. Avant-propos.....	135
IV.1.2. Croissance de biofilms électroactifs et production de courant élevées dans des conditions salines, sélection de <i>Geoalkalibacter subterraneus</i> .....	139
IV.1.2.1. Introduction .....	140
IV.1.2.2. Material and methods .....	142
IV.1.2.2.1. Origin of the Inoculum.....	142
IV.1.2.2.2. Experimental set-up: potentiostically controlled electrochemical reactors.....	142
IV.1.2.2.3. Chemical analyses .....	143
IV.1.2.2.4. DNA extraction, PCR amplification and CE-SSCP fingerprinting .....	143
IV.1.2.3. Results.....	145
IV.1.2.3.1. Phase 1: enrichment of electroactive biofilms under saline conditions .....	145
IV.1.2.3.2. Phase 2: enhancement of current density ( $j_{max}$ ) and Coulombic efficiency (CE) .....	146
IV.1.2.3.3. Structure and composition of anodic bacterial communities .....	147
IV.1.2.4. Discussion.....	149
IV.1.2.4.1. Role of electron donor: acetate alone or a mixture of acetate and butyrate .....	149
IV.1.2.4.2. Role of pH: neutral and acidic conditions.....	149
IV.1.2.4.3. Anodic bacterial community composition and distribution .....	150
IV.1.3. Discussion.....	154
IV.2. Enrichissement de micro-organismes réduisant le Fe(III) et impact sur le biofilm électroactif.....	157
IV.2.1. Avant-propos.....	157
IV.2.2. Enrichissement de bactéries réduisant le Fe(III) pour la sélection de microorganismes électroactifs : Caractérisation de la sélection microbienne. ....	160
IV.2.2.1. Introduction .....	162
IV.2.2.2. Materials and methods.....	164

IV.2.2.2.1. Inoculum.....	164
IV.2.2.2.2. Iron-reducing enrichment cultures.....	164
IV.2.2.2.3. Bioelectrochemical enrichment.....	165
IV.2.2.2.4. Chemical analyses.....	166
IV.2.2.2.5. Data analysis.....	167
IV.2.2.2.6. DNA extraction and PCR amplification.....	167
IV.2.2.2.7. CE-SSCP electrophoresis and statistical analyses.....	168
<b>IV.2.2.3. Results and discussion.....</b>	<b>169</b>
IV.2.2.3.1. Iron-reducing enrichment cultures.....	169
IV.2.2.3.2. Anode-reducing enrichments.....	172
<b>IV.2.2.4. Conclusion.....</b>	<b>178</b>
<b>IV.2.3. Discussion.....</b>	<b>179</b>
<b>IV.3. Dynamique de colonisation des électrodes.....</b>	<b>181</b>
<b>IV.3.1. Avant-propos.....</b>	<b>181</b>
<b>IV.3.2. Mise en œuvre.....</b>	<b>183</b>
<b>IV.3.3. Résultats et Discussion.....</b>	<b>184</b>
<b>IV.4. Conclusion sur le Chapitre IV.....</b>	<b>189</b>
<b>Chapitre V. Couplage Fermentation / Electrolyse microbienne : Influence des espèces exogènes sur le biofilm électroactif.....</b>	<b>191</b>
<b>V.1. Avant-propos.....</b>	<b>193</b>
<b>V.2. Couplage Fermentation / Electrolyse microbienne : Influence des espèces exogènes sur le biofilm électroactif.....</b>	<b>196</b>
<b>V.2.1. Introduction:.....</b>	<b>197</b>
<b>V.2.2. Materials and Methods:.....</b>	<b>200</b>
<b>V.2.2.1. Source of inoculum.....</b>	<b>200</b>
<b>V.2.2.2. Biomass collection from hydrogen-producing batch tests.....</b>	<b>200</b>
<b>V.2.2.3. Bio-Electrochemical Systems (BES).....</b>	<b>201</b>
V.2.2.3.1. Medium for BES operation.....	201
V.2.2.3.2. Bioelectrochemical arrangement set up.....	202
<b>V.2.2.4. Chemical analyses.....</b>	<b>203</b>

---

<b>V.2.2.6. Molecular analyses</b> .....	204
V.2.2.6.1. DNA extraction, PCR amplification and CE-SSCP fingerprinting .....	204
V.2.2.6.2. qPCR .....	205
<b>V.2.3. Results and Discussion:</b> .....	206
<b>V.2.3.1. Exogenous biomass from dark fermentation</b> .....	206
V.2.3.1.1. Hydrogen production in batch tests .....	206
V.2.3.1.2. Microbial community .....	207
<b>V.2.3.2. Effect of exogenous bacteria on anodic biofilm</b> .....	209
V.2.3.2.1. Effect on electron transfer.....	209
V.2.3.2.2. Impact of exogenous fermentative bacteria on biofilm communities .....	213
V.2.3.2.3. Bacterial Identification results .....	215
<b>V.2.4. Conclusion</b> .....	217
<b>V.3. Discussion et conclusion</b> .....	218
<b>Conclusions et perspectives</b> .....	<b>221</b>
<b>Références bibliographiques</b> .....	<b>229</b>
Annexe 1 .....	252
Annexe 2 .....	253



---

## LISTE DES FIGURES

---



Figure 1 : Représentation schématique du couplage de la fermentation avec l'électrolyse microbienne. -----	4
Figure 2 : Couplage de la fermentation et de l'électrolyse microbienne pour la production d'hydrogène. -----	6
Figure I-1 : Schéma de principe de la pile à combustible PEMFC (Proton Exchange Membrane Fuel Cell). (Association Française de l'hydrogène) -----	14
Figure I-2 : Schéma de principe d'une cellule d'électrolyse de l'eau (Millet, 2008). -----	17
Figure I-3 : Représentation schématique de la fermentation sombre en Batch. Cas de la fermentation du glucose par la voie acétate. -----	19
Figure I-4 : Schéma d'un électrolyseur microbien (MEC : "Microbial Electrolysis Cell") avec membrane échangeuse d'ions. Cas de l'oxydation de l'acétate à l'anode. -----	20
Figure I-5: Principales voies métaboliques impliquées de production ou concurrente à la production de biohydrogène par voie fermentaire (adapté de Latrille et al. (2011)) -----	22
Figure I-6: Voies métaboliques générales dans le mécanisme de production de biohydrogène par fermentation (adapté de Guo et al. (2010)) -----	27
Figure I-7 : Évolution de l'énergie libre standard de Gibbs (à pH 7 et 25°C) des réactions de conversion d'acides gras volatils en acétate avec production d'hydrogène ou de réactions de respiration inorganique, en fonction de la pression partielle en hydrogène du milieu (Latrille et al. 2011). -----	30
Figure I-8 : Schéma d'un électrolyseur microbien (MEC : "Microbial Electrolysis Cell") avec membrane échangeuse d'ions. Cas de l'oxydation de l'acétate à l'anode. -----	35
Figure I-9: Schéma des étapes successives de la formation d'un biofilm sur une surface -----	37
Figure I-10 : Trois concepts d'utilisation de biofilms électroactifs en système bioélectrochimique (BES) -----	41
Figure I-11 : Croissance exponentielle des densités de courant produites par des biofilms anodiques dans la littérature depuis 2000. -----	43
Figure I-12: Mécanisme le plus probable selon lequel les sulfures réagissent avec l'électrode pour former le soufre élémentaire $S_0$ et les micro-organismes oxydent le $S_0$ en sulfate en utilisant l'électrode comme accepteur d'électron. (Lovley, 2006b) -----	46
Figure I-13 : Mécanismes de transfert d'électrons aux électrodes. -----	53
Figure I-14 : Images SEM et STM des pili conducteurs produits par des microorganismes électroactifs. -----	56
Figure I-15 : Modèles de transferts extracellulaires d'électrons par <i>Geobacter</i> et <i>Shewanella</i> -----	57
Figure I-16 : Schéma des interactions syntrophiques se développant dans un biofilm anodique utilisant de l'éthanol ou de l'acide formique. -----	64
Figure I-17 : Schéma des interactions syntrophiques qui permettent l'hydrolyse de la cellulose et l'oxydation du glucose dans le compartiment anodique d'un système bioélectrochimique. (Kiely, Regan, et al., 2011) -----	66
Figure I-18 : Effet de l'alternance d'exposition à la lumière sur le transfert d'électron : -----	69
Figure I-19 : Représentation schématique du couplage de la fermentation avec l'électrolyse microbienne en ne considérant que la voie acétate en fermentation. -----	71

Figure I-20 : Représentation schématique du couplage de la fermentation avec l'électrolyse microbienne en ne considérant que la voie acétate en fermentation : Cas d'un procédé avec fermentation dans le compartiment anodique de la cellule d'électrolyse microbienne. -----	72
Figure I-21 : Impact de la concentration en NaCl sur le consortium anodique électroactif en termes de puissance maximale fournie par le biofilm ( $P_{max}$ ) et rendement faradique (CE) (Lefebvre et al., 2012). -----	77
Figure I-1 : Courbe de production d'hydrogène en Batch. -----	83
Figure I-2 : Mise en place des réacteurs en demi-cellule dans un bain marie maintenu à 37°C et agité par agitation magnétique à 250 rpm. -----	84
Figure I-3 : Dispositif N-Stat utilisé contenant 4 électrodes de travail en graphite, 1 électrode de référence au calomel saturé (ECS) et une contre électrode en platine (grille) -----	85
Figure I-4 : Branchement des électrodes dans un réacteur en configuration N-Stat dans un bain-marie. -----	85
Figure I-5 : Dispositif expérimental à 3 électrodes. -----	86
Figure I-6 : Sédiments issus des salins de Saint Martin (Gruissan, Aude) -----	88
Figure I-7 : Chromatographe GC Clarus 580 (Perkin Elmer) et son passeur automatique -----	89
Figure I-8 : Chromatographe liquide haute performance (HPLC) -----	90
Figure I-9 : Chromatographe Clarus 580 (Perkin Elmer) -----	91
Figure I-10 : spectromètre Infinite M 200 NanoQuant (Tecan) -----	93
Figure I-11 : à gauche : Mastercycler eppgradient S (Eppendorf) pour l'amplification de l'ADN par PCR, à droite : Bioanalyzer 2100 (Agilent) pour l'analyse des produits de PCR. -----	94
Figure I-12 : Principe de la CE-SSCP (Braun, 2012) -----	96
Figure I-13 : Séquenceur capillaire SSCP ABI Prism 3130 genetic analyser -----	97
Figure I-14 : Principe du pyroséquençage (Braun, 2012) -----	98
Figure III-1 : General pathways for hydrogen production. Bold arrows are represented for hydrogen production pathways, dotted arrows for hydrogen consumption pathways and dashed arrows for hydrogen production concurrent routes (adapted from Guo et al. (2010)). -----	105
Figure III-2 : Representation of H <sub>2</sub> production dynamics from a mixed culture cultivated with glucose as substrate in batch. -----	109
Figure III-3 : Hydrogen production parameters of the modified Gompertz model according to NaCl concentrations. -----	112
Figure III-4 : Metabolic end-product distribution (in mmoles) and maximal H <sub>2</sub> production (in mmoles) according to NaCl concentrations. The values correspond to the average of three replicates -----	114
Figure III-5 : CE-SSCP profiles based on 16S rRNA gene fragments retrieved from H <sub>2</sub> -producing mixed cultures supplemented with different NaCl concentration. -----	116
Figure III-6 : Principal Component Analysis (PCA) biplot of CE-SSCP profiles. For each salinity, triplicates were clustered with ovals. The first two principal components (Axis1 and Axis2) explained 69,6% of the genetic variation. Significant linear correlations between changes in genetic profiles and changes in environment parameters are indicated by arrows: lag phase ( $p < 0,001$ ), salinity ( $p < 0,001$ ) and H <sub>2</sub> max ( $p < 0,001$ ). -----	117

Figure III-7 : Phylogenetic distribution of bacterial orders found at the maximum hydrogen production time and for different NaCl concentrations. -----	120
Figure III-8 : Production maximale d'hydrogène à pH 6 en fonction de la salinité (paramètre déterminé à partir du modèle de Gompertz). -----	124
Figure III-9 : Vitesse de production maximale d'hydrogène à pH 6 en fonction de la salinité (paramètre déterminé à partir du modèle de Gompertz). -----	124
Figure III-10 : Temps de latence sur la production d'hydrogène à pH 6 en fonction de la salinité (paramètre déterminé à partir du modèle de Gompertz). -----	125
Figure III-11 : Métabolites produits (en mmoles) et production maximale d'hydrogène (en mmoles) en fonction de la salinité. -----	126
Figure III-12 : Ratio molaire butyrate/acétate au maximum de production d'hydrogène en fonction de la salinité à pH 6 -----	127
Figure III-13 : Profils SSCP (des gènes d'ARN 16S) en fonction de la concentration en chlorure de sodium. Les profils correspondent aux échantillons prélevés au maximum de production d'hydrogène. Les axes X et Y représentent respectivement la distance de migration de la séquence et l'intensité du pic. -----	128
Figure III-14 : Abondances relatives cumulées des groupes de phylotypes bactériens observés sur les profils SSCP : Ces abondances calculées à partir des profils CE-SSCP donnent une identification hypothétique des groupes microbiens retrouvés à partir d'assignations observées de manière récurrentes dans les travaux du LBE -----	129
Figure III-15 : Analyse en composant principale (ACP) des profils CE-SSCP. -----	130
Figure IV-1 : Representative chronoamperometric batch cycles of electrochemically derived biofilms B7( $\Delta$ ), B8( $\square$ ) & B9(o). -----	145
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). -----	148
Figure IV-3 : Principe du procédé de pré-sélection de bactéries électroactives par enrichissement de DMRB sur oxydes de Fe(III). -----	159
Figure IV-4 : Scheme of successive enrichments steps to grow electroactive biofilms. -----	166
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. -----	167
Figure IV-6 : Iron/anode enrichment parameters and relative abundance of main bacteria in microbial communities -----	170
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. -----	171
Figure IV-8 : Principal Component Analysis (PCA) biplot of CE-SSCP profiles. -----	175
Figure IV-9 : Chronoampérométries réalisées sur les biofilms B7, B8 et B9 en partie Partie IV.1 et B0 en partie IV.2. -----	181
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). -----	183

Figure IV-11 : Chronoampérométries réalisées sur les 4 électrodes Dynacol 1, 2, 3 et 4. -----	184
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). -----	185
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. -----	187
Figure V-1 : Paramètres spécifiques liés au procédé de fermentation et d'électrolyse microbienne dans le cadre du couplage. -----	194
Figure V-2 : N-Stat arrangement to grow electroactive biofilms. -----	203
Figure V-3 : Hydrogen production of biomass used as exogenous bacteria on biofilm at the maximum hydrogen production point. -----	206
Figure V-4 : CE-SSCP profiles of biomass based on 16S rRNA gene fragments retrieved from fermentation batches at pH 6, pH 7 and pH 8. -----	208
Figure V-5 : Chronoamperometry in the different systems: -----	212
Figure V-6 : CE-SSCP profiles of biomass based on 16S rRNA gene fragments retrieved from biofilms in the 4 different reactors: -----	214
Figure Annexe-7 : Production d'hydrogène en $mL_{H_2}/mol_{Glucose}$ en fonction du temps dans les essais à pH 8 pour les différentes salinités testées -----	252
Figure Annexe-8 : Production d'hydrogène en $mL_{H_2}/mol_{Glucose}$ en fonction du temps dans les essais à pH 6 pour les différentes salinités testées. -----	252
Figure Annexe-9 : Images des biofilms électroactifs lors de l'expérience réalisée sur la contamination d'espèces exogènes sur le biofilm. -----	253

---

## LISTE DES TABLEAUX

---



<i>Tableau I-1 : Modes de production d'hydrogène physico-chimiques et biologiques principaux : principe, avantages et inconvénients.(adapté de Rafrafi, 2010).....</i>	<i>16</i>
<i>Tableau I-2 : Synthèse bibliographique des études en cultures mixtes de biofilms électroactifs. ....</i>	<i>48</i>
<i>Tableau I-3 : Synthèse bibliographique des études en culture pure de bactéries identifiées dans des biofilms électroactifs. ....</i>	<i>50</i>
<i>Tableau I-4 : Calcul des potentiels aux électrodes de chaque demi-équation d'oxydation de l'acétate et de la réduction de proton en hydrogène respectivement à l'anode et à la cathode d'une cellule d'électrolyse microbienne.....</i>	<i>60</i>
<i>Tableau I-5 : Etudes portant sur le couplage de la fermentation et de l'électrolyse microbienne pour la production d'hydrogène. ....</i>	<i>73</i>
<i>Tableau II-1 : pH, nature et quantité du tampon (mM) et milieu utilisés lors des différentes expériences de fermentation.....</i>	<i>82</i>
<i>Tableau I-2 : Caractéristiques (MS, MV et conductivité) des inocula utilisés pour la préselection d'un inoculum.....</i>	<i>88</i>
<i>Tableau III-1: Taxonomic classification of bacterial taxonomic distribution (in %) according to the salt concentration, and obtained by pyrosequencing. ....</i>	<i>118</i>
<i>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. ....</i>	<i>136</i>
<i>Tableau IV-2 : Performance of electrochemically derived biofilms grown under saline conditions .....</i>	<i>146</i>
<i>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/m<sup>2</sup> et %.....</i>	<i>182</i>
<i>Tableau V-1: Coulombic efficiencies (%) and maximum current densities (A/m<sup>2</sup>) obtained from biofilms in the different reactors for each acetate-feeding cycle.....</i>	<i>213</i>
<i>Tableau V-2 : Taxonomic classification of bacterial taxonomic distribution (in %) according to biofilms retrieved from N-stat control reactor and from N-Stat contaminated reactors with fermentative biomass grown at pH 8. ....</i>	<i>216</i>



---

# INTRODUCTION

---



L'hydrogène, qui constitue un vecteur énergétique prometteur, est produit principalement par reformage de combustibles fossiles (95%). C'est pourquoi des filières de production plus soucieuses de l'environnement sont explorées pour produire de l'hydrogène : 1) soit par décomposition thermochimique ou électrochimique de l'eau et 2) soit à partir de différentes sources de biomasse (Hallenbeck and Benemann, 2002). La fermentation sombre de l'anglais « dark fermentation » (par opposition à la production d'hydrogène par photofermentation, qui sera désignée dans ce manuscrit par le terme plus usité en français de fermentation), est une méthode de production d'hydrogène à partir de biomasse (Guo et al., 2010). Plus récente, l'électrolyse microbienne, est une méthode bio-électrochimique de production d'hydrogène combinant l'électrolyse de l'eau et l'oxydation de la matière organique par un biofilm microbien qui sert de catalyseur au procédé (Liu et al., 2010).

Plus précisément, les procédés de production de bio-hydrogène par voie fermentaire en cultures mixtes convertissent des sucres (saccharose, glucose) avec des rendements limités à 2-3 moles d'hydrogène par mole d'hexose et la formation de co-produits de fermentation (acide acétique ou butyrique principalement) (Latrille et al., 2011). D'autre part, une cellule d'électrolyse microbienne ou « Microbial Electrolysis Cell (MEC) » consiste en une bioanode sur laquelle sont oxydés des substrats organiques, associée à une cathode qui utilise les électrons générés à l'anode pour produire de l'hydrogène par réduction électrochimique de l'eau. Le processus d'oxydation n'est possible que grâce au développement sur l'anode d'un biofilm microbien qui joue le rôle d'électro-catalyseur (Arends and Verstraete, 2012). Par rapport aux procédés classiques d'électrolyse de l'eau, une MEC fonctionne sous des tensions 5 à 10 fois plus faibles grâce à cette catalyse microbienne, divisant d'autant le coût en énergie électrique de l'hydrogène produit (Liu et al., 2010). Ainsi, alimentée par de l'acétate, une MEC produit jusqu'à 3 moles d'hydrogène par mole d'acétate. En couplant la fermentation à un procédé d'électrolyse microbienne des rendements de 8 à 9 moles d'hydrogène/mole d'hexose pourraient être atteints, soit un grand pas vers la limite théorique de 12 moles d'hydrogène/mole d'hexose. La stœchiométrie de cette conversion théorique due au couplage est schématisée en *Figure 1*.

Les organismes identifiés à partir de cultures mixtes dans les biofilms électroactifs des systèmes bio-électrochimiques (BES pour « BioElectrochemical Systems ») appartiennent à divers groupes microbiens (actinobactéries, firmicutes, acidobactéries, protéobactéries ( $\alpha$ ,

$\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ )) (Liu et al., 2010). Ces microorganismes sont appelés ARB pour « anode respiring bacteria » car ils présentent la faculté à utiliser une électrode comme accepteur final d'électrons pour la respiration. La recherche de nouveaux consortia électroactifs efficaces, tout comme l'optimisation des BES, représentent des enjeux majeurs dans le développement de ces procédés

L'objet de cette thèse est d'analyser les liens entre la structure des communautés microbiennes en MEC ou en fermentation, les individus qui les composent et les fonctions macroscopiques (propriétés électroactives du biofilm ou potentiel de production fermentaire d'hydrogène) qui leur sont associées dans des conditions permettant de réaliser le couplage des deux procédés.

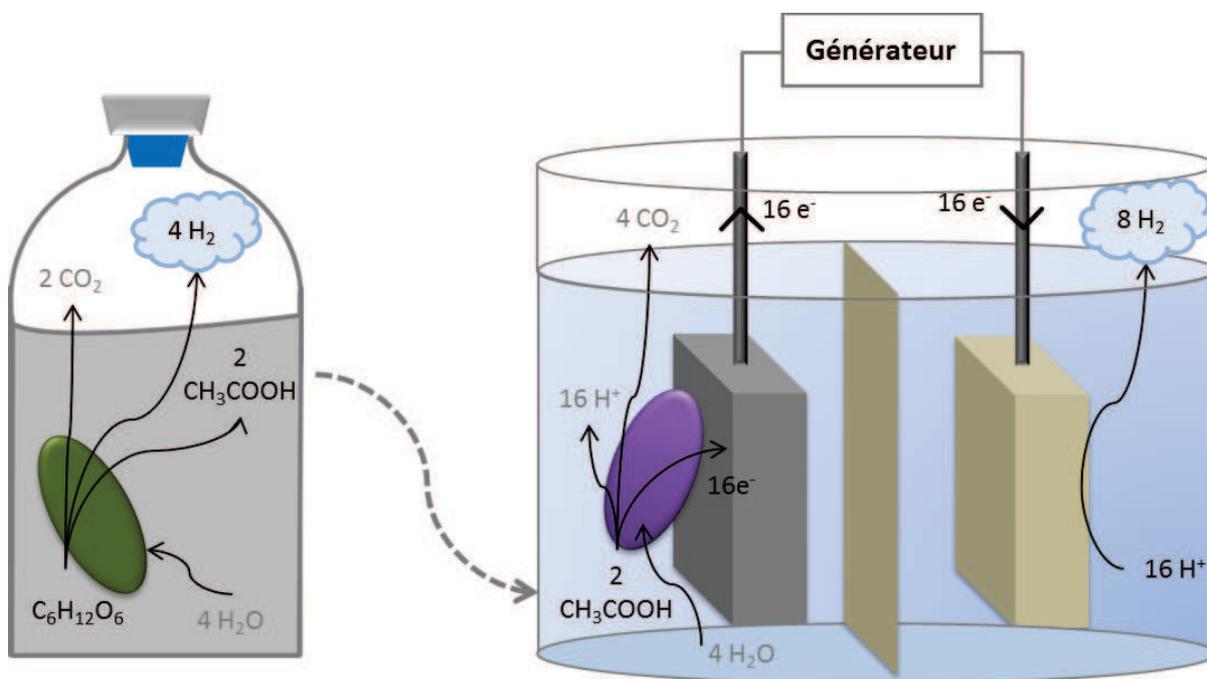


Figure 1 : Représentation schématique du couplage de la fermentation avec l'électrolyse microbienne.

Sur ce schéma, la conversion théorique maximale d'une molécule de glucose est présentée avec les conversions stœchiométriques maximales dans des deux procédés de fermentation (à gauche) et d'électrolyse microbienne en MEC (à droite). La fermentation est schématisée en ne considérant que la voie acétate. L'électrolyseur microbien est schématisé par une anode sur laquelle un biofilm microbien est symbolisé par une bactérie (à gauche) et une cathode (à droite) séparées par une membrane échangeuse d'ions. L'électrolyseur est alimenté par un générateur. La production d'hydrogène en fermentation (maximum  $4mol_{H_2}/mol_{glucose}$  avec  $2mol_{acétate}/mol_{glucose}$  par la voie acétate de production d'hydrogène) et en MEC (maximum  $4mol_{H_2}/mol_{acétate}$ ) permettrait de se rapprocher de la conversion complète du Glucose en hydrogène à  $12mol_{H_2}/mol_{glucose}$ .

Parce qu'elle facilite le transfert de charge dans l'électrolyte, la conductivité influe significativement sur les performances des BES. Cependant, une conductivité trop élevée pourrait avoir un impact négatif sur la survie des microorganismes du biofilm électroactif en affectant directement leur physiologie par déséquilibre de la pression osmotique de part et d'autre de leur membrane cellulaire (Lefebvre et al., 2012). De précédentes études rapportent une augmentation des performances des piles microbiennes (MFC) en milieu salin qui semble néanmoins limitée en raison de l'origine non saline de l'inoculum utilisé (Lefebvre et al., 2012). Notre étude vise, entre autre, à développer des biofilms électroactifs adaptés aux conditions salines à partir d'un inoculum adapté au sel.

Dans l'optique du couplage de procédés proposé et compte tenu de l'intérêt d'une conductivité élevée pour l'électrolyse microbienne, nous nous intéresserons au traitement d'effluent salins. Cependant, la salinité reste un facteur très peu étudié en fermentation. Une précédente étude a montré une diminution de la production d'hydrogène due au sel en cultures mixtes (Zheng et al., 2005). Toutefois des études en cultures pures montrent la faisabilité de la fermentation en milieu salin ( $>20 \text{ g}_{\text{NaCl}}/\text{L}$ ) (Simankova et al., 1993; Alshiyab et al., 2008; Liu and Wang, 2012). La sélection microbienne au cours de la fermentation en milieu salin en cultures mixtes reste peu étudiée. L'inoculation en fermentation avec un consortium adapté au sel pourra être envisagée afin de sélectionner un consortium fermentaire adapté aux conditions salines.

Dans le cadre du couplage des deux procédés, les microorganismes en fermentation et en électrolyse microbienne pourraient être affectés par certaines conditions opératoires imposées par chacun des systèmes (fermentation et MEC). Les paramètres abiotiques pouvant affecter le biofilm électroactif sont présentés dans la *Figure 2*. Notamment, la fermentation pour la production d'hydrogène est réalisée à pH bas (environ 5.5) (Guo et al., 2010) alors que l'électrolyse microbienne est mise en œuvre à des pH plutôt neutres voir alcalins (7-9) (Patil et al., 2011). De plus, la fermentation co-produit des acides organiques avec la production d'hydrogène. La composition de l'effluent issu de la fermentation en acides peut donc avoir un impact sur la sélection microbienne et l'activité électroactive du biofilm (Kiely, Regan, et al., 2011). Ainsi, l'influence de certaines de ces conditions abiotiques

sur les fonctions des consortia microbiens de la fermentation (production de biohydrogène) et du biofilm électroactif (électroactivité) sera étudiée.

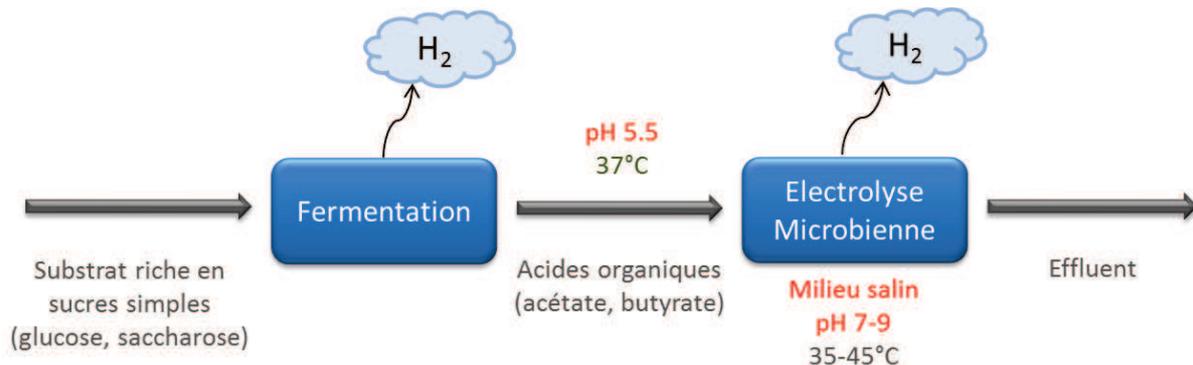


Figure 2 : Couplage de la fermentation et de l'électrolyse microbienne pour la production d'hydrogène.

Le choix et le conditionnement de l'inoculum peuvent également constituer un paramètre déterminant dans la structure de communauté microbienne et l'électroactivité du biofilm. Parmi les différentes stratégies de présélection des ARB (Anode Respiring Bacteria), l'enrichissement en milieu liquide sur Fe(III) constitue la seule méthode ne nécessitant pas la conduite préalable d'un BES. Les résultats dans la littérature présentent, pour certains, une amélioration (Wang et al., 2010), et pour d'autres, une diminution (Kim, Min, et al., 2005) de l'électroactivité du biofilm. Une étude de la sélection microbienne opérée au cours de cette méthode d'enrichissement permettrait d'expliquer ces différences et d'améliorer le procédé d'enrichissement sur Fer(III).

Dans le cadre d'un couplage, la MEC sera soumise à un apport continu de la flore fermentaire. L'étude de l'impact de ce facteur biotique (l'apport d'espèces exogènes issues de la fermentation) sur l'activité et la robustesse du biofilm électroactif en situation de couplage reste un point à étudier.

Afin de répondre à l'ensemble de ce questionnement, ce document est constitué en 6 chapitres :

Le premier chapitre consiste en une étude bibliographique rappelant le contexte scientifique et technique de la production d'hydrogène par fermentation et par électrolyse microbienne, avec la description des biofilms électroactifs. L'accent est mis sur la sélection microbienne de chacun des procédés en cultures mixtes. Ce chapitre fait ensuite l'état de l'art des résultats existants concernant le couplage des deux procédés.

La partie « matériels et méthodes » constitue le deuxième chapitre de cette thèse et décrit l'ensemble des techniques expérimentales mises en œuvre au cours de ce travail.

Les résultats et discussions exposés dans 3 chapitres s'articulent autour d'articles scientifiques en anglais publiés, soumis ou en cours de rédaction et précédés d'un avant-propos et d'une discussion en français.

- Dans le chapitre III, la faisabilité de la fermentation en milieu salin (3-75g<sub>NaCl</sub>/L) à pH 6 et 8 a été étudiée. Ces deux valeurs de pH correspondent respectivement au pH classique de la fermentation et au pH de l'inoculum.
- Le chapitre IV décrit la sélection microbienne opérée dans un biofilm électroactif en condition saline. L'adaptation aux conditions spécifiques de la fermentation (mélange d'acides organiques, pH) a été évaluée. D'autre part la sélection microbienne par pré-sélection dans un milieu enrichi en Fe(III) a été étudiée sur des cycles successifs et comparée à celle qui est réalisée directement au sein du biofilm électroactif. Enfin une étude de la dynamique de colonisation a été réalisée pour établir si la sélection microbienne opérée dans le biofilm s'effectue de manière séquentielle.
- Le chapitre V porte sur l'étude des perturbations biotiques qui peuvent impacter le transfert d'électron et la population microbienne du biofilm. Les interactions entre les deux communautés microbiennes propres à chacun de ces procédés en situation de couplage ont été évaluées par l'ajout de biomasse issue de la fermentation sur le biofilm électroactif.

Enfin la dernière partie « conclusions et perspectives » permet de conclure sur les différents points abordés et d'émettre des perspectives sur la conduite du couplage des deux procédés de fermentation et d'électrolyse microbienne. Cette partie s'appuie sur les liens établis entre la structure des communautés microbiennes en MEC et en fermentation, les individus qui les composent et les fonctions macroscopiques qui leur sont associées (propriétés électroactives du biofilm, potentiel de production d'hydrogène) dans le cadre du couplage.

Ce travail de thèse mené au Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement (LBE-INRA Narbonne) s'inscrit dans le projet Défi H12 financé par l'ANR. Ce projet associe une entreprise (6T-MIC Ingénieries, Toulouse) et différents laboratoires dont le Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement (LBE-INRA, Narbonne), le Laboratoire de Génie Chimique (LGC-CNRS Toulouse) et deux laboratoires du Commissariat à l'Energie Atomique et aux énergies alternatives (CEA de Cadarache et CEA de Saclay). Le projet Défi H12 a pour objectif la production d'hydrogène par l'électrolyse microbienne en vue de la coupler à la production de biohydrogène par fermentation.

---

## CHAPITRE I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

---

*Dans ce chapitre, et afin d'illustrer le contexte de l'étude, nous rappellerons d'abord les différents procédés de production d'hydrogène. La production de biohydrogène par voie fermentaire sera ensuite détaillée. Puis la production d'hydrogène par électrolyse microbienne sera explicitée en attachant une attention particulière aux microorganismes électroactifs identifiés dans des biofilms mixtes ou étudiés en cultures pures. Enfin, dans un dernier volet, nous présenterons les études existantes relatives au couplage de la fermentation avec l'électrolyse microbienne pour la production d'hydrogène.*



## I.1. L'HYDROGENE : UN COMBUSTIBLE D'AVENIR

---

En 1766, le physicien et chimiste Henri Cavendish parvient à recueillir le gaz inflammable produit de la réaction de l'acide sulfurique sur le Fer. Il montre que sa densité est plus faible que celle de l'air et que sa combustion produit de l'eau. Par la suite, les français Antoine Lavoisier, Pierre Laplace et Jean Baptiste Meunier présentent en 1783 à l'académie des sciences un rapport sur la synthèse de l'eau, « composée, poids pour poids, d'air inflammable et d'air vital ». C'est cet air inflammable qui est alors dénommé « hydrogène » (i.e « qui produit de l'eau »). En 1782, les frères Joseph et Etienne Montgolfier ont d'abord gonflé leur ballons avec de l'hydrogène, plus léger que l'air. Constatant qu'il fuyait au travers des parois des montgolfières trop poreuses, ils l'ont finalement remplacé par de l'air chaud. Au début du 19<sup>ème</sup> siècle, l'hydrogène est utilisé en mélange avec le monoxyde de carbone pour éclairer les rues de Paris (Alleau, 2007).

En 1898, le physicien Ecosais James Dewar, professeur à l'université de Cambridge, parvient à liquéfier l'hydrogène. Son utilisation industrielle est alors facilitée et développée dans de nombreux secteurs comme la chimie, la pétrochimie et la fabrication d'engrais (Alleau, 2007).

Du point de vue de l'énergie, Jules Vernes, écrivain visionnaire, avait décrit l'alternative énergétique de l'hydrogène dans son roman « L'île mystérieuse » en 1874 où il écrit « *oui, mes amis, je crois que l'eau sera un jour employée comme combustible, que l'hydrogène et l'oxygène, qui la constituent, utilisés isolément ou simultanément, fourniront une source de chaleur et de lumière inépuisables et d'une intensité que la houille ne saurait avoir* ». Si l'on ajoute à cette approche littéraire et populaire les récentes découvertes sur la composition du Soleil (à 92.1% composé d'hydrogène en volume) et de son fonctionnement (fusion nucléaire de 4 atomes d'hydrogène pour former de l'hélium), l'idée de l'hydrogène comme vecteur d'énergie semble orienter les recherches scientifiques vers un effort accru pour le développement de cette filière. Notamment, le programme ITER de « fusion contrôlé » en cours sur le site de Cadarache du CEA en France témoigne de l'intérêt de la communauté scientifique et des sphères politiques pour la recherche d'une nouvelle source d'énergie et également pour la filière hydrogène (Alleau, 2007).

### **I.1.1. L'HYDROGENE : UN VECTEUR ENERGETIQUE**

---

L'hydrogène est l'élément le plus abondant sur terre. Cependant, cet élément ne se trouve pas sous sa forme pure mais combiné au sein de molécules organiques à d'autres atomes comme le carbone, l'oxygène et l'azote par des liaisons covalentes. Sa seule forme diatomique (dihydrogène ou H<sub>2</sub>) correspond à la forme pure de l'hydrogène. L'hydrogène H<sub>2</sub> est très rare dans la nature, avec moins de 1 ppm dans l'atmosphère. Il ne peut donc pas être considéré comme une énergie primaire car des étapes de production, de purification et de stockage sont requises avant toute utilisation. On qualifie donc plutôt l'hydrogène de vecteur énergétique.

L'hydrogène présente de nombreux avantages en tant que vecteur énergétique de par ses propriétés physico-chimiques. En effet, dans les conditions standards de température et de pression (0°C, 1 atm), l'hydrogène est inodore, non-coloré, non-toxique, combustible et son énergie massique est la plus importante répertoriée, soit 122 kJ/g (contre 50 kJ/g et 45 kJ/g dans les cas du méthane et de l'essence respectivement). Toutefois, la molécule de dihydrogène est la molécule de plus faible poids moléculaire (2 g/mol). Ainsi à poids égal, l'hydrogène occupe un volume plus élevé qu'un autre gaz et son énergie volumique de combustion est très faible (10 kJ/L contre 30 kJ/L avec le méthane). Ceci implique des contraintes de stockage (compression) et de transport.

Cependant, l'utilisation de l'hydrogène ne produit que de l'eau et pas de gaz à effet de serre. Ainsi, s'il est produit de manière à limiter la production de gaz à effet de serre, l'hydrogène constitue une énergie propre (Hajjaji et al., 2013).

### **I.1.2. LES UTILISATIONS DE L'HYDROGENE**

---

#### **I.1.2.1. UTILISATION EN SYNTHÈSE CHIMIQUE**

---

L'hydrogène est une des matières de base de l'industrie chimique. Il est principalement utilisé lors de la synthèse d'ammoniac (NH<sub>3</sub>), mais aussi pour la fabrication d'engrais, l'hydrogénation des corps gras (graisses alimentaires, savons, lubrifiants, peintures, etc...) et la synthèse de molécules chimiques telles que les amines, le méthanol, l'eau oxygénée, etc... (Association Française de l'hydrogène)

Dans les industries, l'hydrogène peut être fabriqué spécifiquement dans des unités dédiées à sa production. Il peut aussi être co-produit lors de la fabrication d'autres composés et directement utilisé sur site (Association Française de l'hydrogène).

Dans l'industrie pétrolière, suivant les procédés mis en œuvre, les raffineries peuvent produire de l'hydrogène (reformage, cracking thermique ou catalytique...) ou au contraire en consommer (hydrocracking, hydrotraitement, désulfuration...). La variété croissante des produits pétroliers préparés à partir de pétrole brut fait croître la demande en hydrogène et induit des rendements globaux déficitaires en hydrogène. Ainsi, les raffineries sont le plus souvent amenées à produire l'hydrogène complémentaire nécessaire à leur activité grâce à des unités de « vaporéformage » (i.e. dissociation de chaînes carbonées) (Association Française de l'hydrogène).

L'industrie pétrolière présente en Europe la plus grande part de consommation d'hydrogène (44%), devant la production d'ammoniac (36%) et les autres industries chimiques (13%) (Association Française de l'hydrogène).

#### **I.1.2.2. UTILISATION COMME CARBURANT**

---

##### **I.1.2.2.1. Combustion dans un moteur**

L'utilisation de l'hydrogène comme carburant pour le transport routier est en cours de développement. Il est possible de l'utiliser dans un moteur à combustion bien qu'il faille opérer des modifications sur ce dernier pour permettre une injection adaptée à un carburant gazeux, une taille de moteur adaptée au volume de fluide utilisé, l'utilisation de matériaux adaptés à l'utilisation de l'hydrogène et un réglage précis du moteur lié à la vitesse de combustion de l'hydrogène (Association Française de l'hydrogène, n.d.).

L'hydrogène sous forme liquide est également utilisé dans l'aérospatiale pour la propulsion de fusées avec sa combustion par l'oxygène. Dans le moteur Vulcain de la fusée Ariane V, ces deux éléments sont transportés sous forme liquide et la combustion se fait dans la chambre de combustion grâce à l'ajout d'hydrogène et d'oxygène à l'aide d'injecteurs.

I.1.2.2.2. Pile à combustible

Il est possible de convertir l'hydrogène en électricité grâce aux piles à combustible. Au sein de ces systèmes, deux électrodes sont plongées dans un électrolyte et séparées par une membrane échangeuse d'ions. L'anode et la cathode sont respectivement alimentées par de l'hydrogène et de l'oxygène pour assurer séparément l'oxydation de l'hydrogène et la réduction de l'oxygène. La pile à combustible fournit de l'électricité et de la chaleur et co-produit de l'eau Figure I-1.

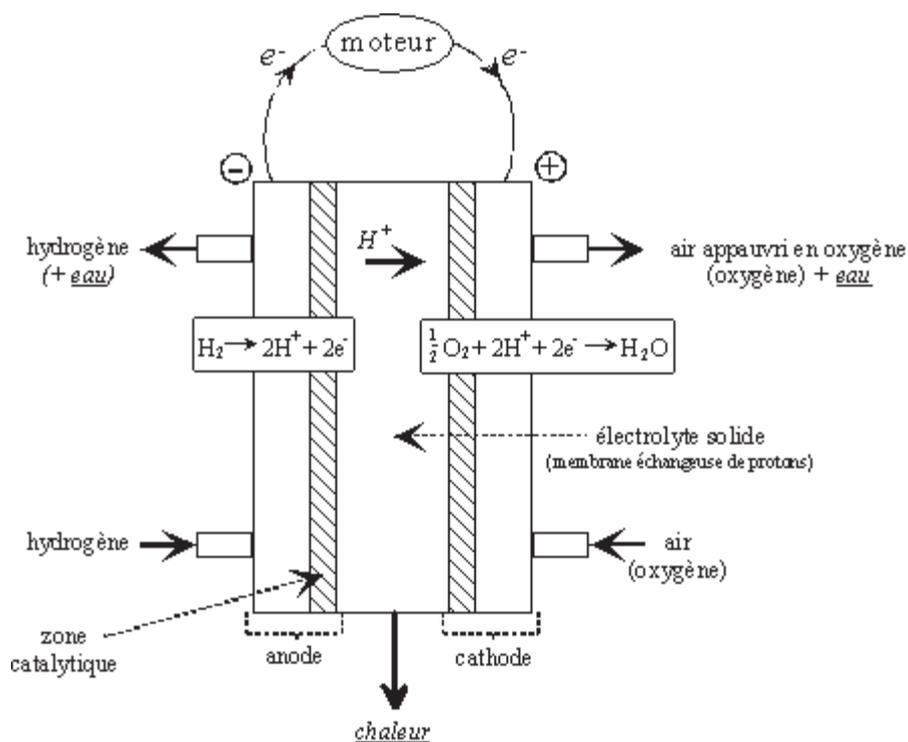


Figure I-1 : Schéma de principe de la pile à combustible PEMFC (Proton Exchange Membrane Fuel Cell).

(Association Française de l'hydrogène)

Les piles à combustibles à hydrogène sont en cours de développement chez les constructeurs automobiles (Pile à combustible à membrane échangeuse d'ions – PEMFC). Les PEMFC permettent d'obtenir des puissances jusqu'à 1MW et présentent l'avantage d'être transportables grâce à leurs compacité. Malgré le manque de sites de réapprovisionnement en hydrogène, certains modèles sont déjà proposés à la vente aux particuliers (Mercedes classe B F-Cell, Honda FCX Clarity).

## I.2. LES PROCÉDES DE PRODUCTION D'HYDROGÈNE

---

Les différents modes de production d'hydrogène sont répertoriés dans le Tableau I-1. La plus grande partie de l'hydrogène utilisé actuellement est produite par reformage de combustibles fossiles (95%). La production de bio-hydrogène présente donc un enjeu environnemental fort. Pour que l'hydrogène devienne un combustible propre, il est nécessaire de développer des filières durables de production. Deux familles de technologies sont explorées : Celles fondées sur la décomposition thermochimique ou électrochimique de l'eau et celles utilisant des sources de biomasse.

Plusieurs voies biologiques de production existent : la photobiolyse de l'eau, la fermentation, la photofermentation et l'électrolyse microbienne. Ces trois méthodes fonctionnent car les micro-organismes peuvent utiliser les ions hydrogène comme accepteurs d'électrons selon la demi-réaction :  $2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{H}_2$ . Ces 3 approches diffèrent cependant dans l'origine des électrons.

La production de  $\text{H}_2$  par photobiolyse de l'eau est lente ( $0,355 \text{ mmol}_{\text{H}_2}/\text{L}/\text{h}$ ) (Levin et al., 2004) et son efficacité dépend des conditions climatiques.

La productivité de  $\text{H}_2$  par fermentation est la plus importante (jusqu'à  $121 \text{ mmol}_{\text{H}_2}/\text{L}/\text{h}$  en cultures mixtes (Levin et al., 2004)) mais le rendement de conversion (en équivalent  $\text{H}_2$  par équivalent électrons fournis) reste faible (de l'ordre de  $2,5 \text{ mol}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{Hexose}}$  (Hawkes et al., 2007). Ceci représente 63% du rendement maximum théorique de ce procédé qui est de  $4 \text{ mol}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{Hexose}}$  et une conversion de seulement 21% d'hexose en hydrogène (la conversion maximale étant de  $12 \text{ mol}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{Hexose}}$ ).

La cellule d'électrolyse microbienne ou MEC (« Microbial Electrolysis Cell ») issue de la pile à combustible microbienne (MFC ou « Microbial Fuel Cell »), utilise des micro-organismes électroactifs à l'anode qui peuvent transmettre des électrons provenant de la matière organique vers la cathode. En suivant un circuit électrique externe, les électrons atteignent la cathode où ils réagissent avec les ions  $\text{H}^+$  pour produire de l' $\text{H}_2$ . Toutefois, à la différence de la pile qui produit de l'électricité, la MEC nécessite l'apport d'une tension électrique. Les MECs présentent plusieurs avantages. Notamment, des substrats co-produits peuvent être complètement oxydés en  $\text{CO}_2$ , ce qui permet un très bon taux de conversion de la matière organique en hydrogène (Logan, 2010; Pant et al., 2012).

Tableau I-1 : Modes de production d'hydrogène physico-chimiques et biologiques principaux : principe, avantages et inconvénients. (adapté de Rafrafi, 2010)

TECHNIQUES	PRINCIPE	AVANTAGES	INCONVENIENTS
<b>LES PROCEDES PHYSICO-CHIMIQUES</b>			
<b>Réformage :</b>	Chauffage à haute température (à 840-950°C) pour obtenir des éléments gazeux ensuite séparés par un jeu de températures à partir de : <ul style="list-style-type: none"> <li>- combustibles fossiles (vaporeformage):  <math>C_nH_m + n H_2O \rightarrow n CO + (m/2 + n) H_2</math>  <math>CO + H_2O \rightarrow CO_2 + H_2</math></li> <li>- charbon : (gazéification du charbon), coke et solides carbonés autres.</li> <li>- vapeur d'eau</li> </ul>	Technologie mature, peu coûteuse	Rejet de CO <sub>2</sub> , utilisation d'énergies fossiles
<b>Electrolyse de l'eau :</b>	Séparation de la molécule d'eau 80°C < Température < 1000°C, réaction inverse d'une pile : <ul style="list-style-type: none"> <li>- Anode : <math>H_2O \rightarrow 2H^+ + 2e^- + 1/2O_2</math></li> <li><math>\Delta G^\circ = 285kJ.mole^{-1}</math> (apport électrique nécessaire)</li> <li>- Cathode: <math>2H^+ + 2e^- \rightarrow H_2</math></li> </ul>	Technologie mature, pas de rejet de CO <sub>2</sub>	Coûteuse énergétiquement ; Taille des installations
<b>Pyrolyse de la biomasse :</b>	Chauffage (sans flamme) à haute température de corps organiques complexes, pour produire des éléments simples. Utilisation de déchets solides et de boues d'épuration possible.	Pas de production de CO <sub>2</sub>	Coûteuse énergétiquement
<b>Nucléaire :</b>	Utilisation de réacteurs de 4 <sup>ème</sup> génération	Pas de rejet de CO <sub>2</sub>	Déchets nucléaires Technologie non mature
<b>Photoélectrolyse :</b>	Utilisation de la lumière solaire qui agit sur une cellule photoélectrique produisant des bulles d'H <sub>2</sub> et d'O <sub>2</sub> si elle est immergée dans l'eau.	Pas de rejet de CO <sub>2</sub>	A l'état de recherche
<b>LES PROCEDES BIOLOGIQUES</b>			
<b>Bio-photolyse de l'eau</b>	Réaction réalisée par des algues et des cyanobactéries (ex. : l'algue verte <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> ) $2 H_2O + hv \rightarrow 2 H_2 + O_2$ (couplage de la photosynthèse et de l'action d'hydrogénases <sup>1</sup> )	Besoin d'eau et de lumière Pas de rejet de CO <sub>2</sub>	Coûts des photo-bioréacteurs Faible conversion de l'énergie solaire Production d'H <sub>2</sub> limitée par rapport aux procédés physico-chimiques Production séquencée (cycle de la photosynthèse et/ou stress bactérien)
<b>Photo-fermentation</b>	Réaction réalisée par des bactéries photosynthétiques anoxygènes (bactéries pourpres, hétérotrophes) (ex. : <i>Rhodobacter capsulatus</i> ) Utilisation de la lumière et des nitrogénases <sup>2</sup> , sous carence d'azote $C_6H_{12}O_6 + 6H_2O + hv \rightarrow 12 H_2 + 6CO_2$	Rendement théorique de conversion en H <sub>2</sub> élevé Valorisation des déchets organiques	
<b>Fermentation</b>	Réaction réalisée par des bactéries anaérobies strictes (ex. <i>Clostridium butyricum</i> ) ou facultatives (ex. <i>Enterobacter cloacae</i> ) lors de la transformation de la matière organique grâce à des hydrogénases <sup>1</sup> . $C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow 4 H_2 + 2CH_3COOH + 2CO_2$ $C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3CH_2CH_2COOH + 2CO_2 + 2H_2$	Production à partir de matière organique variée, Pas besoin de lumière	Purification de l'H <sub>2</sub> nécessaire, Sensibilité à la pression d'H <sub>2</sub> , Accumulation de métabolites secondaires
<b>Electrolyse Microbienne</b>	Réaction réalisée par des bactéries électroactives formant un biofilm (ex. <i>Shewanella</i> , <i>Geobacter</i> ) qui transfère les électrons issus de l'oxydation de molécules organiques au système : $C_2H_4O_2 + 2 H_2O \rightarrow 2 CO_2 + 8 H^+ + 8 e^-$ Pour une réduction des protons à la cathode : $2H^+ + 2e^- \rightarrow H_2$	Rendement de conversion en H <sub>2</sub> élevé Valorisation des déchets organiques	A l'état de recherche

(1) Hydrogénase : enzyme catalysant l'oxydation réversible de l'H<sub>2</sub>.(2) Nitrogénase : enzyme catalysant la réduction de l'azote atmosphérique (N<sub>2</sub>) en ammoniac (NH<sub>3</sub>).

### I.2.1. PRODUCTION D'HYDROGENE PAR DECOMPOSITION ELECTROCHIMIQUE DE L'EAU

La voie électrochimique représente environ 4% de la production actuelle (Damien, 1992). L'électrolyse en milieu alcalin ( $\text{pH} > 14$ ) est la technologie la plus répandue. Toutefois, elle présente des problèmes de corrosion et les catalyseurs d'électrodes restent améliorables. La forte concentration des électrolytes peut poser des problèmes environnementaux et des phénomènes de décantation (des précipités formés par les ions dissous), en phase d'arrêt. L'électrolyse en milieu acide ( $\text{pH} < 1$ ), moins répandue, est surtout utilisée pour produire de faibles quantités d'hydrogène de grande pureté.

En électrolyse de l'eau, la cathode est le siège de la production d'hydrogène et l'anode celui de l'oxydation de l'eau (cf. ci-dessous : réactions en milieu acide):



Pour que la réaction globale se produise, il est nécessaire de fournir entre l'anode et la cathode une différence de potentiel supérieure à la valeur de l'équilibre thermodynamique (1,23V en conditions standards). Les électrolyses en milieu alcalin sont usuellement réalisées à des différences de potentiel de l'ordre de 1,8 à 2 V. Ce procédé est très coûteux en énergie et la consommation électrique, de l'ordre de 4 à 5 kWh/Nm<sup>3</sup> d'hydrogène, représente 80% du coût de production de l'hydrogène.

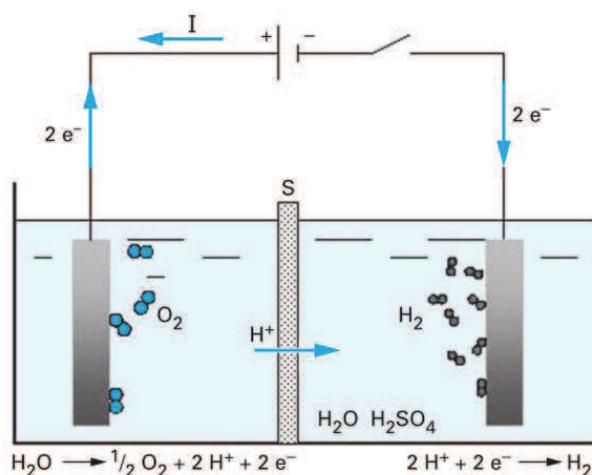


Figure I-2 : Schéma de principe d'une cellule d'électrolyse de l'eau (Millet, 2008).

## **I.2.2. VOIES BIOLOGIQUES DE PRODUCTION D'HYDROGENE**

---

### **I.2.2.1. LES PHOTO-BIOPROCEDES**

---

Les algues ou bactéries photosynthétiques utilisent l'énergie solaire pour convertir le dioxyde de carbone et l'eau en carbohydrates et oxygène. Certains micro-organismes, peuvent aussi utiliser l'énergie solaire pour produire de l'hydrogène. Les trois principaux procédés sont : la biophotolyse direct, la biophotolyse indirecte et la photofermentation.

La biophotolyse directe consiste à l'utilisation des électrons issus de la scission de l'eau en oxygène et en protons par l'hydrogénase, ce qui permet la production d'hydrogène. Cependant les productivités en hydrogène citées dans la littérature sont faibles, de l'ordre de 0.007 mmolH<sub>2</sub>/L/h (Levin et al., 2004) à cause de la forte sensibilité des hydrogénases vis-à-vis de l'oxygène qui est malheureusement un des produits de la réaction.

La biophotolyse indirecte est similaire à la biophotolyse directe. La différence réside dans le fait que la production d'hydrogène est découplée de manière spatiale ou temporelle, limitant le problème de sensibilité des hydrogénases à l'oxygène. Ce qui est par exemple le cas pour les cyanobactéries qui fixent le dioxyde de carbone la journée et produisent de l'hydrogène la nuit via la nitrogénase (Hallenbeck and Benemann, 2002).

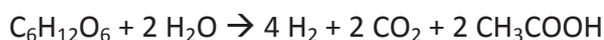
La photofermentation est similaire à la photosynthèse classique. Cependant, les photons oxydent des substrats organiques à la place de la molécule d'eau. Elle est réalisée par les bactéries pourpres telles que *Rhodobacter* ou *Rhodospseudomonas*. Le rendement théorique de conversion de l'énergie lumineuse en hydrogène est proche de 100%. Cependant, en pratique les rendements obtenus sont proche de 4%. Ces faibles rendements peuvent être expliqués par l'inhibition due à l'excès de lumière (Hallenbeck and Benemann, 2002).

### **I.2.2.2. FERMENTATION**

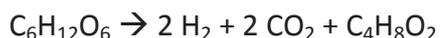
---

Les procédés par voie fermentaire permettent la production d'hydrogène à partir de carbohydrates simples (saccharose, glucose) ou de polysaccharides complexes. Les productivités de tels systèmes sont intéressantes, de l'ordre de quelques litres d'hydrogène/L réacteur/h (Hallenbeck and Benemann, 2002; Hawkes et al., 2007; Guo et al., 2010). Par exemple, Levin et al. (2004) ont obtenu 2.7 L/L/h en condition mésophiles. Les

rendements restent cependant limités en termes de moles d'hydrogène produit par mole de substrat du fait de la co-production d'acides organiques non-fermentescibles. Par exemple, la fermentation du glucose produit au maximum 4 moles d'hydrogène par mole de glucose par la voie métabolique de l'acide acétique (Figure I-3):



ou 2 moles d'hydrogène par mole de glucose si elle co-produit l'acide butyrique :



En pratique, les techniques de fermentation donnent de 2,4 à 3,2 moles d'hydrogène par mole de glucose (Hawkes et al., 2007). Ceci est dû au grand nombre de métabolismes impliqués en cultures mixtes. Bien que des pistes proposent d'augmenter cette conversion avec par exemple la conversion phototrophe des acides organiques tels que l'acétate et le butyrate issus de la fermentation (Fang et al., 2005), la stœchiométrie maximale de 12 moles d'hydrogène par mole de glucose :  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 12 \text{H}_2 + 6 \text{CO}_2$  est encore loin d'être atteinte.

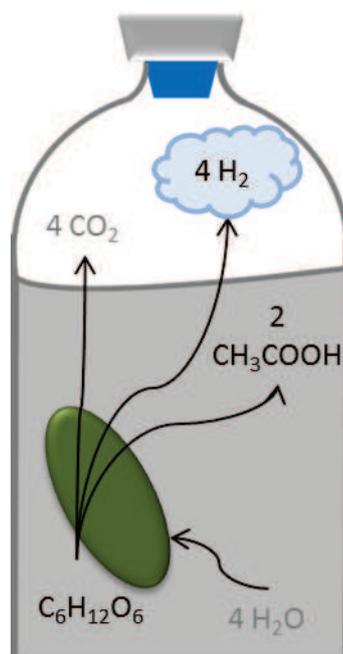
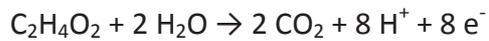


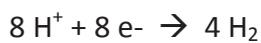
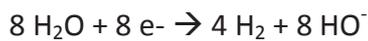
Figure I-3 : Représentation schématique de la fermentation sombre en Batch. Cas de la fermentation du glucose par la voie acétate.

### I.2.2.3. ELECTROLYSE MICROBIENNE

Dans un électrolyseur microbien, un biofilm électroactif développé sur l'anode réalise l'oxydation d'acides organiques ; par exemple pour l'acétate (Figure I-4):



La cathode, quant à elle, assure classiquement la réduction abiotique de l'eau ou du proton suivant la valeur du pH (Figure I-4):



En comparaison avec le procédé traditionnel d'électrolyse de l'eau, les électrolyseurs qui oxydent des acides organiques n'exigent que des tensions beaucoup plus faibles, pouvant descendre jusqu'à 0,14V contre 1.3 V en électrolyse de l'eau abiotique. Pour une production d'hydrogène identique, ce nouveau type d'électrolyseurs permettrait de réduire le coût énergétique d'un facteur proche de 10.

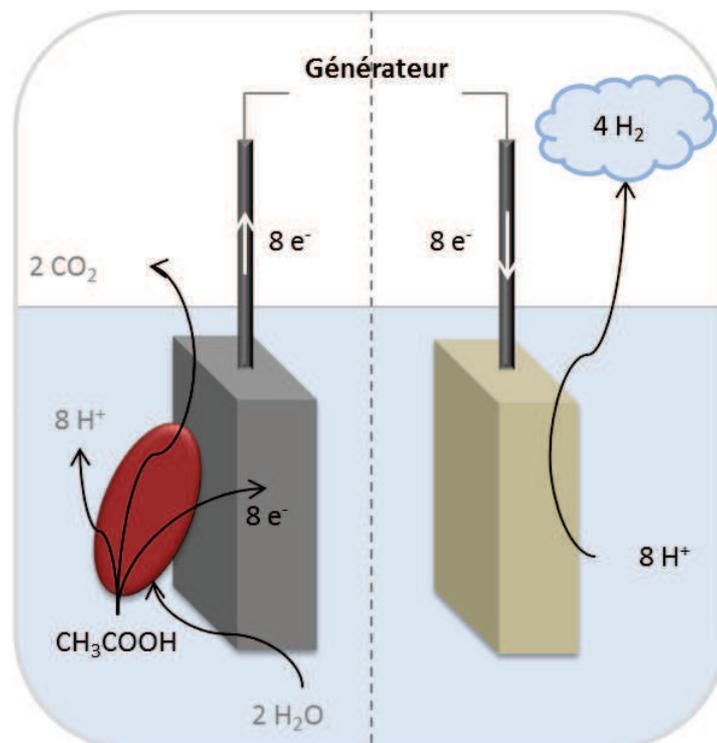


Figure I-4 : Schéma d'un électrolyseur microbien (MEC : "Microbial Electrolysis Cell") avec membrane échangeuse d'ions. Cas de l'oxydation de l'acétate à l'anode.

### **I.3. PRODUCTION DE BIOHYDROGENE PAR VOIE FERMENTAIRE**

---

#### **I.3.1. PRINCIPE**

---

La production de biohydrogène par fermentation permet de réaliser dans un même temps le traitement d'effluents organiques et la production d'hydrogène (Saratale et al., 2008). Cette fermentation dite « sombre » ne nécessite pas de lumière, requiert moins de place et est beaucoup moins coûteuse (environ 340 fois moins chère) que les procédés de production photosynthétiques tels que la photo-fermentation ou la photobiolyse (Atif et al., 2005).

La fermentation est un procédé simple qui nécessite un faible apport énergétique et qui utilise une large gamme de déchets organiques (Hallenbeck and Benemann, 2002; Hawkes et al., 2007). Des monosaccharides ou encore des polymères tels que la cellulose, l'hémicellulose et l'amidon peuvent ainsi constituer les substrats de ce procédé biologique. Il existe 2 voies principales de production d'hydrogène : la voie acétate et la voie butyrate. Chacune de ces voies génère des co-produits de l'hydrogène qui sont respectivement l'acétate et le butyrate. La voie de production d'acétate présente un rendement molaire maximal de 4 moles d'hydrogène par mole d'hexose équivalent, alors que pour la voie « butyrate », le rendement maximal théorique en hydrogène est plus faible avec 2 moles d'hydrogène par mole d'hexose équivalent. Les rendements effectivement atteints sont cependant inférieurs du fait de plusieurs voies de consommation d'hydrogène ou en concurrence pour le substrat.

#### **I.3.2. VOIES METABOLIQUES DE PRODUCTION D'HYDROGENE PAR FERMENTATION**

---

Plusieurs voies métaboliques sont susceptibles de produire du biohydrogène par voie fermentaire (Figure I-5).

Le glucose est converti en pyruvate par glycolyse (ou voie d'Ebden-Meyerhof Parnas) en produisant de l'Adénosine Triphosphate (ATP) à partir d'adénosine diphosphate (ADP) et de la formation de la Nicotinamide Adénine Dinucléotide (NADH). Le pyruvate est alors l'élément central du métabolisme, il peut être notamment :

- Converti en acétyl-Coenzyme A (Acétyl-CoA), en CO<sub>2</sub> et en H<sub>2</sub> par la pyruvate ferredoxine oxydoréductase et une hydrogénase.
- Converti en acétyl-CoA et en formate qui peuvent être transformés en CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub> par certaines entérobactéries comme *Escherichia coli*.

L'acétyl-CoA est ensuite converti en acétate, butyrate et/ou éthanol en fonction des micro-organismes, de la charge en substrat et des conditions expérimentales.

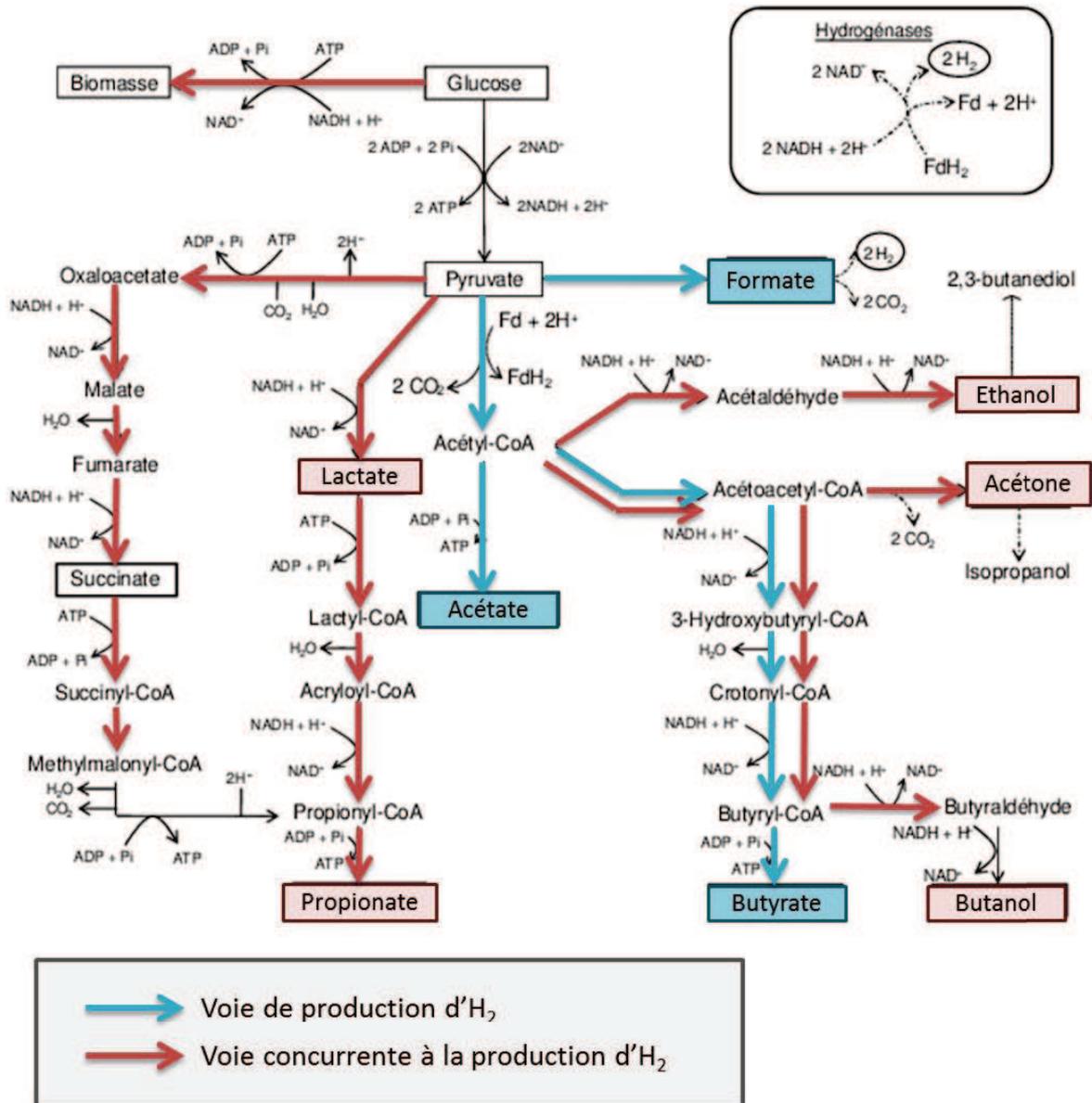
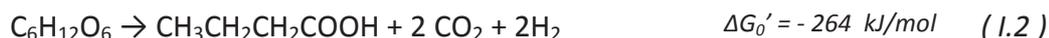
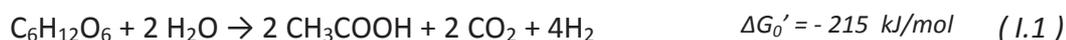
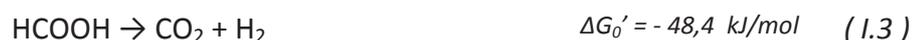


Figure 1-5: Principales voies métaboliques impliquées de production ou concurrente à la production de biohydrogène par voie fermentaire (adapté de Latrille et al. (2011))

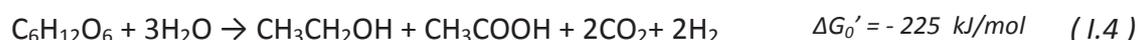
Parmi le large panel de produits finaux générés par les divers groupes microbiens au cours de la fermentation en cultures mixtes, l'acétate et le butyrate sont principalement co-produits par le biais des métabolismes de production d'hydrogène généralement décrits pour *Clostridium* sp. ou les *Enterobacteriaceae*. Les équations de production d'hydrogène par ces deux voies sont décrites ci-dessous (Hawkes et al., 2007; Latrille et al., 2011):



Il est également possible de produire de l'hydrogène à partir de formiate. En effet, certains micro-organismes, comme *Escherichia coli*, présentent la particularité de détourner une partie de leur métabolisme pour produire de l'hydrogène via la voie de synthèse du formiate :



Une autre voie de production a été proposée par Li *et al.* (2007) et Rodríguez *et al.* (2006), avec la production d'acétate et d'éthanol. Cette voie de production présente un rendement maximal de 2 moles d'hydrogène par mole de glucose :



Toutefois, la majeure partie des études en cultures mixtes et en continu ont démontré que les principaux métabolites produits étaient l'acétate et le butyrate, avec prédominance du butyrate pour les pH les plus bas (Hawkes et al., 2007; Guo et al., 2010). Ainsi, Hawkes *et al.* (2007) proposent une équation globale pour décrire la production d'hydrogène par voie fermentaire en cultures mixtes :



Même si d'après cette équation les rendements de production d'hydrogène en cultures mixtes doivent atteindre 2,5 moles d'hydrogène par mole d'hexose, les rendements actuels de production d'hydrogène sont généralement inférieurs. Ceci s'explique notamment par la présence de voies consommatrices d'hydrogène ou de voies concurrentes à la production d'hydrogène.

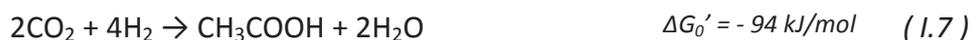
### I.3.3. VOIES DE CONSOMMATION

L'hydrogène est un vecteur énergétique qui permet le transfert d'électrons inter-espèces. Au sein de la chaîne trophique, l'hydrogène est un intermédiaire moléculaire clé de la symbiose entre consommateurs et producteurs d'hydrogène. Ainsi, en cultures mixtes, d'autres produits métaboliques que ceux cités précédemment peuvent s'accumuler dans le milieu.

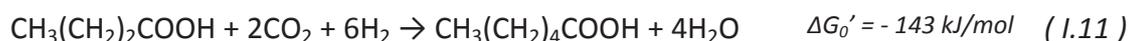
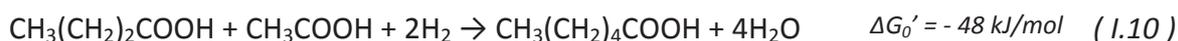
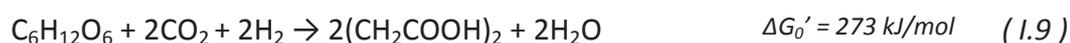
Les espèces les plus connues au sein du processus de digestion anaérobie sont les *Archaea* méthanogènes hydrogénotrophes qui sont capables de produire du méthane à partir d'H<sub>2</sub> et de CO<sub>2</sub>. En anaérobiose, elles sont consommatrices d'hydrogène car la réaction de méthanisation y est thermodynamiquement très favorable ( $\Delta G_0 = -136 \text{ kJ.mol}^{-1}$ ), plus favorable même que la production de méthane à partir d'acétate (pour laquelle  $\Delta G_0 = -31 \text{ kJ.mol}^{-1}$ ) (Rafrafi, 2010) :



Une l'accumulation d'acétate dans le milieu n'est pas nécessairement le fait d'une production de biohydrogène par la voie acétate, mais peut être due à l'action des bactéries homoacétogènes, comme *Clostridium aceticum* ou *Clostridium thermoaceticum*, qui sont capables de consommer le CO<sub>2</sub> et l'H<sub>2</sub> pour former de l'acétate selon la réaction d'homoacétogénèse suivante (Latrille et al., 2011):



Le propionate, le succinate et le caproate sont des métabolites issus de voies de consommation d'hydrogène décrites ci-dessous (Latrille et al., 2011):



Les bactéries sulfato-réductrices peuvent également consommer l'hydrogène par réduction des sulfates. Pour de faibles concentrations en sulfate dans le milieu (environs 500

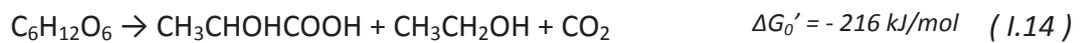
mg.L<sup>-1</sup>) et un faible taux d'hydrogène (10<sup>-6</sup> atm), la réaction, thermodynamiquement très favorable, peut se produire, selon (Latrille et al., 2011).



### I.3.4. VOIES CONCURRENTES

Les voies concurrentes à la production d'hydrogène consomment une partie du substrat qui ne pourra pas être utilisée pour la production d'hydrogène.

C'est le cas des voies homolactiques et hétérolactiques réalisées par les bactéries lactiques (*Lactobacillus* sp., *Enterococcus* sp., *Streptococcus* sp., *Bacillus* sp. ou *Bifidobacterium* sp.) qui sont en compétition pour le substrat avec les bactéries acétogènes (Figure I-6):



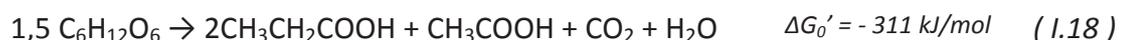
Certaines bactéries acétogènes comme *Sporomusa* sp. ou *Clostridium* sp. sont capables de fermenter le glucose en utilisant la voie homoacétique en produisant alors 3 moles d'acétate par mole de glucose :



Certains micro-organismes, outre les levures, sont également capables de produire de l'éthanol à partir de glucose. C'est le cas de *Zymomonas* sp. (Figure I-6).



Enfin, la fermentation propionique co-produit du propionate et de l'acétate (Figure I-6).



Au sein même des micro-organismes producteurs d'hydrogène, des voies métaboliques alternatives causées par un stress environnemental peuvent apparaître. En de telles situations, ces micro-organismes peuvent effectuer la solvantogénèse. Par exemple, les

bactéries du genre *Clostridium* peuvent produire de l'éthanol, de l'acétone, du butanol, du lactate ou du propionate en cas de stress cellulaire. La production d'hydrogène est alors rendue impossible du fait de la compétition pour l'élément réducteur NADH au sein de la cellule (Figure I-5). Chez *Clostridium* sp. la solvantogénèse est par ailleurs associée à un phénomène de sporulation. La production d'hydrogène peut donc être perturbée par divers facteurs qui déclenchent la sporulation et la solvantogénèse. Ces facteurs peuvent être un choc de température, une baisse brutale du pH (d'une ou deux unités), la présence d'oxygène dans le milieu (traces), un excès ou une carence en nutriments (source de carbone, azote, phosphore ou fer). La solvantogénèse peut aussi être causée par l'accumulation de sous-produits de fermentation (concentrations en acétate et/ou butyrate supérieures à 60mM) ou par la sécrétion de bactériocines dans le milieu par d'autres espèces fermentaires en cultures mixtes telles que *Lactobacillus* (Noike *et al.*, 2002).

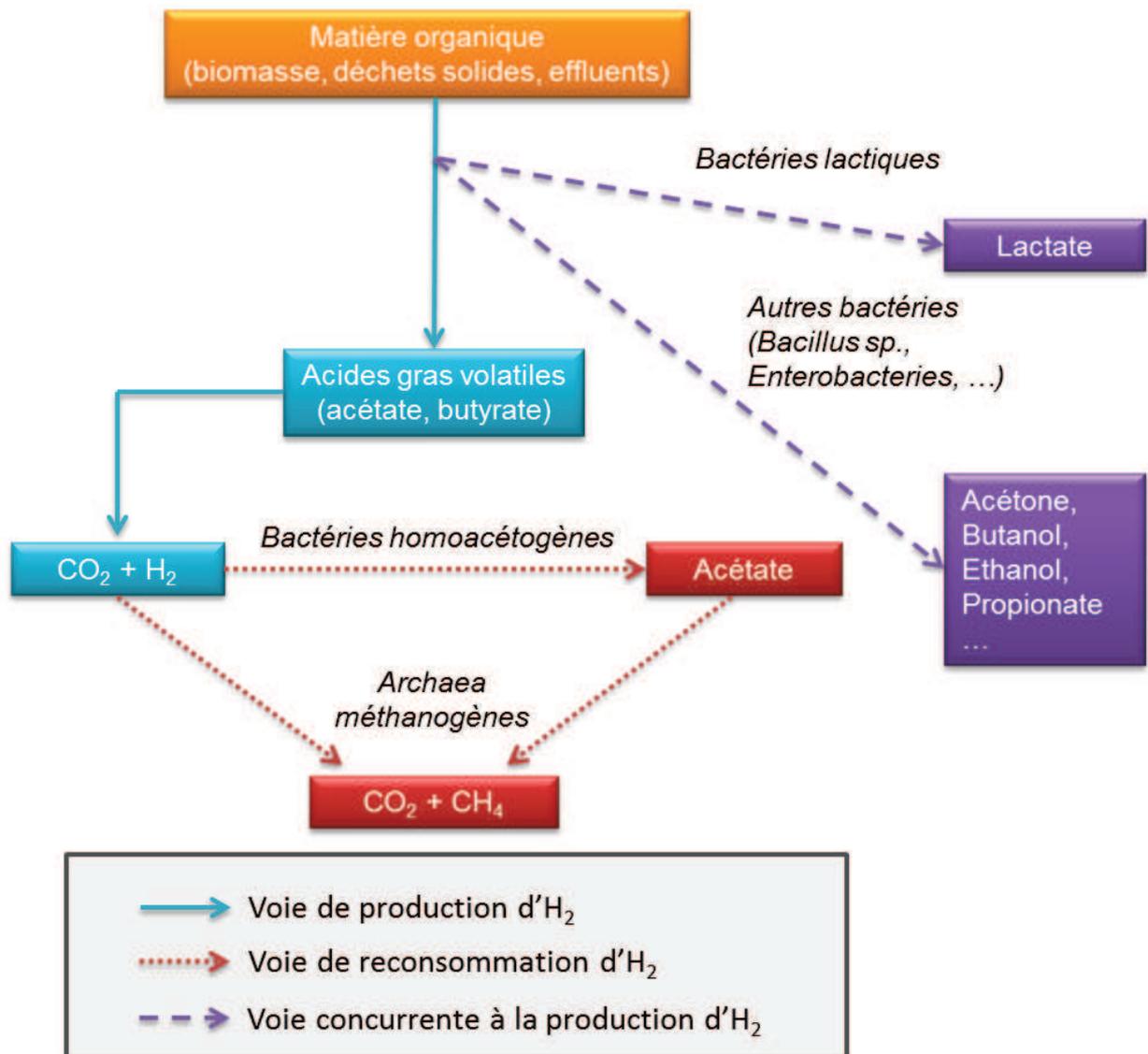


Figure 1-6: Voies métaboliques générales dans le mécanisme de production de biohydrogène par fermentation (adapté de Guo et al. (2010))

### I.3.5. CONDITIONS OPERATOIRES

---

#### I.3.5.1. pH

---

Le pH est un facteur essentiel pour la production d'hydrogène (Chu *et al.*, 2008; Espinoza-Escalante *et al.*, 2009) car il permet de :

- limiter la croissance des organismes méthanogènes,
- améliorer la production de biohydrogène en contrôlant les voies métaboliques (action sur l'activité des hydrogénases),
- éviter la solvantogénèse (formation de lactate, propionate, éthanol, acétone et butanol).

Le pH optimal pour la production d'H<sub>2</sub> reporté dans la littérature se situe entre 5,0 et 6,0 pour les déchets alimentaires et 7,0 pour les résidus agricoles et les fumiers d'animaux (Guo *et al.*, 2010).

Le pH impacte fortement les voies métaboliques de production de biohydrogène. Une étude en batch a répertorié les pH optimaux (dans un intervalle de 4 à 8) pour la production d'hydrogène à partir de différents substrats et en cultures mixtes (Li *et al.*, 2007). La gamme de pH optimaux varie de 5,2 à 7,0 avec une moyenne à pH 6 (Li *et al.*, 2007). L'effet du pH sur la conversion du glucose en hydrogène en cultures mixtes a été étudié par Fang and Liu (2002). A 36°C, un pH optimal a été déterminé à 5,5 en termes de production de biohydrogène (64±2 % du biogaz produit) avec un rendement de 2,1 ± 0,1 mol H<sub>2</sub>/mol glucose.

Dans la plupart des études, à pH régulé et en cultures mixtes, le butyrate et l'acétate sont les deux principaux produits, avec une prédominance du butyrate à des pH bas et du propionate à des pH neutres ou basiques (Li *et al.*, 2007). Plus particulièrement, d'après une étude de Fang et Liu (2002), le butyrate est prédominant à des valeurs de pH inférieures ou égales à 6 et l'acétate devient majoritaire pour des valeurs supérieures à 6,5. Plus généralement, les voies productrices d'hydrogène « butyrate » et « acétate » sont favorisées à des pH relativement bas (pH 4,5-6,0) alors qu'à pH neutre ou alcalin, l'accumulation d'éthanol, de propionate, de lactate et de caproate est observée (Hawkes ., 2007, Fang et Liu, 2002).

L'impact du pH sur l'activité métabolique et la diversité microbienne a été étudié par Temudo *et al.* (2008) au cours de la fermentation du glucose, du xylose et du glycérol à 30°C. Il a ainsi d'abord été vérifié que pour des valeurs de pH inférieures à 6, les métabolites produits étaient principalement l'acétate et le butyrate tandis que pour des pH plus élevés, l'éthanol et l'acétate étaient principalement retrouvés. La prédominance d'espèces du genre *Clostridium* a été montrée pour toutes les valeurs de pH testées (4–8,5). Cependant une plus grande diversité microbienne a été notée aux pH plus élevés avec la sélection d'espèces appartenant à d'autres genres comme *Klebsiella* (Temudo *et al.*, 2008).

Le pH du milieu influence donc non seulement les voies métaboliques empruntées, mais aussi la diversité des communautés microbiennes.

#### **I.3.5.2. TEMPERATURE**

---

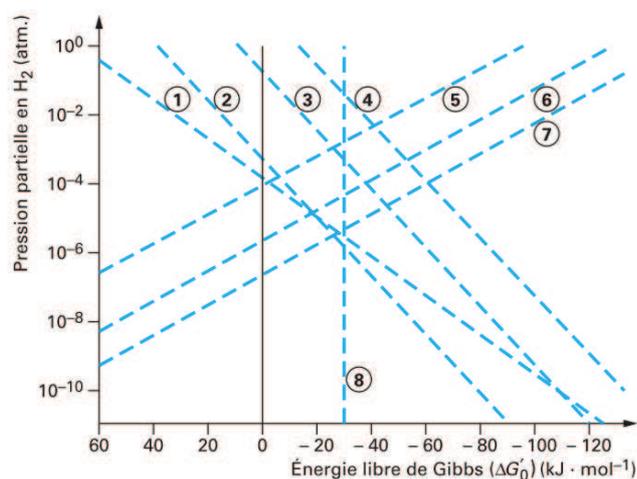
Les travaux portant sur la production d'hydrogène ont été réalisés soit à température ambiante (15-30 °C), soit en conditions mésophiles (32-39°C) ou thermophiles (50-64°C). Sur des substrats simples, les rendements de production d'hydrogène sont comparables à des températures mésophiles et thermophiles mais sont inférieurs à température ambiante (Li *et al.*, 2007; Wang and Wan, 2009a). Bien que la température optimale des hydrogénases soit de 50 °C (Adams and Mortenson, 1984), ce sont les conditions mésophiles qui sont les plus étudiées dans la littérature s'intéressant à la production d'hydrogène par fermentation (Li *et al.*, 2007). En effet, à rendements similaires, elles restent moins coûteuses en énergie.

#### **I.3.5.3. PRESSION PARTIELLE EN HYDROGENE**

---

La pression partielle en hydrogène joue également un rôle important dans la production d'hydrogène par fermentation. Elle conditionne la valeur des enthalpies libres des réactions métaboliques. En anaérobiose, les dispositifs expérimentaux engendrent une sursaturation des gaz dans la phase liquide, favorisant la formation de bulles de gaz et augmentant la pression partielle en hydrogène du milieu. Une pression partielle croissante cause une diminution de l'activité des hydrogénases et rend les réactions de production d'hydrogène thermodynamiquement défavorables (Kim *et al.*, 2006).

Ainsi, l'augmentation de la concentration du milieu en hydrogène non seulement inhibe la production d'hydrogène mais induit également un changement des voies métaboliques vers la production de lactate et/ou solvantogénèse avec production d'éthanol, de butanol et/ou d'acétone (Valdez-Vazquez and Poggi-Varaldo, 2009).



- |                           |   |
|---------------------------|---|
| ① propionate vers acétate | ⑤ homoacétogénèse   |
| ② butyrate vers acétate   | ⑥ méthanogénèse hydrogénotrophe                           |
| ③ éthanol vers acétate    | ⑦ sulfatoréduction vers H <sub>2</sub> S                  |
| ④ lactate vers acétate    | ⑧ méthanogénèse acétotrophe (indépendante de l'hydrogène) |

Les concentrations en réactants utilisées sont de : 25 mM (acétate), 10 mM (propionate, butyrate, lactate et éthanol), 5 mM (sulfates), 20 mM bicarbonates, 0,7 atm. (méthane).

Figure 1-7 : Évolution de l'énergie libre standard de Gibbs (à pH 7 et 25°C) des réactions de conversion d'acides gras volatils en acétate avec production d'hydrogène ou de réactions de respiration inorganique, en fonction de la pression partielle en hydrogène du milieu (Latrille et al. 2011).

Pour diminuer artificiellement la pression partielle en hydrogène, plusieurs solutions peuvent être mises en œuvre dans les procédés de production d'hydrogène par voie fermentaire.

L'agitation est la technique la plus utilisée. En effet, augmenter la vitesse d'agitation du milieu revient à augmenter le coefficient de transfert gaz/liquide et donc à réduire la concentration en hydrogène dans la phase liquide du réacteur. Ainsi, Lay (2000) a obtenu une augmentation du rendement en hydrogène de 100% en augmentant la vitesse d'agitation du mélange en fermentation de 100 à 500 rpm. Plus récemment, Aceves-Lara et al. (2008) ont obtenu avec des mélasses d'industries sucrières une production d'hydrogène maximale à la plus forte vitesse testée dans un intervalle compris entre 150 à 300 rpm.

Il est également possible de diluer l'hydrogène en introduisant dans le réacteur un gaz inerte comme de l'azote ou de l'argon. L'inconvénient de cette technique est qu'elle induit une dilution importante de l'hydrogène produit et donc un coût énergétique ultérieur conséquent pour le purifier (Latrille *et al.*, 2011).

Enfin une troisième solution consiste à submerger une membrane de séparation dans le milieu liquide afin de séparer l'hydrogène des autres gaz. Cette méthode présente néanmoins des risques majeurs de colmatages (Valdez-vazquez and Poggi-varaldo, 2009).

D'autre part, pour de très faibles pressions partielles en hydrogène, une formation supplémentaire d'hydrogène pourrait théoriquement provenir de la dégradation de l'acétate par une réaction inverse de l'homoacétogénèse. Cette conversion, thermodynamiquement défavorisée aux températures modérées, est extrêmement sensible à la concentration en hydrogène :



#### **1.3.5.4. SALINITE**

Bien que la concentration en sodium  $\text{Na}^+$  puisse avoir un effet inhibiteur important sur la digestion anaérobie (Feijoo *et al.*, 1995; Oren, 2001; Lefebvre *et al.*, 2007), des communautés microbiennes d'origine naturelle ont présenté des facultés pour s'adapter à de fortes salinités (jusqu'à 210  $\text{g}_{\text{NaCl}}/\text{L}$ ). Finalement, une bonne capacité pour la digestion anaérobie dans ces conditions a été révélée, et notamment pour le traitement des eaux usées chargées en sels (Lefebvre and Moletta, 2006). Certaines de ces communautés microbiennes sont dites halophiles (Mosquera-Corral and Sanchez, 2001; Lefebvre *et al.*, 2006) tandis que d'autres ne le sont pas et doivent être pré-adaptées à des concentrations en sels croissantes avant d'être utilisées comme inocula (Guerrero *et al.*, 1997; Gebauer, 2004; Lefebvre *et al.*, 2007).

Alors que beaucoup d'espèces appartenant aux genres *Clostridium*, *Enterobacter* et *Escherichia* ont été décrites comme productrices d'hydrogène en cultures mixtes et en milieu non-salin (Hawkes *et al.*, 2007; Wang and Wan, 2009a, 2009b; Guo *et al.*, 2010; Quéméneur *et al.*, 2010, 2012; Quéméneur, Hamelin, Benomar, *et al.*, 2011; Quéméneur, Hamelin, Latrille, *et al.*, 2011), seules quelques études ont porté sur la fermentation

d'effluents salins en cultures mixtes pour la production de biohydrogène (Zheng *et al.*, 2005). Zheng *et al.* (2005) ont mis en exergue une diminution progressive des rendements de conversion d'hydrogène de 0,597 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>/mol<sub>Sucrose</sub>·j à 0,089 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>/mol<sub>Sucrose</sub>·j avec une augmentation de la concentration en NaCl de 0 à 30 g<sub>NaCl</sub>/L en milieu acide (pH 6) avec des boues de digesteur anaérobie prétraitées thermiquement.

Des études en cultures pures et en conditions salines (>20 g<sub>NaCl</sub>/L) à pH 7 ont permis de montrer les capacités de production de biohydrogène par voie fermentaire de *Bacillus megaterium* (Liu and Wang, 2012), *Halocella cellulolytica* (Simankova *et al.*, 1993) et *Clostridium acetobutylicum* (Alshiyab *et al.*, 2008). De plus, Alshiyab *et al.* (2008) ont montré que la production d'hydrogène diminuait de 18 % chez *Clostridium acetobutylicum* suite à l'augmentation des concentrations en NaCl de 0 à 5 g<sub>NaCl</sub>/L. Simankova *et al.* (1993) ont montré que *Halocella cellulolytica*, isolée de lagons hypersalins, était aussi capable de produire de l'hydrogène à partir de cellulose microcristalline (avec des concentrations en NaCl de 50 à 200 g<sub>NaCl</sub>/L), avec jusqu'à 4 mmol<sub>H<sub>2</sub></sub>/L pour 100 g<sub>NaCl</sub>/L. Liu and Wang (2012) ont étudié la capacité de *Bacillus megaterium* (*Bacillus* sp. B2) à produire de l'hydrogène dans une gamme de concentration allant de 4 à 70 g<sub>NaCl</sub>/L. Un maximum de production d'hydrogène a pu être observé avec 1,65 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>/mol<sub>Glucose</sub> en conditions marines (30 g<sub>NaCl</sub>/L). Kivisto *et al.* (2010) ont montré que *Halanaerobium saccharolyticum* ssp. *saccharolyticum* (Hssa) et *senegalensis* (Hsse) produisent respectivement 0,6 et 1,6 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>/mol<sub>Glucose</sub>, à pH 7 et 150 g<sub>NaCl</sub>/L. En accord avec ces résultats, Brown *et al.* (Brown *et al.*, 2011) décrivent *Halanaerobium hydrogeniformans* comme une bactérie fermentaire qui produit de l'hydrogène en conditions salines (70 g<sub>NaCl</sub>/L) et alcaline (pH11).

Ces résultats en cultures pures montrent qu'une production d'hydrogène est réalisable en conditions salines, principalement à pH neutre ou alcalin, contrairement aux conditions de pH usuelles en fermentation pour produire de l'hydrogène.

### **I.3.6. MICROORGANISMES IMPLIQUÉS**

---

#### **I.3.6.1. GENERALITES EN CULTURES MIXTES**

---

Parmi les bactéries hétérotrophes qui peuvent produire de l'hydrogène par fermentation, les micro-organismes les plus efficaces sont les bactéries des genres *Clostridium* (anaérobies

stricts), *Enterobacter* et *Bacillus* (anaérobies facultatifs) (Li *et al.*, 2007). Ils sont capables de produire de l'hydrogène en cultures pures ou mixtes ainsi qu'en co-cultures. Les cultures pures souvent étudiées pour la production d'hydrogène sont anaérobies strictes (*Clostridium*) ou facultatives (*Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Citrobacter*...) (Ntaikou *et al.*, 2010). Les plus fréquemment étudiées sont les bactéries des genres *Clostridium* sp. et *Enterobacter* sp. La production d'hydrogène atteint  $2 \text{ mol}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{Glucose}}$  avec *Clostridium* sp. et  $1 \text{ mol}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{Glucose}}$  (Girbal *et al.*, 1995) avec *Enterobacter* sp. (Ohkawara *et al.*, 1995).

La plupart des études en cultures mixtes utilisent comme inoculum des environnements naturels comme des échantillons de sols ou des boues anaérobies pour produire de l'hydrogène (Ntaikou *et al.*, 2010; Monlau *et al.*, 2013). Les cultures mixtes sont plus faciles à mettre en œuvre dans un procédé car elles ne requièrent pas de conditions stériles et permettent la conversion en hydrogène d'un large panel de substrats (Ntaikou *et al.*, 2010; Monlau *et al.*, 2012, 2013). Cependant, l'utilisation de cultures mixtes implique généralement la présence d'autres microorganismes non producteurs d'hydrogène qui entrent en compétition pour le substrat, comme les bactéries lactiques, ou participent à des réactions de consommation de l'hydrogène produit, les méthanogènes ou les homoacétogènes, entraînant une baisse des rendements apparents de conversion du substrat en hydrogène (Guo *et al.*, 2010; Ntaikou *et al.*, 2010; Monlau *et al.*, 2013). Les *Archaea* méthanogènes peuvent être inhibées en appliquant par exemple un prétraitement thermique sur l'inoculum ou en contrôlant le pH dans le réacteur. Le traitement thermique est basé sur la capacité de certaines bactéries acidogènes, comme *Bacillus* et *Clostridium*, à sporuler à hautes températures alors que les archées méthanogènes, par exemple, seront facilement éliminées avec un choc thermique de 15 minutes à 110°C (Lay *et al.*, 2003; Argun *et al.*, 2008). D'autres méthodes de prétraitement peuvent être utilisées comme l'éradication des microorganismes non sporulants (i.e. les archées méthanogènes) par le pH avec une exposition prolongée à pH acide ou basique alors que les méthanogènes ne peuvent pas survivre dans ces conditions extrêmes (Ntaikou *et al.*, 2010) ou par agent chimique comme le bromoéthanesulfonate, l'acétylène et le chloroforme (Guo *et al.*, 2010; Monlau *et al.*, 2012, 2013).

### **1.3.6.2. CLOSTRIDIUM SP.**

---

Les espèces appartenant au genre *Clostridium* sont particulièrement étudiées pour la production d'hydrogène par voie fermentaire. Les principales espèces étudiées sont *Clostridium butyricum*, *Clostridium acetobutylicum* et *Clostridium beijerinckii* (Guo *et al.*, 2010; Latrille *et al.*, 2011).

En culture pure, les rendements couramment rapportés pour *Clostridium butyricum* sont de l'ordre de 1,8 à 2 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>/mol<sub>Hexose</sub> et peuvent atteindre 3 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>/mol<sub>Glucose</sub> (Jo *et al.*, 2008).

La production d'hydrogène s'effectue principalement par la voie acétate, avec un ratio butyrate/acétate de 0,3 mol<sub>butyrate</sub>/mol<sub>acétate</sub> (Latrille *et al.*, 2011) .

### **1.3.6.3. ENTEROBACTER SP.**

---

En fermentation, *Enterobacter aerogenes* et *Enterobacter cloacae* ont été les deux espèces anaérobies facultatives les plus étudiées (Zhang *et al.*, 2011). Les rendements de conversion retrouvés dans la littérature restent relativement faibles, entre 0,2 et 1 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>/mol<sub>Hexose</sub>. Les sous-produits métaboliques des *Enterobacter* produits lors de la fermentation sombre sont variés (lactate, éthanol...) (Kumar *et al.*, 2001).

### **1.3.6.4. ESCHERICHIA COLI**

---

*Escherichia coli* est le micro-organisme le plus étudié en laboratoire. Son métabolisme fermentaire pour la production d'hydrogène est connu. *Escherichia coli*, et plus généralement les bactéries anaérobies facultatives, ont la particularité de pouvoir détourner une partie de leur métabolisme pour la production d'hydrogène via la voie de synthèse du formate. Alors que les rendements généralement atteints avec des souches sauvages avoisinent 1 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>/mol<sub>Glucose</sub>, Turcot *et al.* (2008) ont obtenu avec cette espèce 2 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>/mol<sub>Glucose</sub>.

## I.4. PRODUCTION DE BIOHYDROGENE PAR ELECTROLYSE MICROBIENNE

### I.4.1. PRINCIPE

Il a été découvert par 2 groupes de chercheurs différents, il y a quelques années, que les micro-organismes pouvaient être utilisés pour produire de l'hydrogène dans un procédé d'électrolyse microbienne basé sur celui des piles à combustibles microbiennes (Liu, Grot, et al., 2005; Rozendal et al., 2006). L'électrolyseur microbien, aujourd'hui appelé en anglais « Microbial Electrolysis Cell » (MEC), a d'abord été appelé « bio-electrochemically assisted microbial reactor » (Liu, Grot, et al., 2005) ou « biocatalyzed electrolysis cell » (Rozendal et al., 2006).

Il est possible d'utiliser des acides organiques tels que ceux présents dans les boues anaérobies pour la génération de courant (Freguia et al., 2010). Dans le compartiment anodique, des micro-organismes forment un biofilm, oxydent la matière organique et transfèrent les électrons issus de cette oxydation via un circuit externe à la cathode, où ils réagissent avec les ions  $H^+$  pour produire de l' $H_2$  (Figure I-8) (Liu, Grot, et al., 2005; Rozendal et al., 2006). Parmi les AGVs, l'acétate et le propionate sont des donneurs d'électrons préférés (Freguia et al., 2010).

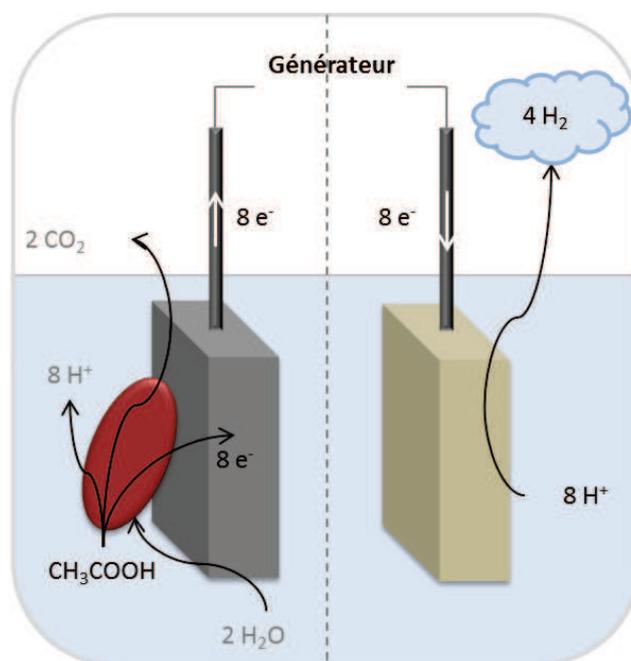


Figure I-8 : Schéma d'un électrolyseur microbien (MEC : "Microbial Electrolysis Cell") avec membrane échangeuse d'ions. Cas de l'oxydation de l'acétate à l'anode.

Avant de s'intéresser aux biofilms électroactifs, une description des biofilms d'une manière plus générale est présentée dans le paragraphe suivant avec la description de leurs caractéristiques, leurs inconvénients et leurs avantages. Puis les biofilms électroactifs seront plus particulièrement détaillés.

## **I.4.2. BIOFILMS**

---

### **I.4.2.1. GENERALITES SUR LES BIOFILMS**

---

Il est aujourd'hui largement reconnu que les bactéries, dans leur milieu naturel, s'associent à des surfaces ou des interfaces, sous la forme d'agrégats multicellulaires, appelés biofilms. Les micro-organismes sessiles se trouvent alors englobés dans une matrice de polymères extracellulaires (EPS). Ces EPS, sécrétés par ces mêmes bactéries, renferment principalement des polysaccharides macromoléculaires mais aussi des protéines, des lipides et des acides nucléiques (Jouenne, 2008). Les biofilms offrent aux micro-organismes qui les composent plusieurs avantages. Principalement, ils les protègent des perturbations extérieures et leur assurent une résistance aux antimicrobiens et aux stress environnementaux. C'est cette conformation qui prodigue aux bactéries une certaine ubiquité et une prédominance dans le monde microbien (Jouenne, 2008).

Les communautés microbiennes attachées à des surfaces ont été observées bien avant d'être étudiées en détail. En 1684, Anthony Van Leeuwenhoek remarque une importante accumulation de micro-organismes sur sa propre plaque dentaire. Ce n'est qu'en 1943 que Zobell décrit, dans la première étude publiée sur les biofilms, les caractéristiques fondamentales de colonies attachées à un support (Zobell, 1943). En 1978, Costerton affirme la prédominance du mode de vie bactérien sous forme de biofilms. Plus tard il fut précisé que 99% des bactéries se développaient en biofilms sur des surfaces très variées telles que les métaux, les plastiques, les tissus humains et végétaux, les surfaces minérales telles que les pierres et le béton. Les types de biofilms sont aussi variés que les microbes qui les constituent. Par exemple, les biofilms formés sur des pierres submergées dans un drainage acide minier sont très différents de ceux qui se forment au contact de l'air à la surface des dents.

Lorsqu'elles forment des biofilms, les bactéries présentent des caractéristiques physiologiques différentes de celles présentées sous forme planctonique. Elles sont notamment capables de mettre en place un système de communication chimique, le « quorum sensing » (ou perception du quota), qui leur permet de coordonner leur comportement en fonction de leur nombre (Jouenne, 2008).

#### I.4.2.1.1. Formation des biofilms

Au sein du biofilm naturel, chaque micro-organisme est soumis aux micro-conditions de son habitat. Les échanges entre bactéries, les migrations de populations et les facteurs externes affectent l'ordre et la structure de l'édifice. Ces derniers exercent une pression de sélection qui façonne l'architecture du biofilm et peut favoriser la formation d'une structure dense et résistante aux attaques externes.

La formation d'un biofilm microbien mature sur une surface solide implique des processus physiques, chimiques et biologiques qui se réalisent en plusieurs étapes (voir Figure I-9).

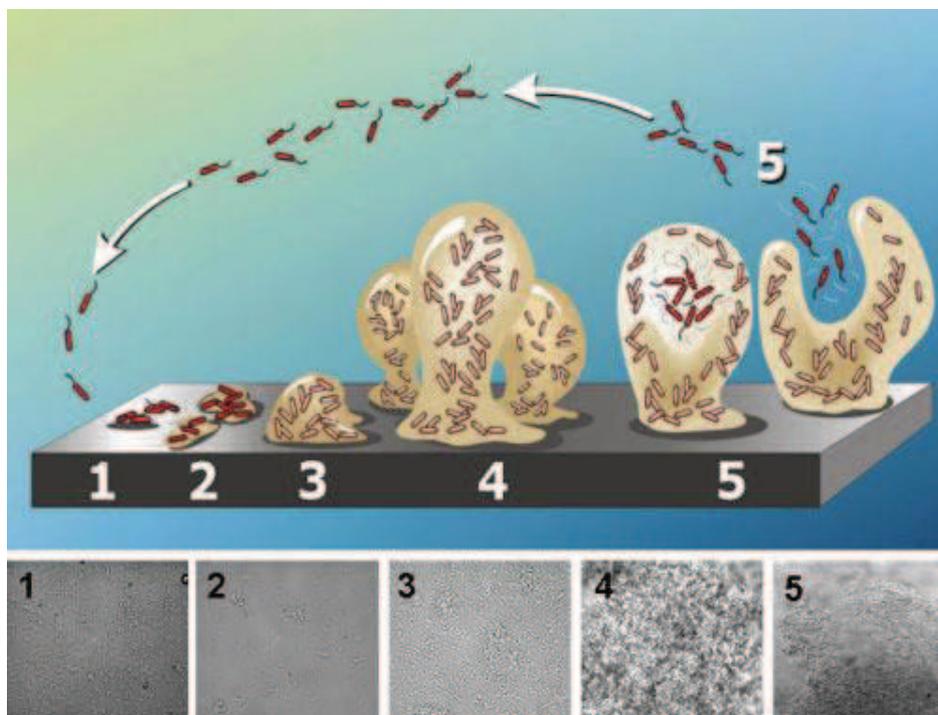


Figure I-9: Schéma des étapes successives de la formation d'un biofilm sur une surface

(d'après Stoodley et al., 2002). Le développement du biofilm se fait en 5 étapes : (1) : Attachement initial des cellules sur la surface, (2) : Adhésion irréversible et production d'EPS, (3) : Formation des micro-colonies, (4) :

*Maturation du biofilm et mise en place de la structure tridimensionnelle du biofilm, (5) : Détachement du biofilm. Les images sur la partie inférieure de la figure présentent des vues au microscope de ces 5 étapes sur un biofilm de Pseudomonas aeruginosa sur une surface en verre.*

#### *I.4.2.1.1.1 Attachement réversible des bactéries*

La formation du biofilm commence par l'adhésion sur la surface de bactéries pionnières disséminées dans le milieu liquide. Dans le milieu naturel, ces micro-organismes proviennent le plus souvent de l'érosion ou de la dissémination de biofilms voisins. L'approche des bactéries vers la surface dépend des propriétés d'écoulement du fluide, des propriétés physico-chimiques de surface (Katsikogianni and Missirlis, 2004), ainsi que de déplacement des bactéries, grâce à différents appendices bactériens tels que les flagelles et cils (O'Toole and Kolter, 1998; Gavin et al., 2003). Ces premières bactéries attachées adhèrent à la surface grâce à une force d'adhésion faible et réversible qui met en jeu des liaisons de Van Der Waals et des forces électrostatiques. A ce stade, les bactéries peuvent se détacher de la surface et revenir à l'état planctonique.

#### *I.4.2.1.1.2 Adhésion irréversible et production d'EPS*

Si ces bactéries restent sur la surface, elles peuvent s'ancrer de manière plus permanente grâce, d'une part, à l'établissement de liaisons hydrophobes entre la bactérie et la surface, et d'autre part, à la sécrétion d'exopolymères. L'adhésion devient alors irréversible.

#### *I.4.2.1.1.3 Formation des micro-colonies*

La multiplication des bactéries irréversiblement adhérees en surface conduit à la formation de colonies qui recouvrent toute ou une partie de la surface du matériau. Certaines espèces, qui ne sont pas capables d'adhérer à la surface, peuvent également s'ancrer dans la matrice ou sur des bactéries déjà attachées.

#### *I.4.2.1.1.4 Maturation du biofilm et mise en place d'une structure tridimensionnelle*

Une croissance exponentielle des bactéries conduit à un épaissement du biofilm jusqu'à la formation d'une structure tridimensionnelle hétérogène (Costerton et al., 1999;

Stoodley et al., 2002). Les canaux qui se forment au sein de cette structure permettent la circulation des nutriments, de l'oxygène et le transport de produits issus du métabolisme des micro-organismes qui composent le biofilm (Stoodley *et al.*, 2002). Lorsque le biofilm est mature, son épaisseur se stabilise et les phénomènes d'arrachement du biofilm viennent compenser sa croissance.

#### I.4.2.1.1.5 *Détachement du biofilm*

Le détachement du biofilm est une étape essentielle du cycle de vie du biofilm. Il permet d'assurer son renouvellement cellulaire. Sa dispersion permet de plus aux microorganismes du biofilm de coloniser d'autres surfaces.

#### I.4.2.1.2. Biofilms négatifs

Depuis plusieurs années, les biofilms présentent un intérêt majeur dans la communauté scientifique. En effet, la prédominance de la forme attachée des micro-organismes dans le milieu naturel, industriel et médical est largement reconnue.

D'un point de vue médical, le développement des vaccins et des antibiotiques a permis de protéger et de guérir les sociétés humaines des graves épidémies pouvant être causées par des pathogènes planctoniques. Cependant, la majeure partie des infections bactériennes chez l'homme met en jeu des biofilms. Ces biofilms peuvent attaquer des surfaces corporelles (dents, yeux, poumons, oreilles, tractus uro-génital) ou peuvent se localiser au niveau de cathéters ou d'implants types prothèses lors d'opération chirurgicales (Costerton et al., 1999). Ces derniers types d'infections sont connus sous le nom d'infections nosocomiales.

Dans l'industrie alimentaire, la biodétérioration des matériaux et la contamination des produits alimentaires causées par le biofouling et la biocorrosion engendrent des surcoûts importants et surtout des problèmes industriels et sanitaires. Dans le secteur agroalimentaire, la mise en place d'un biofilm peut permettre aux bactéries de devenir plus résistantes aux agents extérieurs bactéricides et, par conséquent, de provoquer des contaminations dues à des bactéries pathogènes telles que *Listeria* et *Salmonella* (Maukonen *et al.*, 2003).

Dans d'autres secteurs industriels, les biofilms posent des problèmes sanitaires et fonctionnels importants. Le développement de biofilms dans des canalisations sur de longues périodes engendre un encrassement des surfaces notamment de canalisations d'eau potable, de transport de pétrole ou de gaz et de circuits de refroidissement mais aussi des surfaces de coques de bateau (Flemming, 2002).

#### I.4.2.1.3. Biofilms positifs

Malgré les effets néfastes des biofilms, comme précédemment décrits dans les milieux hospitalier et industriel, leur action peut être bénéfique à l'homme.

En effet, dans les systèmes d'épuration des eaux usées, les biofilms ont été utilisés historiquement avec succès. Notamment dans les systèmes de filtres à sable et à support fixe en général, les bactéries en surface du biofilm dégradent la matière organique des eaux usées avec des performances très supérieures aux procédés à cultures planctoniques, les procédés en biofilm permettant de conserver les microorganismes actifs et d'augmenter ainsi leur concentration (Jouenne, 2008).

Les biofilms peuvent également être utilisés de façon ciblée dans des sols contaminés par des composés toxiques (hydrocarbures, solvants chlorés ...). La population endogène qui constitue le biofilm s'adapte alors au milieu pour consommer ces contaminants comme substrat. Cette capacité d'adaptation et/ou de sélection des micro-organismes vis à vis de polluants organiques pour les transformer en sous-produits inoffensifs est appelée bioremédiation (Jouenne, 2008).

Les biofilms sont également utilisés dans l'industrie agroalimentaire, notamment pour la confection du vinaigre ou de fromages à pâte molle et à croûte lavée de type Reblochon, Munster ... Dans le cas des fromages, les biofilms participent à l'élaboration de la texture et de l'arôme du fromage, mais aussi à sa bioprotection face aux agents pathogènes comme *Listeria monocytogenes* non seulement par un phénomène de compétition pour le substrat mais par la production de molécules inhibitrices, comme suggéré par Mariani *et al.* (2011).

Dans le secteur minier, la biolixiviation est un procédé de plus en plus étendu qui permet d'augmenter les rendements d'extraction des métaux. En effet, la lixiviation permet de récupérer des métaux de forme solide sous leur forme liquide afin de les extraire plus

facilement. Cela permet d'augmenter les rendements d'extraction des métaux contenus dans les déchets miniers et également de rendre extractibles les métaux de ressources minérales. Pour cela, le solide est incorporé à une préparation liquide qui facilite son extraction. Dans le cas de la biolixiviation, c'est une solution bactérienne qui est utilisée où les bactéries puisent leur source d'énergie dans l'oxydation d'éléments chimiques minéraux (Asghari *et al.*, 2013).

Depuis les années 2000, la découverte de microorganismes capables de transférer directement des électrons à une anode au sein d'une pile à combustible microbienne a déclenché un regain d'intérêt pour cette technologie. D'abord utilisés pour produire de l'électricité, ces biofilms sont désormais impliqués dans la production de biocarburants et de molécules d'intérêt (Arends and Verstraete, 2012) (Figure I-10).

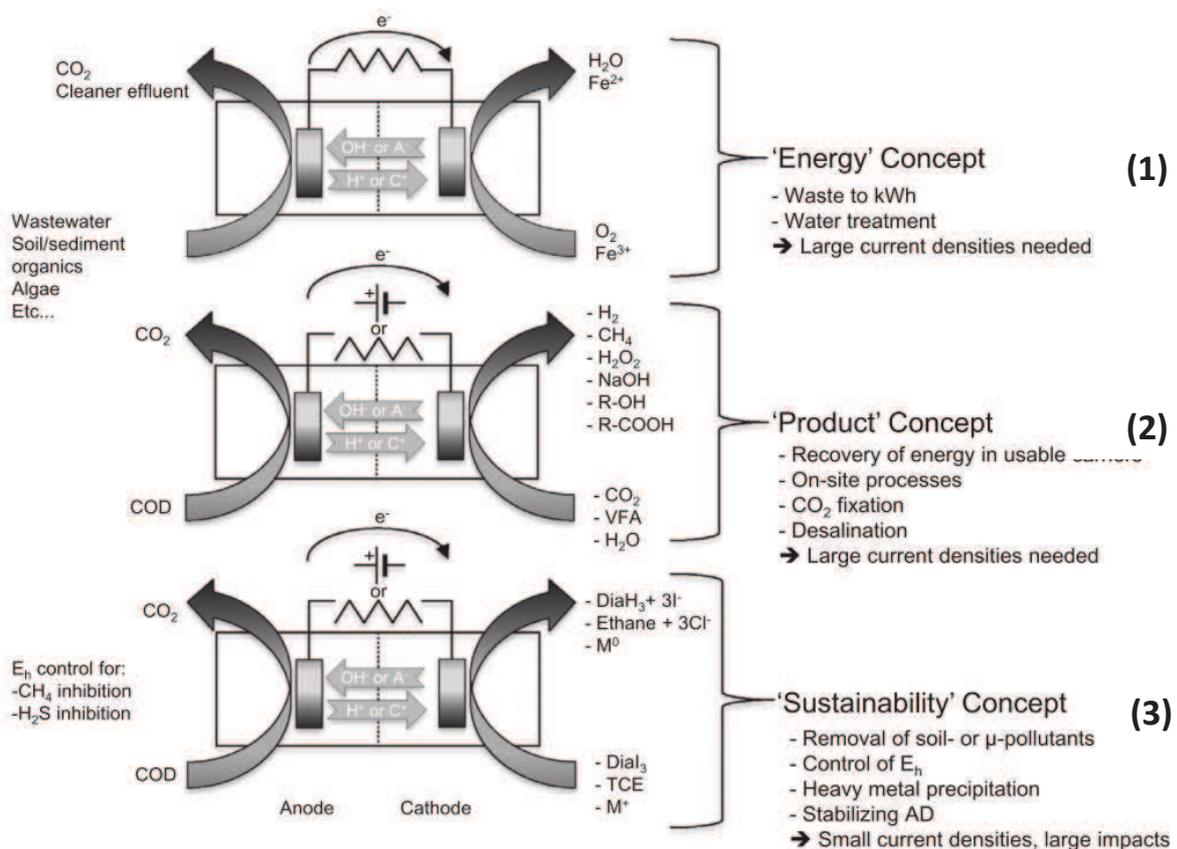


Figure I-10 : Trois concepts d'utilisation de biofilms électroactifs en système bioélectrochimique (BES)

pour (1) la production d'énergie électrique, (2) la production de molécules d'intérêt et de vecteur énergétique, (3) le traitement de pollutions (Arends and Verstraete (2012))

#### **I.4.2.2. BIOFILMS ELECTROACTIFS**

---

##### **I.4.2.2.1. Historique**

Même si la transformation de la matière organique en électricité a toujours présenté un intérêt majeur pour les scientifiques, ce n'est qu'aujourd'hui que des applications pour de petits appareils et sur des installations pilotes de plusieurs kilowatts sont envisagées. C'est Luigi Galvani, en 1790, qui le premier, a constaté que les pattes d'une grenouille se contractaient alors qu'un bref courant les traversait. Le terme de « bioélectricité » est alors apparu. En 1910, Michael Cresse Potter, professeur de botanique à l'université de Durham en Grande Bretagne, découvre que des microorganismes ont la capacité de générer du courant. En 1931, Cohen reprend l'idée de Potter et obtient en connectant en série des biopiles à combustible des tensions générées allant jusqu'à 35V (Cohen, 1931). C'est dans les années 60 que la NASA manifeste un intérêt pour la conversion des déchets organiques en électricité pour ses vols spatiaux. Cependant, face au succès grandissant d'autres techniques alternatives telles que le photovoltaïque pour les applications dans l'espace, le développement des piles à combustible microbiennes a été délaissé par la NASA. Ce n'est que plus tard, pendant la crise du pétrole des années 70 et 80 que l'intérêt pour les piles à combustible microbiennes s'est ravivé. Bennetto *et al.* (1981) ont apporté une contribution remarquable à l'amélioration des piles à combustible microbiennes en montrant l'intérêt de l'ajout de médiateurs (tel que la flavine, la thionine, la résorufine, le méthyl viologène, les acides humiques, le rouge neutre) pour le transfert des électrons au système par les microorganismes. Toutefois, le courant et donc les puissances générés par les piles à combustible microbiennes (PACMs) restaient insuffisants et le coût des médiateurs trop conséquent pour un développement commercial à grande échelle.

Ce n'est que récemment qu'un réel intérêt est né pour les piles à combustible microbiennes et les systèmes bioélectrochimiques en général avec la découverte d'un transfert direct d'électrons d'une bactérie électroactive à l'électrode (Bond and Lovley, 2003; Chaudhuri and Lovley, 2003). Grâce à ce mode de transfert, les systèmes bioélectrochimiques moins coûteux, moins polluants et plus durables pouvaient désormais être développés. Le transfert direct, sans ajout de médiateurs, a également permis d'améliorer la conversion de matière organique en électrons (rendement faradique). La

densité de courant, c'est-à-dire le courant transféré à l'électrode par unité de surface de l'électrode, sert à évaluer l'électroactivité du biofilm. Les densités de courant générées par les biofilms au début de l'étude du transfert direct étaient de l'ordre de l'Ampère par mètre carré au début des années 2000. Puis elles ont connu une croissance exponentielle dans les années suivantes pour atteindre un maximum de 30.8 A/m<sup>2</sup> en 2011 (He et al., 2011) (Figure I-11) et jusqu'à 390 A/m<sup>2</sup> en 2012 (Chen et al., 2012) en utilisant une structure d'électrode bien particulière en couches superposées et ondulées.

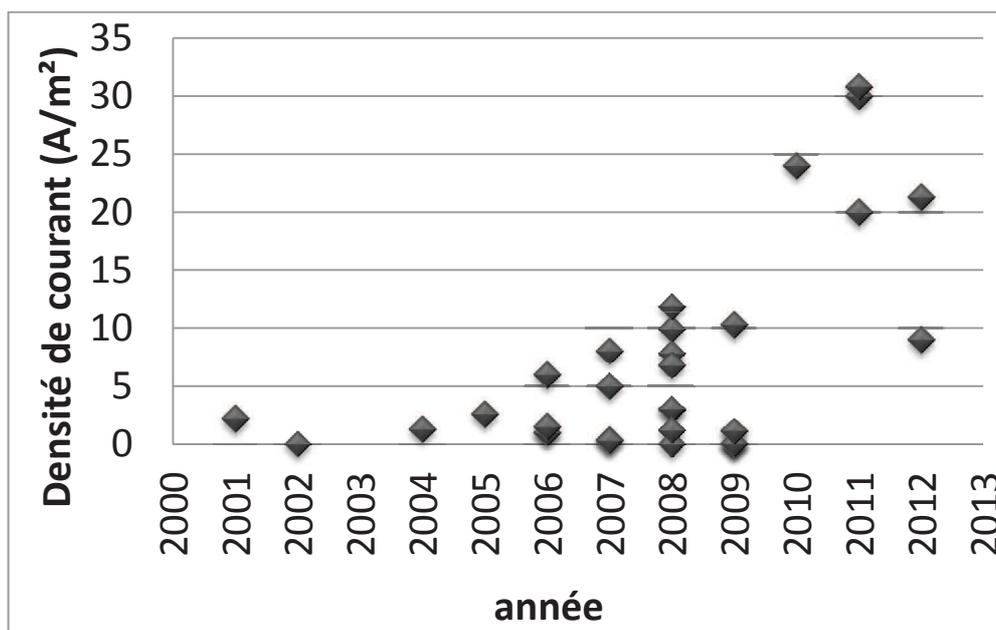


Figure I-11 : Croissance exponentielle des densités de courant produites par des biofilms anodiques dans la littérature depuis 2000.

#### 1.4.2.2.2. Des bactéries qui génèrent de l'électricité

Initialement, les espèces vivantes anaérobies ont évolué en développant diverses méthodes pour réduire des composés supportant leur métabolisme sans utiliser l'oxygène comme accepteur d'électrons. La compréhension des interactions microbe-électrode peut être éclairée par la capacité des microorganismes à évoluer en développant cette propriété de réduction. Les bactéries présentes dans les biofilms électroactifs présentent une faculté à transférer leurs électrons à un accepteur externe insoluble autre que leur accepteur d'électron dans leur environnement naturel. Ces bactéries sont appelées « bactéries électroactives » ou « exoelectrogènes » en anglais : « exo » pour le caractère extracellulaire du transfert et « electrogènes » pour la capacité des bactéries à transférer leur électron à un

composé chimique ou un matériau qui n'est pas l'accepteur d'électron naturel. Les bactéries électroactives se distinguent des bactéries anaérobies en général par leur capacité à transférer directement leurs électrons en dehors de la cellule, permettant leur emploi dans les systèmes bioélectrochimiques.

L'analyse des communautés des piles à combustible microbiennes montre qu'il existe une grande diversité d'espèces, comprenant des organismes à Gram positifs comme à Gram négatifs (Rabaey & Rozendal 2010). Les micro-organismes électroactifs isolés à partir de cultures mixtes dans des PACMs appartiennent à divers groupes microbiens tels que dans quatre des cinq groupes de protéobactéries ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) (Chaudhuri and Lovley, 2003; Holmes, Bond, O'Neil, et al., 2004; Zuo et al., 2008), au sein des firmicutes (Park et al., 2001), acidobactéries (Bond et al., 2002) et actinobactéries (Bond and Lovley, 2005)(Freguia et al., 2009). De nombreuses recherches se sont en particulier intéressées à deux genres de bactéries: *Shewanella* et *Geobacter*.

Les espèces du genre *Shewanella* sont des bactéries à Gram négatif, anaérobies facultatives, que l'on retrouve largement dans les milieux aquatiques et les sédiments. Les espèces de *Shewanella* sont capables d'oxyder une large gamme de sources de carbone telles que le lactate et le glucose (Fredrickson et al., 2008).

*Shewanella* est l'espèce électroactive qui, à ce jour, présente la plus grande diversité en terme de stratégies de respiration sur électrode par transfert direct via des cytochromes-c de la membrane externe ou via des pili-conducteur, mais aussi par transfert indirect via des médiateurs endogènes qu'elle sécrète (tel que la flavine). Ne formant pas de biofilms épais et produisant des densités de courant plus faibles que les autres modèles de bactéries électroactives, *Shewanella* est un modèle pour l'étude des mécanismes de transfert d'électrons. Les faibles densité de courant obtenues avec cette espèce en comparaison aux autres espèces étudiées rendent peu probable une application industrielle avec *Shewanella* (Lovley, 2011).

Les espèces du genre *Geobacter* sont des bactéries à Gram négatif, anaérobies strictes, que l'on retrouve également dans les milieux aquatiques et les sédiments. *Geobacter* peut non seulement utiliser l'acétate, mais aussi l'hydrogène, le lactate et le formate comme sources d'électrons pour la production de courant. Les espèces du genre *Geobacter* ou proches apparentés sont généralement retrouvées dans les biofilms électroactifs de

systèmes bioélectrochimiques. Contrairement à *Shewanella*, *Geobacter* n'utilise qu'un mode de transfert d'électrons vers l'électrode : le transfert direct via des cytochromes de type c ou des pili conducteurs.

L'étude des communautés microbiennes de biofilms électroactifs rapporte cependant une grande diversité d'espèces dans la littérature. De plus, l'explication des mécanismes de transfert extracellulaires d'électrons est en recherche naissante.

#### 1.4.2.2.3. Biofilms électroactifs en cultures mixtes

L'analyse microbiologique des biofilms électroactifs en cultures mixtes rapporte qu'il existe une grande variété de micro-organismes jouant un rôle dans le transfert d'électrons à l'anode (Tableau I-2). Les  $\delta$ -protéobactéries prédominent dans les biofilms électroactifs obtenus à partir de sédiments, et on retrouve plus généralement les  $\alpha$ - $\beta$ - $\gamma$ - et  $\delta$ -protéobactéries dans les biofilms électroactifs, toutes technologies confondues (Logan and Regan, 2006). A titre d'exemple, dans la première pile à combustible microbienne inoculée à partir de ce type de sédiments en laboratoire, Bond *et al.* (2002) ont obtenu  $71,3 \pm 9,6\%$  de  $\delta$ -protéobactéries dont 70% d'une même séquence (ARN 16S) de la famille des *Geobacteraceae*. Le micro-organisme le plus proche phylogénétiquement de cette séquence s'est révélé être *Desulfuromonas acetoxidans*. Il n'y a donc pas un unique micro-organisme émergeant dans l'ensemble des biofilms anodiques étudiés, bien qu'il soit possible d'y retrouver des espèces majoritaires (Harnisch *et al.*, 2011). Ceci peut être dû, d'une part au fait que de nombreuses bactéries présentent des propriétés électroactives, et d'autre part au large champ de conditions expérimentales, d'architectures de systèmes, de type de donneurs et accepteurs d'électrons utilisés. D'autre part, une partie de la communauté microbienne peut présenter un métabolisme alternatif et concurrent comme la digestion anaérobie, qui utilise un accepteur d'électron autre que l'anode. Néanmoins, il est reconnu que les bactéries électroactives anodiques sont majoritairement des bactéries ferri-réductrices, comme les espèces des genres *Shewanella* et *Geobacter* (Logan and Regan, 2006).

Ensuite, deux microorganismes psychrotolérants ont été isolés sur une anode microbienne inoculée avec des sédiments marins et alimentée avec de l'acétate par Holmes, *et al.* (2004). Ces bactéries de la famille des *Geobacteraceae* peuvent se multiplier entre 4 et

30°C avec un optimum de température à 22°C. Elles ont été dénommées *Geopsychrobacter electrodiphilus* A1 et *Geopsychrobacter electrodiphilus* A2 (Holmes et al., 2004).

Par ailleurs, dans les biofilms issus sédiments riches en sulfures ( $S^{2-}$ ), les micro-organismes de la famille *Desulfobulbaceae* prédominent (Holmes et al., 2004). Les sulfures présents dans le milieu peuvent alors s'oxyder de manière abiotique à la surface de l'électrode en soufre élémentaire  $S^0$ . Des études sur *Desulfobulbus propionicus* en culture pure ont montré que ces bactéries oxydent le soufre élémentaire  $S^0$  en sulfate en utilisant l'anode comme accepteur d'électron (voir Figure I-12) (Holmes, et al. 2004; Lovley, 2006a).

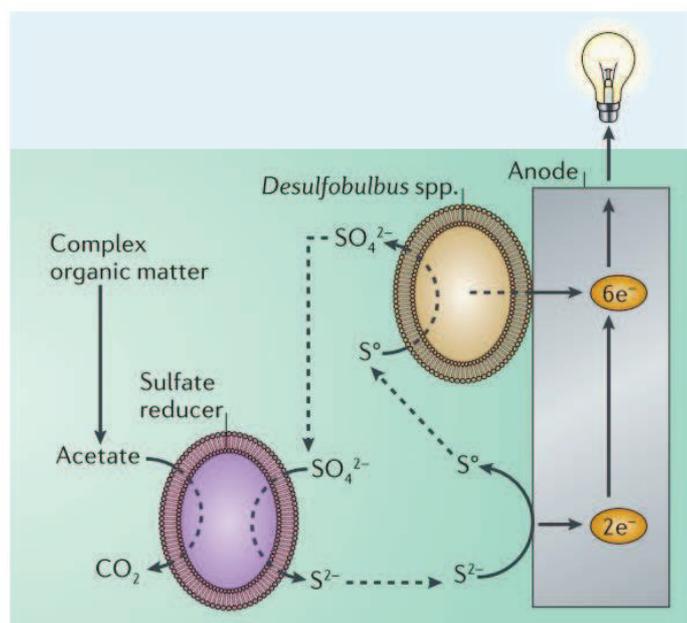


Figure I-12: Mécanisme le plus probable selon lequel les sulfures réagissent avec l'électrode pour former le soufre élémentaire  $S_0$  et les micro-organismes oxydent le  $S_0$  en sulfate en utilisant l'électrode comme accepteur d'électron. (Lovley, 2006b)

De manière générale, l'analyse des gènes de l'ARNr16S des communautés microbiennes qui colonisent la surface des anodes révèle un enrichissement sur l'anode de micro-organismes appartenant à la famille des *Geobacteraceae* (Tableau I-2). Plus particulièrement, ces bactéries prédominent dans les biofilms anodiques obtenus à partir de sédiment marins ou d'eau douce (Holmes et al., 2004). Les *Geobacteraceae* constituent plus de la moitié de la population totale du biofilm électroactif alors qu'elles représentent moins de 5 % des micro-organismes de la communauté de l'inoculum. Dans cette famille des *Geobacteraceae*, le genre *Desulfuromonas*, adapté à des salinité marines, prédomine dans

les environnements marins alors que le genre *Geobacter* domine dans les biofilms de sédiments d'eau douce (Lovley, 2006b).

#### I.4.2.2.4. Biofilms électroactifs en cultures pures

Les bactéries électroactives sont rarement étudiées à partir d'isolats issus de biofilms électroactifs mais plus souvent à partir de l'espèce issue de collection qui leur est génétiquement la plus proche. En culture pure, les micro-organismes peuvent être étudiés en réacteur (MFC ou MEC) mais plus souvent par chronoampérométrie avec une anode à potentiel imposé pour travailler en conditions contrôlées. Les bactéries étudiées en culture pure sont ainsi inoculées dans ces réacteurs dans un milieu ne contenant pas d'accepteur final d'électrons dissous afin de favoriser leur attachement sur l'électrode. De plus, l'acétate est très fréquemment utilisé comme substrat en culture pure (Tableau I-3).

Les performances obtenues en cultures pures sont, de manière générale, moins bonnes que celles obtenues en cultures mixtes. Ceci suggère que l'efficacité du biofilm électroactif n'est pas seulement due à la capacité des bactéries électroactives à transférer des électrons à l'électrode, mais aussi aux interactions inter-espèces existantes au sein du biofilm. Notamment, il peut exister des interactions syntrophiques où certaines bactéries peuvent produire des molécules qui constituent des transporteurs d'électrons pour assurer chez les bactéries électroactives un transfert d'électrons indirect (Kiely, Regan, et al., 2011).

Tableau I-2 : Synthèse bibliographique des études en cultures mixtes de biofilms électroactifs.

Espèce(s) majoritaire(s)	Référence	type de système	Substrat	Densité de courant (A/m <sup>2</sup> )	pH	T(°C)
<i>Geobacter sulfurreducens</i>	(Jung and Regan, 2007)	MFC	acétate	0,349	7	30
<i>Geobacter sulfurreducens</i>	(Jung and Regan, 2007)	MFC	lactate	0,364	7	30
<i>Geobacter sulfurreducens</i>	(Jung and Regan, 2007)	MFC	glucose	0,292	7	30
<i>Geobacter sulfurreducens, Thauera aromatica</i>	(Chae et al., 2009)	MFC	acétate	0,025	7	28
<i>Pelobacter propionicus</i>	(Kiely et al., 2011)	MFC	acétate			
<i>Geobacter sulfurreducens</i>	(Chae et al., 2008)	MEC	acétate	2,91	7	26-28°C
<i>Geobacter sulfurreducens, Pelobacter propionicus</i>	(Kiely et al., 2011)	MEC	acétate			
<i>Geobacter sulfurreducens, Pelobacter propionicus</i>	(Kiely et al., 2011)	MFC	Ethanol			
<i>Azoarcus sp., Desulfuromonas sp.</i>	(Kim et al., 2007)	MFC	Ethanol			
<i>Pelobacter propionicus, Desulfuromonas sp.</i>	(Kiely et al., 2011)	MFC	Lactate			
<i>Bacillus sp.</i>	(Chae et al., 2009)	MFC	Propionate	0,024	7	28
<i>Dechloromonas sp., Geobacter sp.</i>	(Chae et al., 2009)	MFC	Butyrate	0,023	7	28
<i>Paracoccus sp., Geobacter sp.</i>	(Kiely et al., 2011)	MFC	Formate			
<i>Geobacter sp.</i>	(Ha et al., 2008)	MFC	Formate			
<i>Geobacter sulfurreducens, Pelobacter propionicus</i>	(Kiely et al., 2011)	MFC	Succinate			
<i>Geobacter sulfurreducens</i>	(Chae et al., 2009)	MFC	Glucose	0,039	7	28
<i>Clostridium sp.</i>	(Ishii et al., 2008)	MFC	Cellulose			
<i>Geoalkalibacter sp.</i>	(Miceli et al., 2012)	demi cellule	acétate	8,92		
<i>Geoalkalibacter sp.</i>	(Miceli et al., 2012)	demi cellule	acétate	4,23		

Espèce(s) majoritaire(s)	Référence	type de système	Substrat	Densité de courant (A/m <sup>2</sup> )	pH	T(°C)
<i>Geobacter sulfurreducens</i>	(Milliken and May, 2007)	demi cellule		8		
<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	(Xing et al., 2008)	demi cellule		9,9		
<i>Acidiphilium</i> sp.	(Malki et al., 2006)	demi cellule		3		
<i>Escherichia coli</i>	(Zhang et al., 2006)	demi cellule		1		
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(Zhang et al., 2008)	MEC		1,2		
<i>Clostridium butyricum</i>	(Park et al., 2001)	MFC	amidon	2,2	7	37
<i>Desulfuromonas acetoxidans</i>	(Bond et al., 2002)	MFC	-	0,005	-	-
-	(Min and Logan, 2004)	sédiments				
-	(Liu et al., 2005)	MFC		1,3		
-	(Liu et al., 2005)	MFC	acétate	2,6	7	20
-	(Aelterman et al., 2006)	MFC	effluents de pommes de terre	6	7	22
-	(Zuo et al., 2006)	MFC	hydrolysats de canne de maïs	1,5	7	-
-	(Catal et al., 2008)	MFC	acide gluconique	11,8	-	30
-	(Catal et al., 2008)	MFC	xylose	7,8	-	30
-	(Catal et al., 2008)	MFC	glucose	6,8	-	30
<i>Geobacter sulfurreducens</i>	(Torres et al., 2009)	MEC	acétate	10,3	7,5	31
-	(Zhao et al., 2010)	MFC	lactate	24	6,8	30
-	(Chen et al., 2011)	MFC	acétate	30	6,8	35
-	(Chen et al., 2011)	MFC	acétate	20	6,8	25
-	(He et al., 2011)	MFC	acétate	30,8	7	35

Tableau I-3 : Synthèse bibliographique des études en culture pure de bactéries identifiées dans des biofilms électroactifs.

Espèce	Référence	type de système	Substrat	Densité de courant (A/m <sup>2</sup> )	pH	T (°C)
<i>Geopsychrobacter electrodiphilus</i> A2	(Holmes et al., 2004a)	demi cellule	fumarate	1,21		22
<i>Geopsychrobacter electrodiphilus</i> A1	(Holmes et al., 2004a)	demi cellule	fumarate	0,089		22
<i>Geopsychrobacter electrodiphilus</i> A1	(Holmes et al., 2004a)	demi-cellule	acétate	0,037		22
<i>Clostridium beijerinckii</i>	(Niessen et al., 2004)	demi-cellule	glucose	13,00		36
<i>Clostridium butyricum</i>	(Niessen et al., 2004)	demi-cellule	amidon	13,00		36
<i>Escherichia coli</i> K12	(Schröder et al., 2003)	demi-cellule	glucose	11,20	nc	37
<i>Geobacter sulfurreducens</i> PCA	(Dumas et al., 2008a)	demi-cellule	acétate	8,40	6,8	30
<i>Geoalkalibacter ferrihydriticus</i>	(Badalamenti et al., 2013)	demi-cellule	acétate	8,30	9,3	40
<i>Geobacter sulfurreducens</i> PCA	(Dumas et al., 2008a)	demi-cellule	acétate	8,00	6,8	30
<i>Thermincola ferriacetica</i>	(Parameswaran et al., 2013)	demi-cellule		8,00		60
<i>Geopsychrobacter electrodiphilus</i> A2	(Holmes et al., 2004a)	demi-cellule	malate	6,60		
<i>Geobacter sulfurreducens</i> PCA	(Marsili et al., 2008)	demi-cellule	acétate	5,00	6,8	30
<i>Geoalkalibacter subterraneus</i> Red1	(Badalamenti et al., 2013)	demi-cellule	acétate	3,30	7	40
<i>Geoalkalibacter ferrihydriticus</i> DSM 17813	(Badalamenti et al., 2013)	demi-cellule	acétate	3,30	9.3	40
<i>Geobacter sulfurreducens</i>	(Reguera et al., 2006)	demi-cellule	acétate	1,96		
<i>Geopsychrobacter electrodiphilus</i>	(Holmes et al., 2004a)	demi-cellule	fumarate de sodium	1,21		
<i>Klebsiella pneumoniae</i> L17	(Zhang et al., 2008)	MFC	glucose	1,20	7	30
<i>Geobacter sulfurreducens</i>	(Bond and Lovley, 2003)	demi-cellule	acétate	1,14		
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> DX-1	(Xing et al., 2008)	MFC	acétate	0,81	7	23
<i>Haloferax volcani</i> DS70	(Abrevaya et al., 2011)	MFC	glucose	0,50	7	37
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047	(Rezaei et al., 2009)	MFC	glycérol	0,49		
<i>Desulfitobacterium hafniense</i> DCB2	(Milliken and May, 2007)	MFC	fumarate de sodium	0,46	nc	nc

Espèce	Référence	type de système	Substrat	Densité de courant (A/m <sup>2</sup> )	pH	T (°C)
<b><i>Thermincola ferriacetica</i> Z-0001</b>	(Marshall and May, 2009)	MFC	acétate	0,40	7	60
<i>Geobacter bremensis</i>	(Nercessian et al., 2012)	demi-cellule		0,30		
<i>Geobacter metalireducens</i>	(Bond et al., 2002)	demi-cellule	benzoate	0,27		
<b><i>Pseudomonas aeruginosa</i> MTCC 17702</b>	(Raghavulu et al., 2011)	MFC	milieu de culture LB	0,26	6	37
<b><i>Natrialba magadii</i> ATCC 43099</b>	(Abrevaya et al., 2011)	MFC		0,22		
<b><i>Comamonas denitrificans</i> DX-4</b>	(Xing et al., 2010)	MFC		0,20		
<b><i>Desulfuromonas acetoxidans</i></b>	(Bond et al., 2002)	demi-cellule	acétate	0,17	nc	nc
<b><i>Saccharomyces cerevisiae</i></b>	(Raghavulu et al., 2011)	MFC	glucose	0,16	6	28
<b><i>Escherichia coli</i></b>	(Raghavulu et al., 2011)	MFC	milieu de culture LB	0,15	6	37
<b><i>Escherichia coli</i> MTCC 10436</b>	(Raghavulu et al., 2011)	MFC	milieu de culture LB	0,15	7	37
<b><i>Shewanella putrefaciens</i> NCTC 10695</b>	(Carmona-Martínez et al., 2012)	demi-cellule	lactate de sodium	0,12	7	nc
<b><i>Shewanella oneidensis</i> MR1</b>	(Carmona-Martínez et al., 2011)	demi-cellule	lactate de sodium	0,08	7	nc
<b><i>Klebsiella</i> sp. ME17</b>	(Xia et al., 2010)	MFC		0,06		
<b><i>Geothrix fermentans</i> ATCC 700665</b>	(Bond and Lovley, 2005)	demi-cellule	propionate	0,05	nc	nc
<b><i>Geothrix fermentans</i></b>	(Bond and Lovley, 2005)	demi-cellule	lactate	0,04	nc	nc
<b><i>Geothrix fermentans</i></b>	(Bond and Lovley, 2005)	demi-cellule	succinate	0,02	nc	nc
<b><i>Geothrix fermentans</i></b>	(Bond and Lovley, 2005)	demi-cellule	malate	0,02	nc	nc
<b><i>Geothrix fermentans</i></b>	(Bond and Lovley, 2005)	demi-cellule	acétate	0,01	nc	nc

### **I.4.2.3. MECANISMES DE TRANSFERT D'ÉLECTRONS**

---

Les bactéries électroactives catalysent le transfert d'électrons entre le donneur d'électron et l'électrode. Dans la littérature, ces biocatalyseurs sont également appelés « anodophiles », « exoelectrogens », « electrogenic », « anode respiring bacteria » et « electrochemically active bacteria ». Il est aujourd'hui reconnu que le potentiel appliqué à l'anode n'est pas le seul paramètre qui détermine l'efficacité du transfert d'électrons. D'autres facteurs entrent en jeu dans ce processus tels que la nature du substrat ou le pH.

Ces organismes libèrent les électrons du substrat organique en l'oxydant en intermédiaires métaboliques puis en CO<sub>2</sub>. Les électrons libérés sont capturés par des co-enzymes tels que le nicotinamide adénine dinucléotide (NAD<sup>+</sup>), le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADP), la flavine adénine dinucléotide (FAD) et la ferrédoxine (Fd-Fe<sup>3+</sup>), qui sont respectivement réduits en NADH, NADPH, FADH<sub>2</sub>, Fd-Fe<sup>2+</sup>. Ces électrons sont transmis de porteur en porteur jusqu'à l'accepteur final d'électrons. En l'absence d'oxygène, c'est à l'anode que les micro-organismes cèdent leurs électrons.

Comme indiqué précédemment, les bactéries électroactives transfèrent leurs électrons soit au travers d'une structure immobile (transfert direct) soit grâce à des composés mobiles (transfert indirect via des médiateurs) (Figure I-13).

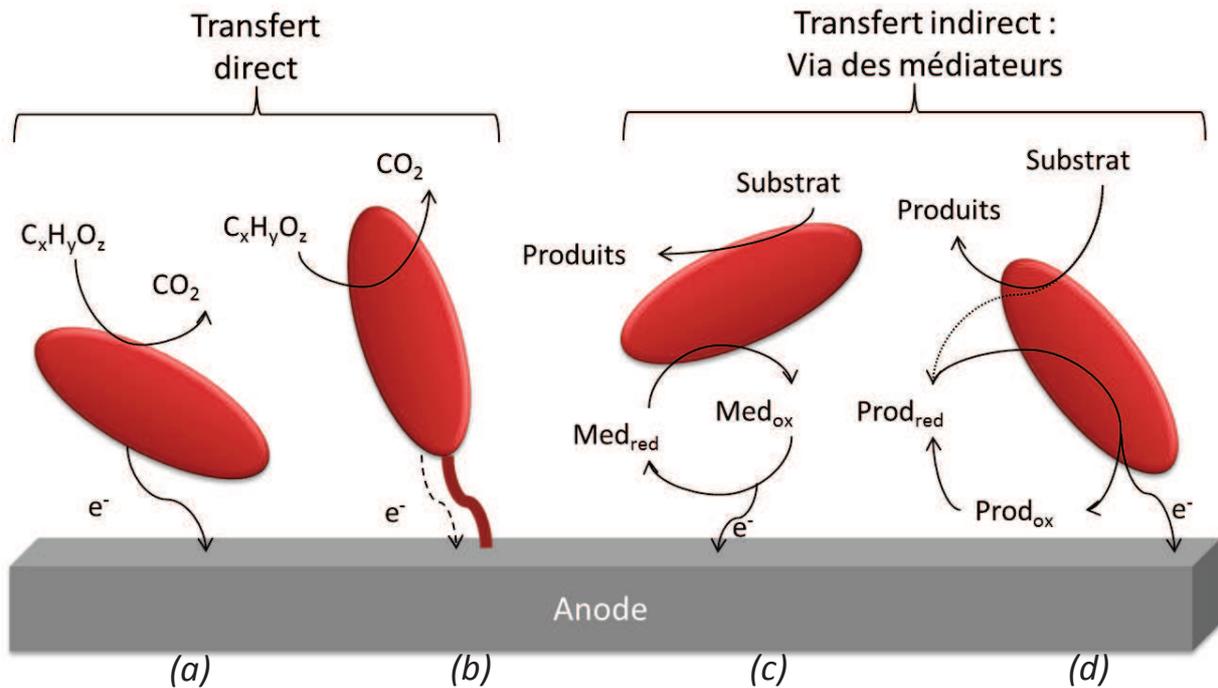


Figure I-13 : Mécanismes de transfert d'électrons aux électrodes.

(a) transfert direct par les micro-organismes en contact avec la surface de l'électrode au travers de protéines rédox, telles que les cytochromes de type c associés à la membrane externe de la cellule ou la matrice extracellulaire. (b) Transfert direct d'électrons de la cellule à l'électrode via des pili conducteurs. (c) Transfert indirect via la réduction d'oxydes solubles du milieu. Ces composés sont réduits au niveau de la membrane externe des cellules, puis ré-oxydé en surface de l'électrode à laquelle les électrons issus de l'oxydation sont transférés. (d) Cas du transfert via des médiateurs produit par la molécule. (d'après Lovley (2012))

#### 1.4.2.3.1. Transfert indirect par l'intermédiaire de médiateurs

Les médiateurs correspondent à des sortes de navettes chimiques pour les électrons entre la membrane cellulaire et l'anode. Ils peuvent s'oxyder et se réduire successivement, traverser la membrane cellulaire sous leur forme oxydée, accepter des électrons d'un ou de plusieurs porteurs à l'intérieur de la cellule, puis sortir de cette dernière sous forme réduite pour transférer des électrons à l'anode en se ré-oxydant (Shukla et al., 2004). Le potentiel de réduction du médiateur doit donc être supérieur à celui du porteur intracellulaire.

Des médiateurs artificiels peuvent être utilisés pour des micro-organismes qui sont incapables de produire eux même leur propre médiateur comme *Escherichia coli* et certaines espèces des genres *Pseudomonas*, *Proteus* ou encore *Bacillus*. Ces médiateurs peuvent être la thionine, la résorufine, le méthyl viologène, les acides humiques, le rouge neutre, le 2,6-dichlorophénol indophénol, et la 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone (DR Lovley 2006).

Dans certain cas, les micro-organismes produisent eux-mêmes leurs propres médiateurs pour le transfert cellulaire des électrons. C'est le cas d'*Enterococcus gallinarum* et de *Pseudomonas aeruginosa* qui produisent respectivement de l'entérocyanine 012 et de la pyocyanine (Rabaey *et al.* 2004).

Cependant, le recours à la production de médiateurs associée à leur renouvellement représente un coût énergétique non négligeable pour la cellule.

#### 1.4.2.3.2. Transfert direct

Certains microorganismes doivent établir un contact direct avec les anodes pour réaliser le transfert d'électron. Pour pouvoir réaliser le transfert direct des électrons, les bactéries doivent être capables de passer d'un accepteur ou d'un donneur d'électron soluble (oxygène, fumarate ...) à un accepteur ou donneur insoluble (DR Bond *et al.* 2002). Il a été largement démontré que, pour les espèces de *Geobacter*, le transfert d'électrons aux oxydes de fer Fe(III) requiert la présence de plusieurs cytochromes-c et protéines de la membrane externe. Bond and Lovley (2003) ont rapporté des productions d'électricité par *Geobacter sulfurreducens* attachés à une électrode, avec un taux de conversion supérieurs à d'autres espèces malgré une densité de cellules plus élevée et/ou la mise en jeu de médiateurs avec ces derniers (Bond and Lovley, 2003).

L'expression de ce mode de transfert d'électrons attribuerait un caractère électroactif aux organismes suivants : *Geobacter sulfurreducens* (Bond and Lovley, 2003), *Geobacter metallireducens*, *Rhodospirillum rubrum* (Chaudhuri and Lovley, 2003), *Desulfuromonas acetoxidans* (Bond *et al.*, 2002), *Desulfobulbus propionicus* (Holmes, Bond, and Lovley, 2004), *Enterococcus gallinarum* (Kim, Hyun, *et al.*, 2005), *Thermincola ferriacetica* (Parameswaran *et al.*, 2013). Cependant, le transfert direct d'électrons de la bactérie à l'électrode est controversé pour certaines bactéries où il semble que le courant obtenu soit une combinaison entre un transfert direct entre la bactérie et l'électrode et un transfert indirect via des médiateurs sécrétés par la bactérie, notamment chez *Aeromonas hydrophila* (Pham *et al.*, 2003), *Clostridium butyricum* (Park *et al.*, 2001), *Shewanella putrefaciens* (Kim, Kim, *et al.*, 1999).

Ce mode de transfert direct au travers de la membrane cytoplasmique induit un contact direct entre la cellule et l'électrode. Cela suppose que seuls les microorganismes de la

première couche du biofilm en contact avec l'électrode sont réellement électroactifs. Cependant, il a récemment été montré que le transfert direct des électrons puisse également se faire par le biais de pili (Reguera *et al.*, 2005; Lovley, 2006b). Ces derniers permettent d'assurer un contact direct sur des épaisseurs plus importantes de biofilm et d'atténuer les limites électrochimiques liées aux propriétés isolantes de la couche lipidique des membranes cellulaires (Lovley, 2006b). Il a été démontré que *Geobacter sulfurreducens* et *Shewanella oneidensis* étaient capables de réduire des oxydes de fer en utilisant des pili conducteurs connectés au cytochromes qui permettent le transfert d'électrons vers l'extérieur de la cellule bactérienne (Gorby *et al.*, 2006; Logan and Regan, 2006). Il a été démontré qu'après la formation des pili, le flux d'électrons de *Geobacter sulfurreducens* en culture pure était multiplié par 10 (Reguera *et al.*, 2005).

La possibilité du transfert inter-espèce a également été mise en évidence. Une étude en co-culture de Ishii *et al.* (2005) a notamment montré la production d'appendices épais et conducteurs semblables à des flagelles entre *Pelotomaculum thermopropionicum* et *Methanothermobacter thermautotrophicus*. L'analyse morphologique de ces filaments produits par *Pelotomaculum thermopropionicum* montre une homologie avec les pili formés par *Shewanella oneidensis* MR-1. Une observation des filaments de *Shewanella oneidensis* MR-1 au microscope à effet tunnel (Scanning Tunneling Microscopy ou STM en anglais) a permis de montrer que ces appendices sont conducteurs et peuvent être considérés comme des pili conducteurs (Gorby *et al.*, 2006) (Figure I-14).

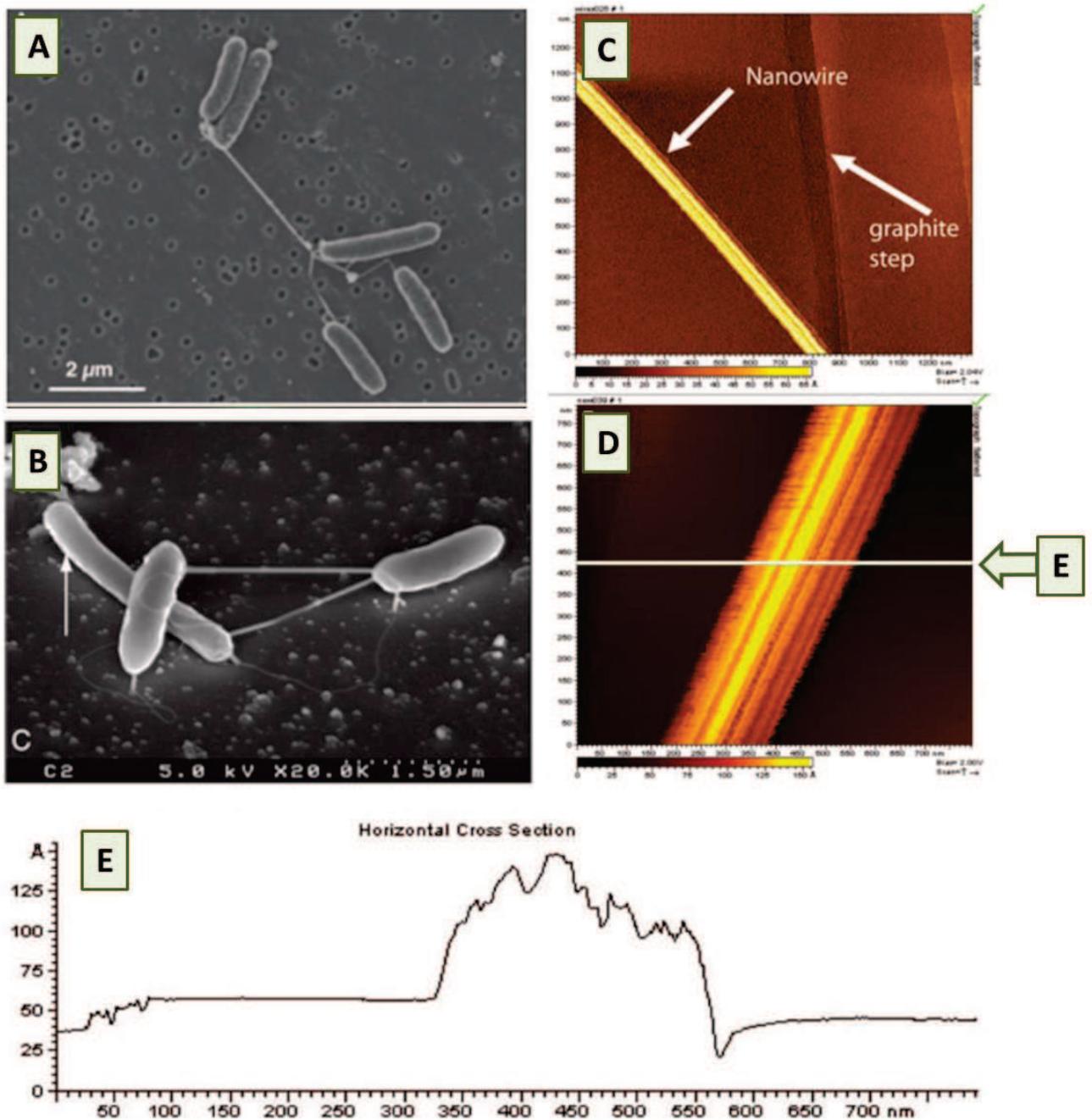


Figure I-14 : Images SEM et STM des pili conducteurs produits par des microorganismes électroactifs.

(A) Image SEM (Scanning electron microscope ou microscope à balayage électronique) de *Schewanella oneidensis* MR-1. (B) Images SEM d'une co-culture de *Pelotomaculum thermipropionicum* et *Methanothermobacter thermoautotrophicus* montrant la présence de pili conducteurs inter-espèces. (C) Images STM (scanning tunneling microscope ou microscope à effet tunnel) de pili conducteurs isolés de *Schewanella oneidensis* sur une surface de graphite. (D) Grossissement de (C). (E) Structure de la coupe du pili selon l'axe des abscisses. (d'après Gorby et al. (2006))

### I.4.2.3.1. Respiration sur électrode

Le mode de transfert le plus courant dans la production de courant par les bactéries électroactives reste le transfert direct d'électrons par les cytochromes de type c (CTCs). Les CTCs sont des protéines qui contiennent des hèmes, très répandues chez les bactéries et les archées.

*Shewanella oneidensis* MR-1 possède 42 CTCs dont 80% localisés sur sa membrane externe (Lower *et al.*, 2005). CymA est un CTC ancré dans la membrane interne et exposé au périplasma (Figure I-15 III) qui participe à beaucoup de processus de respiration anaérobie. Le complexe MtrABC, quant à lui, joue un rôle clef dans le transfert d'électrons de l'électrode à la cellule. Les trois protéines qui composent ce système sont associées et dépendent fonctionnellement l'une de l'autre. MtrC et OmcA sont deux protéines lipidiques qui sont considérées comme les dernières réductases extracellulaires chez *Shewanella* MR-1. Bien qu'OmcA soit capable de transférer des électrons à de nombreux accepteurs solides *in vitro*, MtrC serait plus impliquée dans les transferts extracellulaires d'électrons de *Shewanella*.

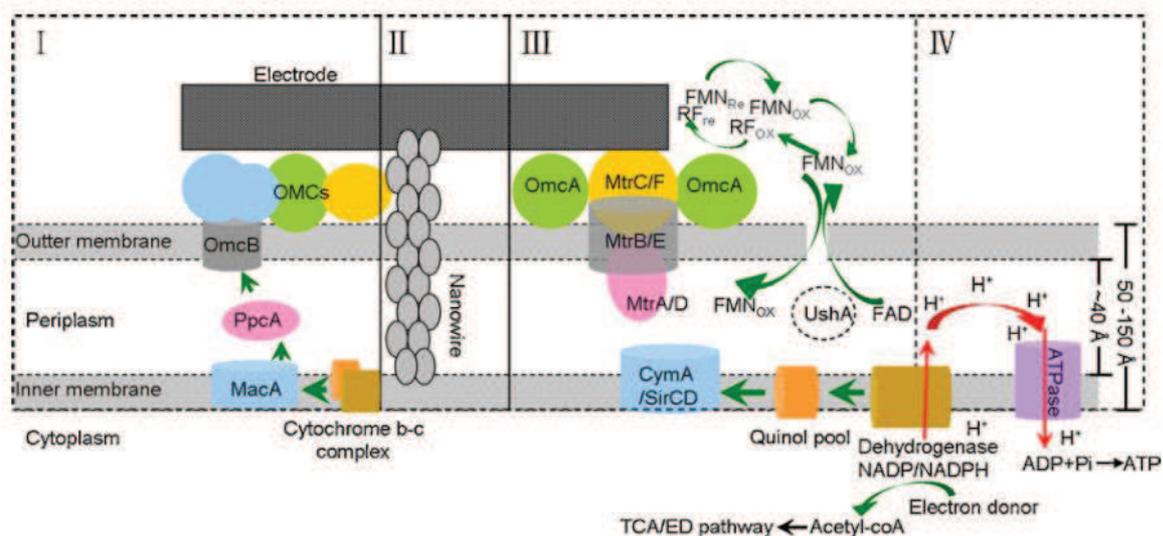


Figure I-15 : Modèles de transferts extracellulaires d'électrons par *Geobacter* et *Shewanella*

(Yang *et al.*, 2012). (I) Le transfert d'électrons par les cytochromes C de la membrane externe chez *Geobacter*, (II) Transfert d'électrons par des pili conducteurs, (III) Transfert d'électrons par *Shewanella* par le biais de flavines et cytochromes de types C, (IV) Couplage de la respiration sur anode et de la production d'énergie.

Une comparaison génomique de six espèces de *Geobacter* a montré une moyenne de 79 cytochromes de type C pour chaque génome dont 14 % étaient communs à tous ces génomes étudiés (Butler *et al.*, 2010). Il a été proposé que la protéine membranaire MacA transmette des électrons depuis la membrane interne de la cellule au transporteur PpcA du périplasme, qui les transmet à son tour au cytochrome de type c de la membrane externe, en contact direct avec l'anode (Lovley, 2008) (Figure I-15 I).

La conservation de l'énergie de la cellule résulte du pompage des protons associé au transport des électrons dans la membrane interne (Figure I-15 IV).

#### **I.4.2.4. CARACTERISATION THERMODYNAMIQUE ET ELECTROCHIMIQUE DES MEC**

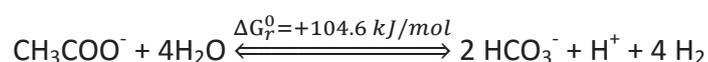
##### **I.4.2.4.1. Détermination thermodynamique de la tension à appliquer**

Pour qu'une réaction chimique ait lieu, il faut qu'elle soit thermodynamiquement favorable. Ceci est déterminé avec l'enthalpie libre (ou énergie de Gibbs) de la réaction ( $\Delta G_r$ ) qui représente la variation des forces, hors pression, s'exerçant sur le système. L'énergie de Gibbs de la réaction doit être négative pour que la réaction se fasse spontanément. L'enthalpie libre de la réaction se calcule comme suit :

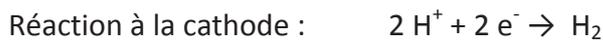
$$\Delta G_r = \Delta G_r^0 + RT \ln(\Pi)$$

- Avec :
- $\Delta G_r$  (J), l'enthalpie libre de la réaction, dans le sens de la réduction
  - $\Delta G_r^0$  (J), l'enthalpie libre de la réaction dans les conditions standards (T=298.15 K, P=1 bar, [espèces]=1M)
  - R (8.314 J.mol<sup>-1</sup>.K<sup>-1</sup>), la constante des gaz parfaits
  - T (K), la température
  - $\Pi$ , le rapport entre les activités des produits (oxydants) et des réactifs (réducteurs).

Par exemple, pour la réaction d'oxydation de l'acétate en bicarbonate, dans les conditions standards (T=25°C, P=1 bar, pH=7), l'enthalpie libre de la réaction est :



Cette équation résulte des demi-équations d'oxydation et de réduction respectivement à l'anode et à la cathode suivantes :



L'enthalpie standard de la réaction étant positive, une source d'énergie extérieure doit être apportée au système. Dans une cellule d'électrolyse microbienne, la réaction peut se faire grâce à l'apport d'énergie électrique. Pour que l'électrolyse microbienne se produise, il faut apporter une différence de potentiel supérieure à  $\Delta G_r^0/nF$  où  $n$  est le nombre d'électrons transférés dans la réaction ( $n=8$  ici) et  $F=96485$  C/mole (électrons) est la constante de Faraday. Cette valeur correspond à la tension d'équilibre (c'est-à-dire la différence de potentiels à l'équilibre), qui peut être calculée comme suit :

$$E_{eq} = -\frac{\Delta G_r^0}{nF} = -\frac{104.6 \times 10^3}{8 \times 96485} = -0.14 \text{ V}$$

#### 1.4.2.4.2. Détermination électrochimique de la tension à appliquer

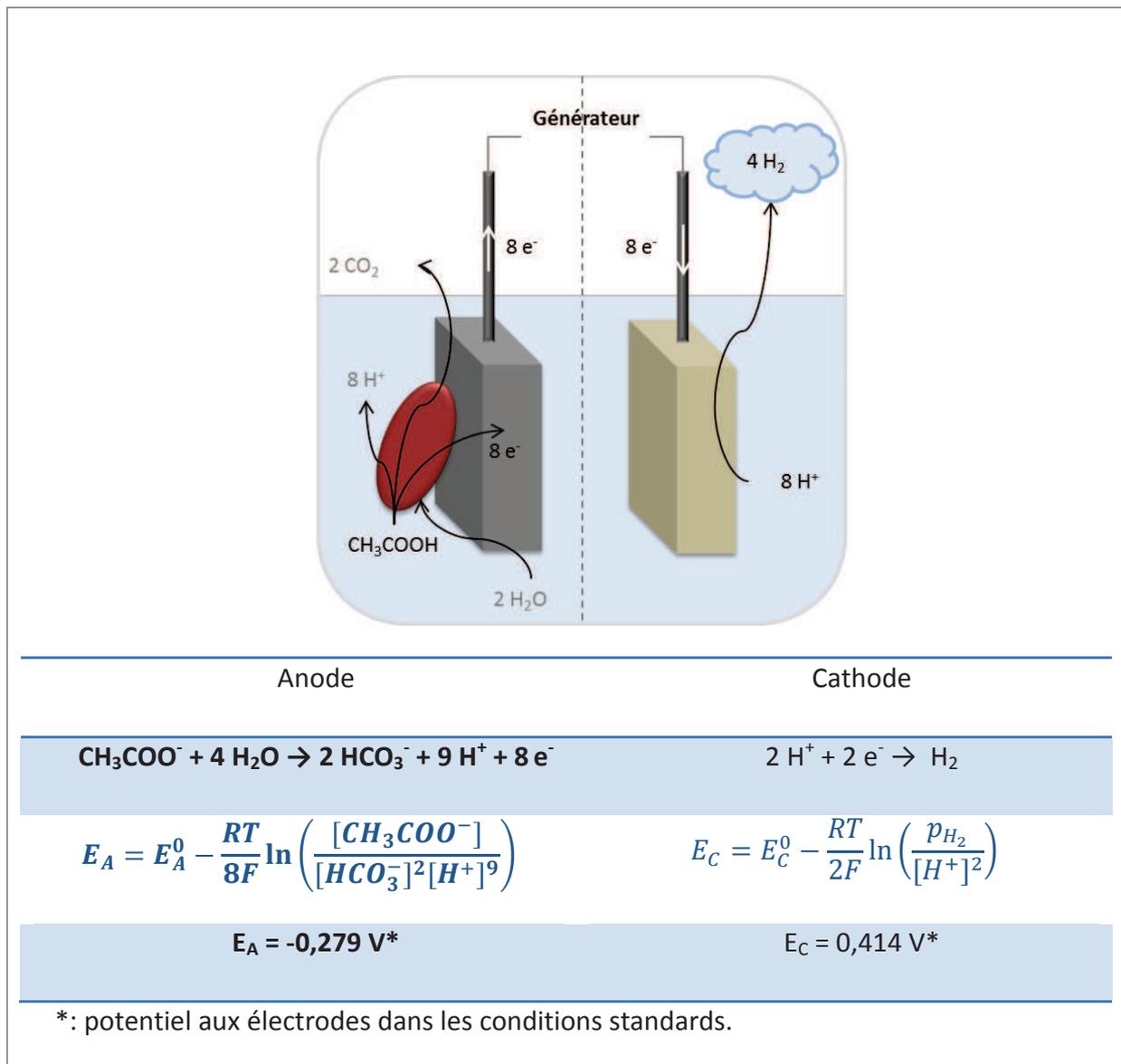
La valeur du potentiel à l'équilibre de l'équation globale d'oxydation de l'acétate en bicarbonate se déduit des potentiels à l'équilibre des demi-équations d'oxydation et de réduction, respectivement à l'anode et à la cathode :  $E_{eq} = E_C - E_A$ . Le potentiel à l'équilibre peut alors être calculé en utilisant les tables de potentiels standards des demi-équations d'oxydation et de réduction et en appliquant l'équation de Nernst qui définit pour un couple oxydant-réducteur de demi-équation :  $x \text{Ox} + n\text{e}^- = y \text{Red}$ , le potentiel à l'équilibre :

$$E = E^0 - \frac{RT}{2F} \ln \left( \frac{a_{\text{Ox}}^x}{a_{\text{Red}}^y} \right)$$

- Avec :
- $E$  (V), potentiel à l'équilibre du couple redox
  - $E^0$  (V), potentiel standard du couple redox mis en jeu dans les conditions standards ( $T=298.15$  K,  $P=1$  bar, [espèces]=1M)
  - $R$  (8.314 J.mol<sup>-1</sup>.K<sup>-1</sup>), la constante des gaz parfaits
  - $T$  (K), la température
  - $F=96485$  (C/mole (électrons)), la constante de Faraday
  - $a_{\text{Ox}}$  et  $a_{\text{Red}}$ , les activités chimiques des oxydants et réducteurs de la demi-équation d'oxydo-réduction

Le potentiel à l'anode et celui à la cathode se déduisent des équations de demi-réaction ci-dessous (Tableau I-4) qui présente les formules de calcul du potentiel de chaque électrode d'après l'équation de Nernst :

Tableau I-4 : Calcul des potentiels aux électrodes de chaque demi-équation d'oxydation de l'acétate et de la réduction de proton en hydrogène respectivement à l'anode et à la cathode d'une cellule d'électrolyse microbienne.



D'où le potentiel à l'équilibre dans les conditions standards :

$$E_{eq} = E_C - E_A = (-0.414 \text{ V}) - (-0.279 \text{ V}) = -0.14 \text{ V}$$

Dans le cas de l'électrolyse de l'eau par voie purement chimique pour la production d'hydrogène, c'est l'oxydation de l'eau qui est réalisée à l'anode ( $2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{O}_2 + 4\text{H}^+ + 4\text{e}^-$ ) avec un potentiel standard de  $E_A=0.82\text{V}$ . Il faut donc fournir à minima :

$$E_{eq} = E_C - E_A = (-0.414 \text{ V}) - (0.82 \text{ V}) = -1.22 \text{ V}$$

L'énergie requise en électrolyse microbienne serait donc 8.7 (1.22/0.14) fois plus faible qu'en électrolyse de l'eau pour produire la même quantité d'hydrogène.

Les potentiels à chaque électrode, d'après leurs équations de Nernst, dépendent de l'activité des protons en solution. Ils dépendent donc du pH de la solution.

Le potentiel de la cathode  $E_C$  et donc le potentiel d'équilibre dépendent également de la pression partielle de  $\text{H}_2$  (BE Logan *et al.* 2008). Dans les conditions standards, une augmentation de la pression partielle de 1 à 10 bars induit une modification du potentiel d'équilibre à compenser de -0,14 V à -0,17 V. Il en est de même pour une pression partielle en  $\text{H}_2$  de 100 bar :  $E_{eq} = -0,20 \text{ V}$ . Il apparaît donc nécessaire, afin de ne pas limiter la production d'hydrogène et de permettre un meilleur rendement énergétique, de soutirer l'hydrogène à mesure qu'il est produit. De la même façon, il est possible d'augmenter le rendement de production en diminuant la pression partielle de  $\text{H}_2$  (dégazage) (Logan *et al.*, 2008).

#### 1.4.2.4.3. Calcul du rendement faradique du biofilm.

La performance du réacteur est exprimée en termes de conversion en hydrogène, de densité volumique d'hydrogène et de taux de production d'hydrogène. Le **nombre total théorique de moles produites**, basé sur l'abattement de DCO est le suivant (Logan *et al.*, 2008):

$$n_{th} = \sum_{substrats} b_{e^-/S} \cdot \Delta n_S \cdot V = \sum_{substrats} \frac{b_{e^-/S} \cdot \Delta S \cdot v_L}{M_S}$$

- Avec :
- $b_{e^-/S} = 4 \text{ mol/mol}$  la production maximale d'électrons qu'il est possible de produire à partir du substrat (par oxydation totale du substrat),
  - $v_L$  le volume du liquide dans le réacteur,
  - $\Delta S$  en g DCO/L le changement de concentration du substrat pendant un

cycle batch,

- $M_S = 82$  g/mol la masse moléculaire du substrat.

Pour convertir la DCO (gDCO/L) en moles d'acétate, un facteur de conversion de 1,067 gDCO/g acétate est utilisé.

Le calcul du **nombre de moles d'hydrogène pouvant être converties** est basé sur le courant mesuré (Logan et al., 2008):

$$n_{CE} = \frac{\int_{t=0}^t I dt}{2F}$$

- Avec :
- $I = V/R_{ex}$  intensité de courant calculée à partir de la tension passant au travers d'une résistance
  - 2, utilisé pour convertir les moles d'électrons en moles d'hydrogène
  - $F = 96\,485$  C/mol  $e^-$ , la constante de Faraday
  - $dt$ , l'intervalle de temps sur lequel  $n_{CE}$  est calculé
  - un cycle batch,
  - $M_S = 82$  g/mol la masse moléculaire du substrat.

Le **rendement faradique** est défini comme suit (Logan et al., 2008):

$$r_{CE} = \frac{n_{CE}}{n_{th}} = C_E$$

Avec :  $C_E$  le rendement faradique en % et  $n_{CE}$  : la quantité d'hydrogène potentiellement issue des électrons récupérés au niveau de la cathode.

#### **1.4.2.5. CONDITIONS OPERATOIRES**

---

##### **1.4.2.5.1. Nature du substrat**

En pratique, l'utilisation des systèmes bioélectrochimiques pour le traitement d'effluents contenant divers composés organiques nécessite un consortium microbien qui présente une grande versatilité pour convertir les substrats organiques en énergie électrique. Cependant, la structure de la communauté bactérienne est fortement déterminée par les substrats consommés (AGVs), plus que par l'inoculum initial (Freguia *et al.*, 2010). De plus, la plupart des espèces prédominantes de ces communautés ont une activité métabolique limitée,

n'utilisant que certains produits de fermentation (Caccavo et al., 1994; Kiely, Regan, et al., 2011).

Les systèmes bioélectrochimiques alimentés avec de l'acétate présentent des profils de communautés microbiennes dominés par des *Geobacteraceae* (Jung and Regan, 2007; Chae et al., 2009; Xing et al., 2009; Kiely, Rader, et al., 2011). En comparant les rendements faradiques de piles à combustible alimentées avec de l'acétate ou du butyrate, Liu *et al.* (2005) ont montré que les biofilms produisent 50% de moins d'électricité quand ils oxydent du butyrate plutôt que de l'acétate en utilisant des eaux usées pour inoculum. Cette famille de bactéries (*Geobacteraceae*) ne serait pas impliquée dans la conversion du butyrate en électrons. Dans ce cas, des espèces de *Pseudomonas* et de *Bacillus* (à Gram positif) sont abondantes dans ces réacteurs et oxyderaient préférentiellement ce substrat (Freguia *et al.*, 2010).

L'analyse des gènes 16S dans des biofilms anodiques de piles à combustible microbiennes alimentées avec du propionate a permis de mettre en évidence la prédominance de *Proteobacteria* et de *Geobacteraceae* en moins grande proportion que dans les biofilms alimentés avec de l'acétate (Jung and Regan, 2007; Jang et al., 2010). La faible présence de *Geobacteraceae*, et de manière plus générale des  $\delta$ -protéobactéries, est probablement due au fait qu'il n'existe pas de phénomène syntrophique avec ce substrat (Jang *et al.*, 2010).

En analysant les communautés microbiennes des biofilms électroactifs issus de l'oxydation de l'éthanol, Parameswaran *et al.* (2010) ont mis en évidence la présence d'une syntrophie impliquant 3 voies métaboliques mettant en jeu des bactéries fermentaires telles que *Pelobacter propionicus*, des méthanogènes et des bactéries électroactives. Ces interactions mêlent 2 voies métaboliques dans lesquelles l'acétate peut être consommé par les bactéries du biofilm anodique directement après fermentation de l'éthanol ou après conversion en acétate de l'hydrogène co-produit de cette même fermentation par des *homo-acétogènes* (Figure I-16).

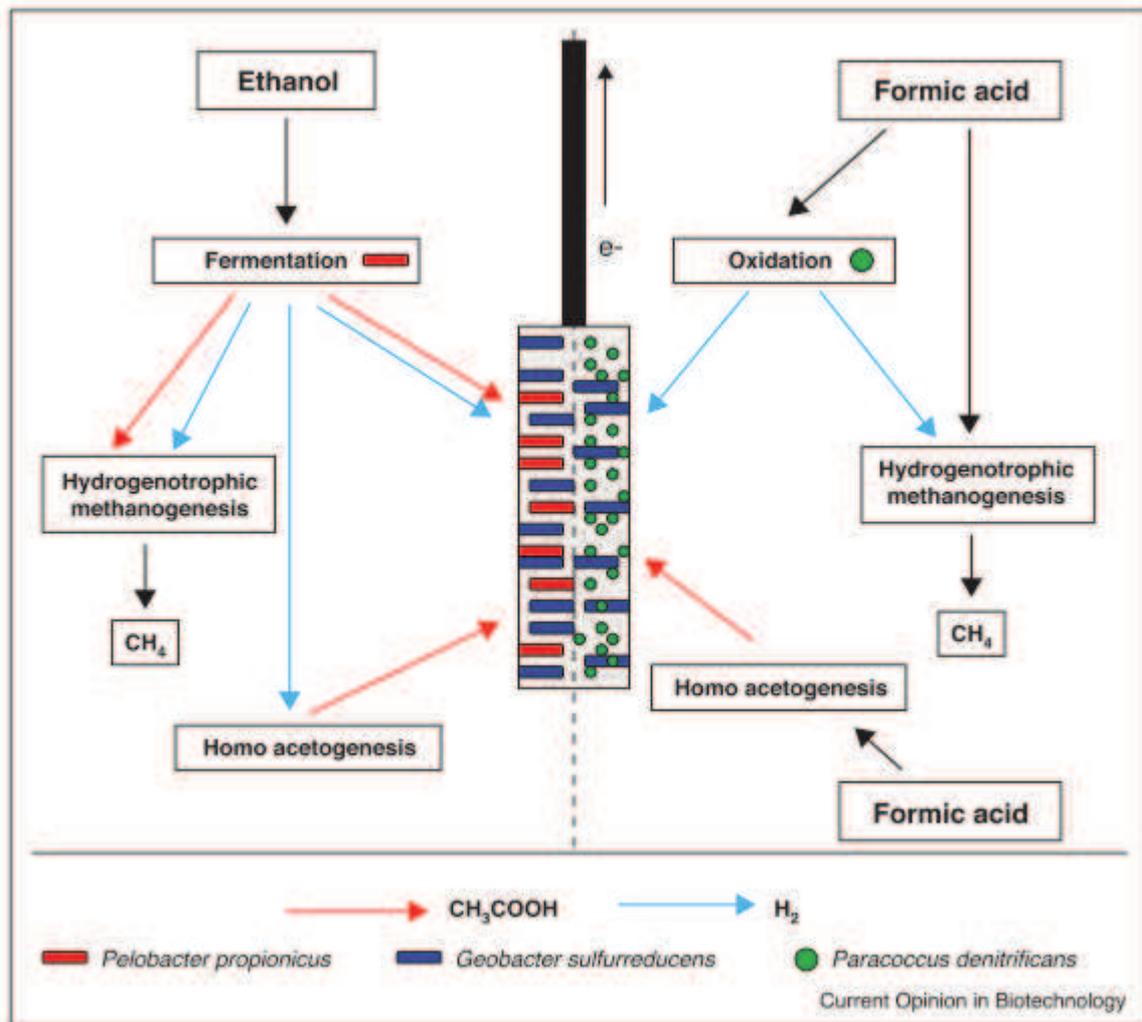


Figure I-16 : Schéma des interactions syntrophiques se développant dans un biofilm anodique utilisant de l'éthanol ou de l'acide formique.

Le substrat initial est converti en substrat oxydable par les bactéries homo-acétogènes et fermentaires. (Kiely, Regan, et al., 2011)

Les données de la littérature suggèrent 3 différents modes de transfert d'électrons dans un compartiment anodique à partir de formate (Figure I-16). D'abord, *Shewanella putrefaciens* PS-2 est capable de transférer directement des électrons issus de l'oxydation du formate (Kiely et al., 2010). Ha et al. (2008) ont montré la présence sur l'électrode de bactéries homo-acétogènes (*Acetobacterium* sp.) et de bactéries connues comme étant électroactives telles que *Geobacter* sp.. Leurs résultats suggèrent que le formate a pu être consommé par les bactéries homo-acétogènes pour produire de l'acétate, utilisé ensuite par des bactéries électrochimiquement actives. Enfin, le troisième mode de transfert implique

l'oxydation du formate en hydrogène par *Paracoccus denitrificans*, qui oxyde le formate en dioxyde de carbone et en hydrogène, l'hydrogène étant ensuite utilisé par les *Geobacteraceae* du biofilm pour générer du courant (Bond and Lovley, 2003) (Figure I-16).

Les études des piles à combustibles microbiennes alimentées avec du glucose montrent qu'il existe des étapes clefs requises pour la production d'électrons à partir de ce substrat (Freguia *et al.*, 2008; Selembo *et al.*, 2009). L'analyse des acides organiques présents dans la pile à combustible microbienne en batch a permis d'identifier des substrats intermédiaires connus pour produire des électrons par le biais de biofilms électroactifs. De plus, l'analyse des gènes 16S de la communauté microbienne (Freguia *et al.*, 2008) soutient l'hypothèse qu'une étape préalable de fermentation est réalisée avant la conversion de ces acides organiques en électricité (Figure I-17).

De la même façon, les analyses DGGE et des bibliothèques de clones du gène ARNr16S des communautés microbiennes de l'anode oxydant la cellulose ont montré une prédominance de microorganismes proches des *Clostridia* et d'autres bactéries fermentaires (Ishii *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009; Cheng *et al.*, 2011). Kiely *et al.* (2011) proposent un schéma des interactions syntrophiques entre bactéries fermentaires et électroactives dans la génération de courant à partir de cellulose reporté en Figure I-17.

Dans une pile à combustible microbienne avec un mélange d'AGV, les communautés sont principalement constituées par des protéobactéries comme *Geobacter*, *Comamonas*, *Pseudomonas* et *Pelobacter* (Freguia *et al.*, 2010). Plus particulièrement, les communautés développées sur l'anode d'une MFC alimentée avec des composés issus de la fermentation sont  $\delta$ -protéobactéries (en majorité), *Rhodobacteraceae*, *Geobacteraceae*, *Peptococcaceae*, *Pelobacter propionicus* (1<sup>er</sup> à consommer de l'acide acétique) (Kiely, Rader, et al., 2011).

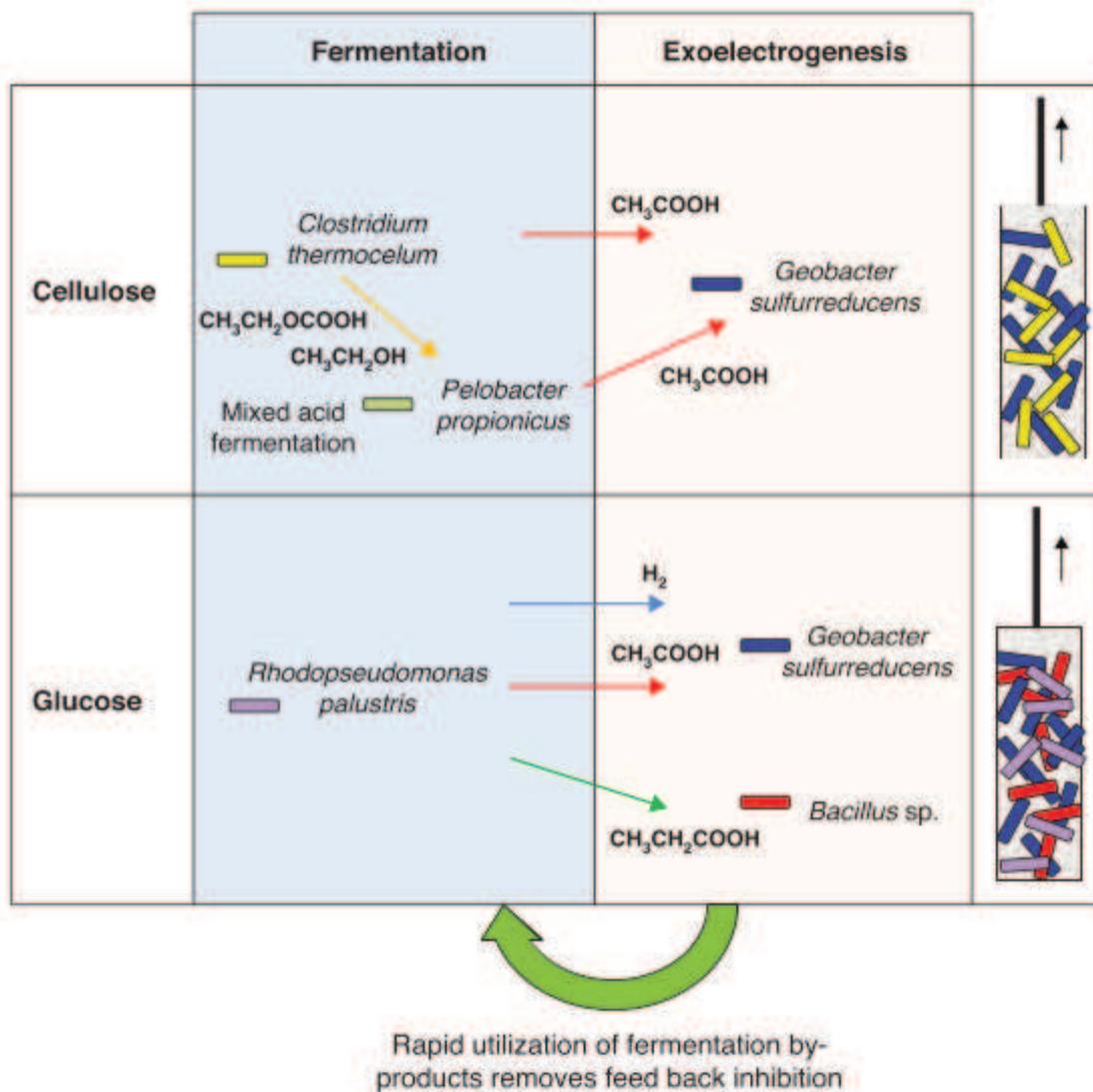


Figure I-17 : Schéma des interactions syntrophiques qui permettent l'hydrolyse de la cellulose et l'oxydation du glucose dans le compartiment anodique d'un système bioélectrochimique. (Kiely, Regan, et al., 2011)

#### 1.4.2.5.1. pH du compartiment anodique

La plupart des systèmes bioélectrochimiques sont étudiés dans des intervalles de pH très petits et proches de la neutralité (Liu, Cheng, *et al.*, 2005b; Biffinger *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2008; Puig *et al.*, 2010). Patil *et al.* (2011) et Yuan *et al.* (2011) ont récemment étudié l'influence du pH sur l'efficacité du biofilm pour une gamme de valeurs de pH plus élargie.

Le pH du compartiment anodique joue un rôle important dans la sélection du consortium microbien électroactif. En inoculant un réacteur avec des eaux usées et avec de l'acétate pour substrat, Patil *et al.* (2011) ont étudié l'influence du pH sur la sélection microbienne au sein du biofilm pour des valeurs de pH de 6, 7 et 9. Les résultats ont montré une meilleure

densité de courant à pH 7, pH de l'inoculum de départ avec une prédominance de *Geobacter sulfurreducens* et une diversité microbienne moins importante que pour les deux autres pH testés.

Yuan et al. (2011) ont quant à eux montré qu'un pH alcalin (pH 9) favorisait la croissance du biofilm et le transfert d'électrons en terme de densité de courant par rapport à deux autres valeurs de pH testées (pH 5 et pH 7) en utilisant des boues activées et dans une pile à combustible microbienne alimentée avec de l'acétate en tant que substrat.

Les données concernant l'influence du pH sur l'efficacité du biofilm et sur les changements de structure microbienne qui en découlent restent pauvres mais la disparité des conclusions obtenues par ces deux études laisse à penser que la sélection microbienne, et donc l'efficacité du biofilm électroactif, dépendent toutes les deux de l'inoculum de départ, en termes de composition microbienne et de pH initial.

#### 1.4.2.5.2. Influence du potentiel à l'anode

Torres et al. (2009) ont étudié l'influence du potentiel à l'anode sur la communauté microbienne du biofilm en électrolyse microbienne. Quatre électrodes étaient placées dans un même compartiment anodique et polarisées à différents potentiels ( $E_{\text{anode}} = -0,15, -0,09, +0,02$  et  $+0,37$  vs ESH). Pour les deux plus faibles potentiels anodiques ( $-0,15V$  et  $-0,09V$  vs ESH), la production de courant a été plus élevée, la croissance du biofilm a été plus rapide et une forte sélection des souches de microorganismes électroactifs a été observée (92 ou 99 % de la totalité des clones sont à 97% similaires à *Geobacter sulfurreducens* sur le gène 16SARNr). Pour les deux potentiels positifs, une communauté microbienne plus diverse et appauvrie en bactéries électroactives a été caractérisée. Ces résultats montrent le rôle prépondérant du potentiel de polarisation de l'anode et de *Geobacter sulfurreducens* pour l'obtention d'importantes densités de courant.

White et al. (2009) ont étudié les changements dans la diversité et la quantité des bactéries récupérées à l'anode de PACMs en fonction du potentiel à l'anode, de la production d'énergie et du milieu de culture. Ils ont ainsi montré que la dynamique des populations bactériennes (croissance, succession des populations...) est due au potentiel de l'anode, ce qui peut directement être relié à leur capacité à utiliser l'anode comme

accepteur final d'électron. Cependant, d'après White *et al.*, le milieu géochimique, quant à lui, contrôle avant tout la diversité et la structure des communautés (White *et al.*, 2009).

#### I.4.2.5.3. Exposition à la lumière

L'exposition à la lumière change les populations bactériennes à l'anode des MFC (Xing *et al.*, 2009). Dans des travaux de Xing *et al.* (2009), l'identification des bactéries électroactives dans une pile à combustible microbienne exposée à la lumière a montré la présence de *Geobacter sulfurreducens* et de *Rhodopseudomonas palustris*, une bactérie photosynthétique (Xing *et al.*, 2009). Des tests en culture pure ont montré que *Rhodopseudomonas palustris* augmentait la production de courant en présence de lumière et avec une alimentation du bioréacteur par des composés organiques (Figure I-18 (1)) (Xing *et al.*, 2009). Cependant, il est peu probable que le transfert d'électrons se fasse directement de l'organisme photosynthétique à l'électrode (Chiao *et al.*, 2006).

Ces dernières années, on assiste à un nouvel intérêt pour les systèmes photosynthétiques, notamment dans les piles à combustible microbiennes. Les recherches récentes se focalisent en particulier sur la synergie entre organismes photosynthétiques et bactéries électroactives hétérotrophes développées sur des anodes. Notamment, les bactéries du biofilm anodique utilisent la matière organique issue de la photosynthèse ou la biomasse photosynthétique comme donneur d'électron à oxyder (Rosenbaum *et al.*, 2010). Il a ainsi été montré qu'une pile à combustible microbienne contenant un biofilm électroactif hétérotrophe pouvait produire du courant en fonction de la luminosité (He *et al.*, 2009). Contrairement à une pile à combustible microbienne photosynthétique classique, la génération d'électricité présente une tendance inverse avec une augmentation de la densité de courant produite pendant les périodes d'obscurité et une diminution à la lumière (Figure I-18 (2)). Une luminosité permanente inhibe la production de courant, probablement du fait de l'accumulation d'oxygène issu de la photosynthèse (He *et al.*, 2009).

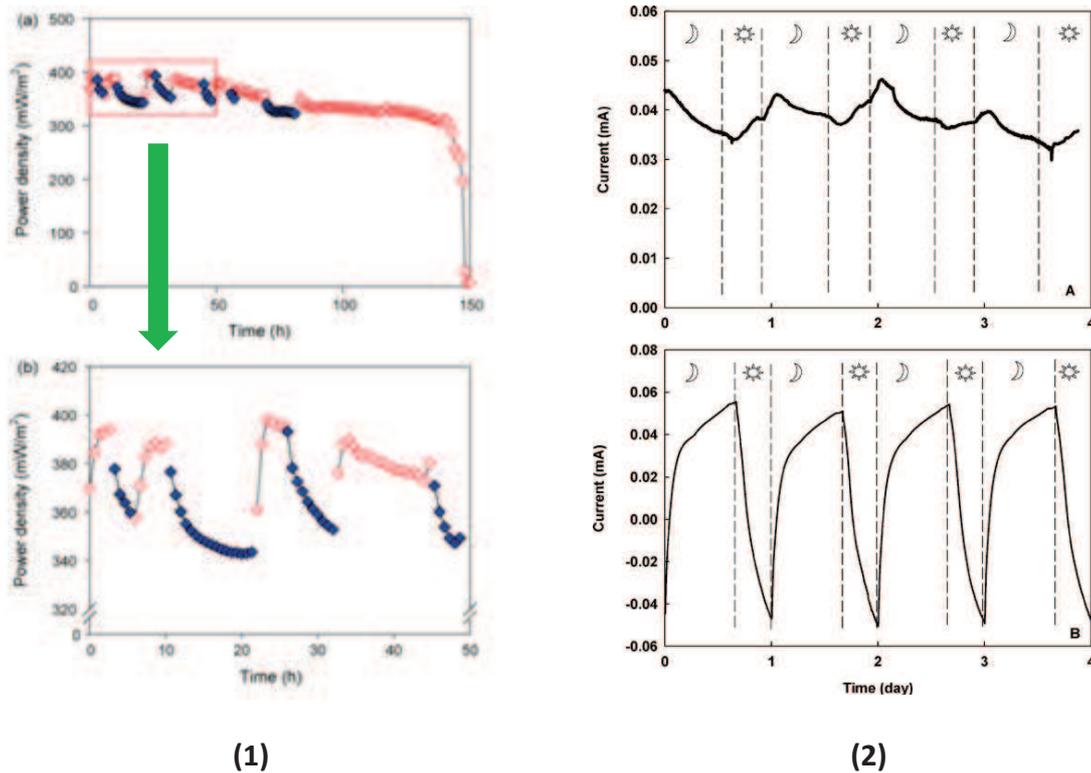


Figure I-18 : Effet de l'alternance d'exposition à la lumière sur le transfert d'électron :

(1) : Densité de puissance générée par une pile à combustible microbienne en culture pure avec *Rhodospirillum rubrum* avec alternance de lumière (4000 lx – losange rouge) et obscurité (losanges bleus) en batch alimenté avec 4 g<sub>acétate</sub>/L à 30°C (d'après (Xing et al., 2009)). (2) : Densité de courant produite en pile à combustible microbienne, en cultures mixtes, après 1 mois (A) et 5 mois (B). Les symboles ☾ et ☀ représentent respectivement les conditions d'obscurité et de lumière (d'après (He et al., 2009)).

#### 1.4.2.6. INFLUENCE DES METHANOGENES

La culture de bactéries anaérobies strictes est plus facile dans une MEC en anoxie par rapport aux MFC où la présence d'oxygène dans le compartiment cathodique rend le milieu moins sélectif. Cependant, un manque d'exposition à l'oxygène pourrait favoriser le milieu à la méthanogénèse, ce qui diminuerait alors le rendement en hydrogène (Rozendal et al., 2006). Par exemple, Freguia et al. (2008) ont montré un effet syntrophique dans les piles à combustible microbienne. Le glucose y est consommé par les bactéries fermentaires pour produire principalement de l'acétate et de l'hydrogène. L'acétate est ensuite consommé par les bactéries électroactives et l'hydrogène issu de la fermentation peut être oxydé à l'anode ou consommé par les homoacétogènes. Dans ce dernier cas, le méthane produit se diffuse au travers du biofilm vers la phase liquide (Freguia et al., 2008).

La méthanogenèse est un problème qui affecte les rendements de conversion en hydrogène dans le cas des MECs (Liu et al., 2005; Call and Logan, 2008). Une forte pression partielle en hydrogène favorise la croissance de méthanogènes, ce qui réduit le rendement d'hydrogène et contamine le gaz produit avec du méthane. (Rozendal et al., 2008) ont montré qu'un milieu tampon contenant du bicarbonate au niveau de la cathode favorise la croissance de méthanogènes hydrogénotrophes qui utilisent ce tampon comme source de carbone. En supprimant cet élément du milieu, il est donc possible de réduire la conversion de l'hydrogène en méthane par des voies métaboliques limitantes.

## I.5. COUPLAGE DE LA PRODUCTION DE BIOHYDROGENE PAR ELECTROLYSE MICROBIENNE ET PAR VOIE FERMENTAIRE

Les procédés de production de biohydrogène par voie fermentaire en cultures mixtes convertissent des carbohydrates (saccharose, glucose) avec des rendements limités de 2-3 moles d'hydrogène par mole d'hexose et coproduisent des acides gras volatils (acide acétique ou butyrique). Or, alimenté par de l'acétate, une cellule d'électrolyse microbienne (MEC) produit 3 moles d'hydrogène /mole d'acétate. Le couplage de la fermentation à un procédé d'électrolyse microbienne pourrait donc produire théoriquement de 8 à 9 moles d'hydrogène/mole d'hexose, soit un grand pas vers la limite ultime de 12 moles d'hydrogène/mole d'hexose.

Le couplage de la fermentation avec l'électrolyse microbienne est schématisé ci-dessous en série (Figure I-19) ou dans un même réacteur (Figure I-20). Ces figures font apparaître la stœchiométrie maximale de conversion d'une mole de glucose en hydrogène avec, dans les deux cas, à gauche la fermentation (première étape du couplage) et à gauche l'électrolyse microbienne (dernière étape).

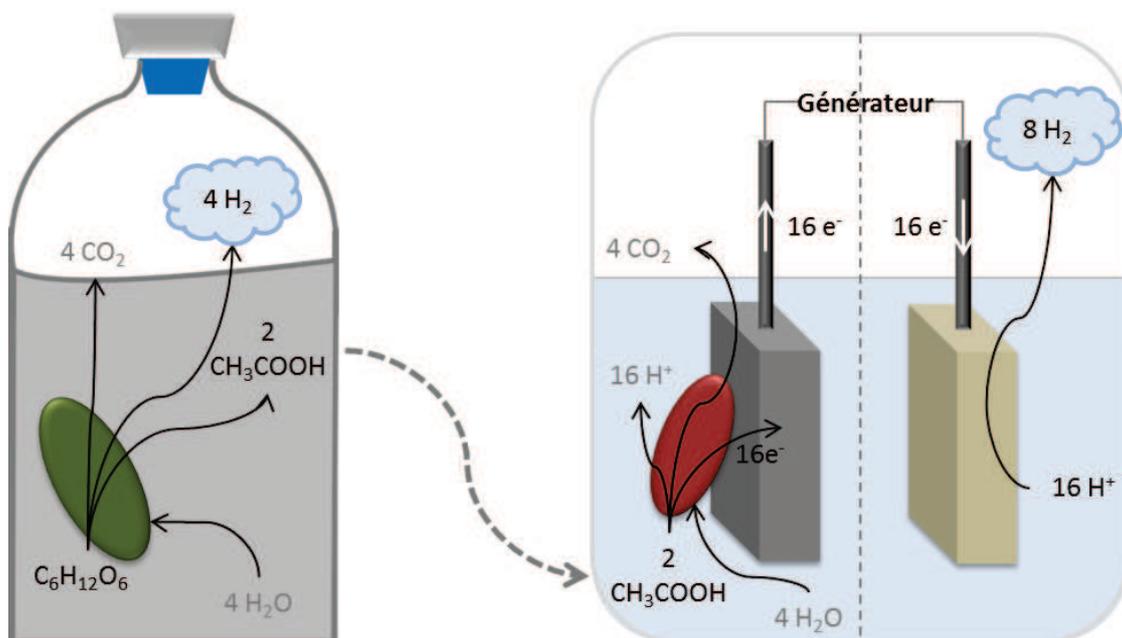


Figure I-19 : Représentation schématique du couplage de la fermentation avec l'électrolyse microbienne en ne considérant que la voie acétate en fermentation.

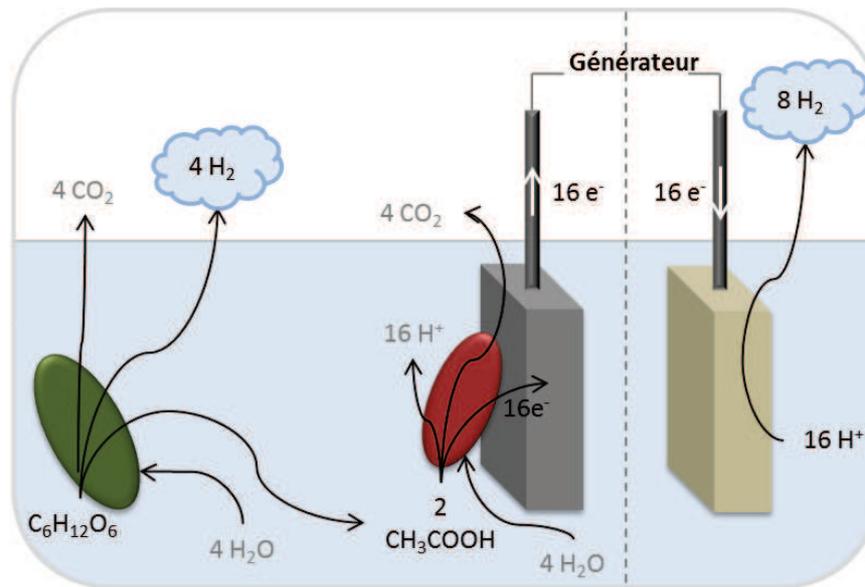


Figure I-20 : Représentation schématique du couplage de la fermentation avec l'électrolyse microbienne en ne considérant que la voie acétate en fermentation : Cas d'un procédé avec fermentation dans le compartiment anodique de la cellule d'électrolyse microbienne.

### I.5.1. ETAT DE L'ART

Des premiers résultats ont été récemment obtenus en couplant la fermentation à l'électrolyse microbienne pour la production d'hydrogène (Tableau I-5).

D'après une étude de Tommasi *et al.* (2012) qui compare les deux couplages  $BioH_2+CH_4$  (fermentation hydrogène + méthane) avec  $BioH_2+MEC$  (fermentation hydrogène + électrolyse microbienne), le couplage  $BioH_2+MEC$  a donné un meilleur taux de conversion d'énergie, avec en électrolyse microbienne une conversion de  $2,41 \text{ mol}_{H_2}/\text{mol}_{\text{acétate}}$ , ce qui correspondrait pour une mole de glucose consommée en fermentation à  $4,82 \text{ mol}_{H_2}/\text{mol}_{\text{glucose}}$  supplémentaire à la conversion due à la fermentation. Cependant, dans cette étude, le couplage n'a pas été réalisé mais simulé avec une cellule d'électrolyse microbienne alimentée avec de l'acétate. D'une manière générale, les résultats présentés dans le Tableau I-5 montrent la faisabilité du couplage et une augmentation de conversion de matière organique en hydrogène significative avec des conversions pouvant atteindre  $9,95 \text{ mol}_{H_2}/\text{mol}_{\text{glucose}}$  (Lalurette *et al.*, 2009),  $8,79 \text{ mol}_{H_2}/\text{mol}_{\text{glucose}}$  (Lu *et al.*, 2009). Soit des rendements de conversion proches des estimations théoriques.

Tableau I-5 : Etudes portant sur le couplage de la fermentation et de l'électrolyse microbienne pour la production d'hydrogène.

Système	Inoculum	Substrat	[NaCl] (g/L) en MEC	pH		Température(°C)		Performances	Références
				BioH <sub>2</sub>	MEC	BioH <sub>2</sub>	MEC		
Fermentation + MEC		Poudre de blé	-	-	2,0- 7,0	-	25	à pH 7, 2V, 10g <sub>AGV</sub> /L 56% de conversion	(Tuna et al., 2009)
Fermentation sur éthanol en batch (tampon pH 6.7-7) / MEC (volume liquide 26 mL)		mélasses	-	4,5	6,7- 7,0	-	25	1,41 ± 0,08 m <sup>3</sup> <sub>H<sub>2</sub></sub> /m <sup>3</sup> <sub>réacteur</sub> /j à 0,6V Augmentation du taux de production de H <sub>2</sub> de 1,4 moles <sub>H<sub>2</sub></sub> /mole <sub>Hexose</sub> à 8,7 moles <sub>H<sub>2</sub></sub> /mole <sub>Hexose</sub>	(Lu et al., 2009)
Fermentation sur lignocellulose et cellobiose à pH 6,8 / Electrolyse microbienne sur effluents centrifugés de fermentation, sur un milieu synthétique, sur substrat simples (acétate, éthanol, succinate, lactate, formate)	Fermentation : <i>Clostridium thermocellum</i> MEC : eaux usées	tiges de maïs : lignocellulose ou cellobiose	8 mS/cm	6,8 (régulé)	7	50	-	<u>En fermentation :</u> 1,67 mol <sub>H<sub>2</sub></sub> /mol <sub>glucose</sub> avec 0,25 L <sub>H<sub>2</sub></sub> /L.j sur lignocellulose 1,64 mol <sub>H<sub>2</sub></sub> /mol <sub>glucose</sub> avec 1,65 L <sub>H<sub>2</sub></sub> /L.j sur cellobiose <u>En MEC :</u> acétate : 3,6 mol <sub>H<sub>2</sub></sub> /mol <sub>acetate</sub> (90%) succinate : 4,8 mol <sub>H<sub>2</sub></sub> /mol <sub>succinate</sub> (68%) lactate : 4 mol <sub>H<sub>2</sub></sub> /mol <sub>lactate</sub> (68%) Couplage : rendement global en hydrogène à partir de cellobiose : 9,95 mol <sub>H<sub>2</sub></sub> /mol <sub>Glucose</sub>	(Lalaurette et al., 2009)
Production d'hydrogène à partir de cellulose en combinant fermentation, MEC et MFC pour alimentation de la MEC.	enrichissement de miettes de bois pourri	cellulose	1	5,3	7	60	-	Augmentation des rendements de conversion de 41% par rapport à la seule fermentation. Récupération de 23% d'énergie de la cellulose sans apport extérieur. En MEC : 0.48m <sup>3</sup> <sub>H<sub>2</sub></sub> /m <sup>3</sup> .j, et 33,2 mmol H <sub>2</sub> /g <sub>D<sub>CO</sub></sub>	(Wang et al., 2011)

système	Inoculum	substrat	[NaCl] (g/L) en MEC	pH	Température(°C)	Performances	Références		
Fermentation en réacteur STR de 2L à 35°C pH 5,2 / couplée avec production de CH <sub>4</sub> Couplage avec MEC simulé avec MEC à part	Boues activées de STEP	Glucose (fermentation) / Acetate (MEC)	-	5,8	-	35	22	11,47 % de rendements de conversion avec fermentation seule 1) 55,1 % avec couplage fermentation H <sub>2</sub> -CH <sub>4</sub> 2) en MEC : 2,41 mol <sub>H<sub>2</sub></sub> /mol <sub>acetate</sub> $\mu = Y_{H_2\text{réel}} / Y_{H_2\text{théorique}} = 2,41 / 4 = 60,25\%$	(Tommasi et al., 2012)
Fermentation à 35°C en batch Puis alimentation de MEC	Boues activées de STEP prétraitée par sonication	Boues activées de STEP prétraitée par sonication	-	-	7	35	22	<u>En MEC :</u> 1.2mL <sub>H<sub>2</sub></sub> /mg <sub>DCO</sub> 10mmol <sub>H<sub>2</sub></sub> /g <sub>MVS</sub> 1,76 ± 0,03 m <sup>3</sup> <sub>H<sub>2</sub></sub> /m <sup>3</sup> <sub>réacteur·j</sub> Taux de récupération global d'hydrogène : 0,120 mL <sub>H<sub>2</sub></sub> /g <sub>MVS·j</sub> à partir de boues	(Liu, Huang, et al., 2012)
Fermentation en réacteur batch de 1,4 L à pH 7 alimenté avec du glucose à 6g/L / MEC alimenté par effluent de fermenteur ajustés à 3000 g <sub>AGV</sub> /L et pH à 7	Boues de réacteur anaérobie	Glucose	-	5,2	7	-	28	<u>En MEC :</u> 2,025 mol <sub>H<sub>2</sub></sub> /kg <sub>AGV consommés</sub>	(Lenin Babu et al., 2013)

Dans le cadre du couplage de la fermentation et de l'électrolyse microbienne, des paramètres majeurs des deux procédés semblent être à étudier. Notamment, le pH optimal des deux procédés est différent et une absence de régulation pourrait affecter les écosystèmes de l'un ou l'autre des procédés. La salinité, qui permettrait de réduire la résistance interne de l'électrolyseur, peut avoir un impact sur la survie des microorganismes dans les deux procédés. Enfin, les écosystèmes de la fermentation et du biofilm anodique de l'électrolyseur ont des fonctions et donc des structures de communauté microbienne différentes. L'impact de la communauté microbienne issue de la fermentation sur le biofilm électroactifs doit être étudié dans le cadre du couplage.

### **I.5.2. IMPACT DU PH DANS LE CADRE DU COUPLAGE**

---

Le pH du milieu joue un rôle essentiel en fermentation comme en électrolyse microbienne.

Comme vu précédemment (I.3.5.1 p. 28), en fermentation acétogène, le pH permet notamment de limiter la croissance des organismes méthanogènes et d'améliorer la production de biohydrogène en contrôlant les voies métaboliques. Le pH optimal pour la production d'hydrogène se situe entre 5,0 et 6,0 pour les déchets alimentaires et pH 7,0 pour les résidus agricoles et le fumier d'animaux (Guo *et al.*, 2010).

En électrolyse microbienne, les pH usuellement retrouvés et qui correspondent aux pH optimaux des espèces électroactives étudiées (I.4.2.5.1 p.66) sont proches de la neutralité (Liu, Cheng, *et al.*, 2005b; Biffinger *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2008; Puig *et al.*, 2010; Patil *et al.*, 2011) voire alcalin (Yuan *et al.*, 2011).

Les études présentées dans le Tableau I-5 ont été réalisées avec ajustement du pH entre l'étape de fermentation et celle d'électrolyse microbienne.

Dans le contexte du couplage de ces deux procédés et afin d'éviter une trop importante consommation en soude pour ajuster le pH en ligne dans l'électrolyseur, une étude plus approfondie de la faisabilité du couplage de ces deux procédés dans des conditions de pH intermédiaire est requise tant dans l'observation des performances obtenues que dans la sélection des micro-organismes impliqués.

### **I.5.3. IMPACT DE LA SALINITE SUR L'ACTIVITE ELECTROACTIVE DU BIOFILM**

---

Le transfert de charges est un facteur important dans le fonctionnement des systèmes bioélectrochimiques. Notamment, un transport de protons lent limite les performances de ces systèmes en augmentant leurs résistances internes (Lefebvre *et al.*, 2011). Ceci peut être amélioré par une augmentation de la salinité, et donc de la conductivité du système.

Dans le compartiment anodique, l'augmentation de la salinité peut induire des effets antagonistes : elle peut augmenter la conductivité du système mais aussi affecter la physiologie du biofilm. Liu *et al.* (2005b) ont fait varier la salinité du milieu en pile à combustible microbienne alimentée avec de l'acétate sans membrane pour de faibles salinités allant de 100 à 400 mM de NaCl (de 1,7 à 6,8 mg/L). Une augmentation de 84% des performances des piles à combustible microbiennes a été observée en termes de densité de puissance fournie par le système. Plus récemment, Lefebvre *et al.* (2012) ont également étudié l'influence de la concentration en NaCl en pile à combustible microbienne pour des concentrations plus élevées. Pour une salinité de 20 g<sub>NaCl</sub>/L, une augmentation de 30% des performances du procédé (densité de puissance) a été obtenue (Figure I-21) avec une réduction de la résistance interne du système de 33%. Pour de plus fortes concentrations en NaCl (40 g<sub>NaCl</sub>/L), la salinité devient défavorable à l'activité électroactive du biofilm (Figure I-21). Le rendement faradique est affecté dès 10 g<sub>NaCl</sub>/L, ce qui montre que le consortium anodique est sensible aux faibles salinités (Lefebvre *et al.*, 2012).

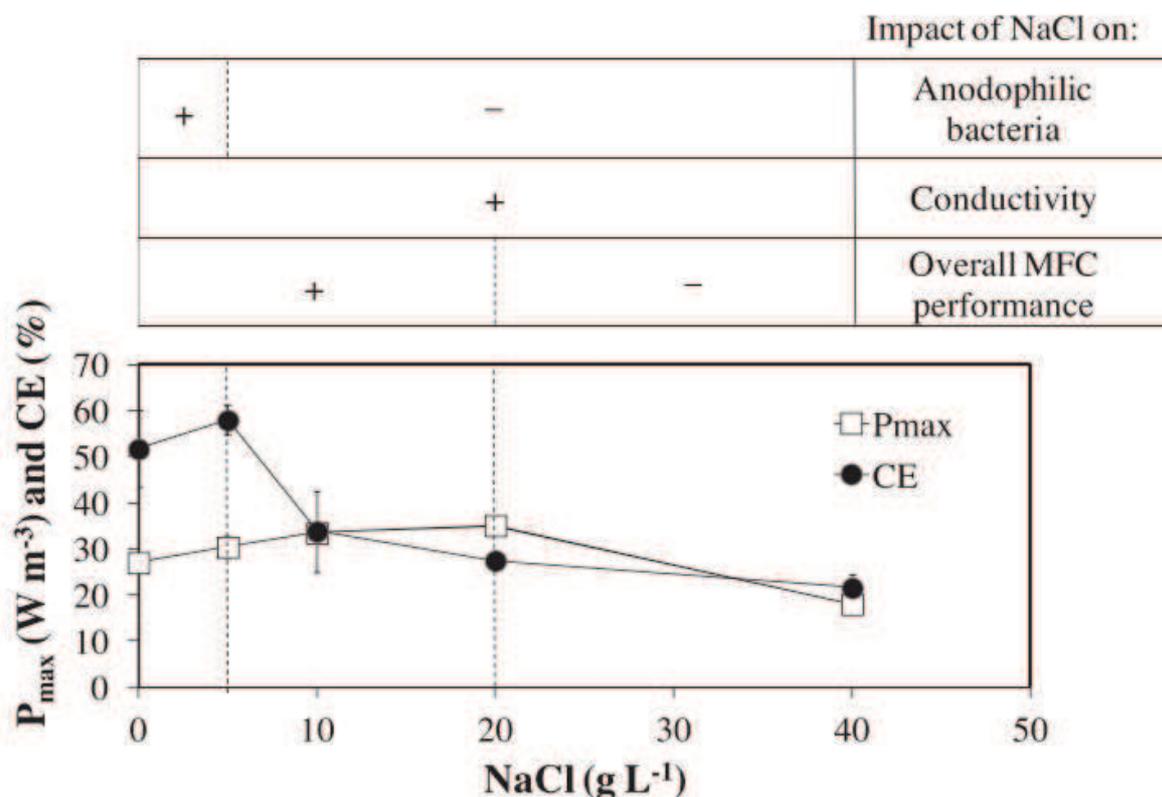


Figure I-21 : Impact de la concentration en NaCl sur le consortium anodique électroactif en termes de puissance maximale fournie par le biofilm ( $P_{max}$ ) et rendement faradique (CE) (Lefebvre et al., 2012).

D'autre part, les études récentes en piles à combustible microbiennes ont montré que des conditions salines permettent de sélectionner des espèces électroactives performantes (Bond et al., 2002). Ainsi, dans la famille des *Geobacteraceae*, le genre *Desulfuromonas*, adapté à des salinités marines, prédomine dans les biofilms issus des environnements marins (Lovley, 2006b). Les deux études précédemment présentées ont été réalisées sur des biofilms obtenus à partir d'eaux usées domestiques (Liu, Cheng, et al., 2005b; Lefebvre et al., 2012). Les espèces sélectionnées sur l'anode ne sont donc pas issues d'environnements salins et donc, *a priori*, pas adaptées au sel. La sélection de microorganismes issus d'environnements salins, comme les sédiments marins, pourrait permettre de sélectionner un consortium plus à même de maintenir son activité électroactive à des salinités significatives, assurant une bonne conductivité du milieu.

Enfin, la salinité est un paramètre très peu étudié jusqu'alors en fermentation (voir I.3.5.4 page 31). La faisabilité de la fermentation en milieu salin a cependant été montrée en cultures mixtes à pH bas (Zheng et al., 2005) et en culture pure à pH neutre voire alcalin (Simankova et al., 1993; Alshiyab et al., 2008; Liu and Wang, 2012). Il serait donc intéressant d'étudier l'impact de la salinité sur le couplage dans son ensemble (sur la fermentation et le biofilm électroactif)

#### **I.5.4. IMPACT DES ESPECES EXOGENES SUR LE BIOFILM**

---

Dans la plupart des études rapportées sur le couplage de l'électrolyse microbienne avec la fermentation, les effluents issus de la fermentation sont centrifugés pour s'affranchir de la biomasse fermentaire dans le compartiment anodique avant leur utilisation en électrolyse microbienne (Lalaurette *et al.*, 2009; Lu *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2011).

Bien que les changements de conditions expérimentales (pH neutre voire alcalin, forte conductivité, carence en oligo-éléments) entre la fermentation et l'électrolyse microbienne puissent inhiber la croissance de ces organismes dans le compartiment anodique, leur introduction dans ce compartiment peut impacter sur la structure des communautés microbiennes et le fonctionnement du biofilm électroactif. A ce jour, cet aspect n'a été évoqué dans le cadre d'un couplage BioH<sub>2</sub>-MEC que dans une étude récente de *Lenin Babu et al.* (2013) qui a montré la présence dans le biofilm après couplage avec la fermentation de  $\gamma$ -protéobactéries (50%), Bacilles (25%) and Clostridies (25%). La présence d'espèces fermentaires et connues pour produire du biohydrogène a donc été observée (Lenin Babu et al., 2013). Cependant, des données restent requises sur l'influence de ces espèces exogènes sur la communauté microbienne du biofilm, tant dans sa structure que dans ses performances.

---

## CHAPITRE II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

---

*Ce chapitre décrit le matériel et les méthodes mis en œuvre au cours des expériences conduites au laboratoire de biotechnologie de l'environnement à Narbonne dans le cadre de cette thèse. Les deux premières parties décrivent respectivement la mise en œuvre en batch de cultures mixte de fermentation et de systèmes bioélectrochimiques. La troisième partie correspond aux différentes méthodes d'analyse utilisées lors des expérimentations et pour l'exploitation des résultats. La quatrième partie décrit les techniques de biologie moléculaire utilisées pour l'analyse des communautés microbiennes.*



## II.1. DISPOSITIFS EXPERIMENTAUX

---

### II.1.1. PRODUCTION DE BIOHYDROGENE EN REACTEUR DISCONTINU

---

#### II.1.1.1. MISE EN ŒUVRE

---

Afin de mesurer la production de biohydrogène, des réacteurs en mode discontinu (batch) ont été réalisés à 35°C, sans agitation. Les BHP ont été effectués en bouteilles de 600mL, avec un volume de travail de 200 mL. Une quantité de 5 g/L de glucose a été ajoutée à chaque bouteille ainsi que du tampon MES (2-[N-morpholino] éthane sulfonic acid) ou phosphate à 100 mM, en fonction du pH ciblé (cf *Tableau II-1*), ainsi qu'une solution d'oligoéléments (7.50 g L<sup>-1</sup> FeCl<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, 0.30 g L<sup>-1</sup> H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O, 0.59 g L<sup>-1</sup> MnSO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O, 0.13 g L<sup>-1</sup> CoCl<sub>2</sub>, 6H<sub>2</sub>O, 0.35g L<sup>-1</sup> ZnCl<sub>2</sub>, 0.13 g L<sup>-1</sup> NiCl<sub>2</sub>,6H<sub>2</sub>O, 0.075 g L<sup>-1</sup> CuCl<sub>2</sub>,2H<sub>2</sub>O, 0.13 g L<sup>-1</sup> NaMoO<sub>4</sub>,2H<sub>2</sub>O) et de chlorure d'ammonium à 100 mM.

L'inoculum correspondait à des sédiments prélevés dans les salins de Saint Martin à Gruissan. Il a été ajouté en fixant le rapport substrat/inoculum (gDCO substrat/ gMV) inoculum entre 10 et 15, tel que décrit dans le *Tableau II-1*. Le pH initial a été ajusté à l'aide d'une solution de NaOH 1N. Le ciel gazeux de chaque bouteille a été rincé à l'azote (N<sub>2</sub>) afin d'assurer des conditions d'anaérobiose stricte. Chaque condition a été testée en triplicats.

Le volume de biogaz produit a été quantifié par mesure de la pression de l'espace de tête à l'aide d'un manomètre (Mano 2000, Leo 2 Keller). Le volume de biogaz a été déduit de la loi des gaz parfaits ; La composition du biogaz (O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, H<sub>2</sub> and N<sub>2</sub>) a été analysée à l'aide d'un chromatographe associé à un catharomètre (Clarus 580, Perkin Elmer), selon un protocole décrit dans le paragraphe II.3.4 en page 91.

Tableau II-1 : pH, nature et quantité du tampon (mM) et milieu utilisés lors des différentes expériences de fermentation

Expérience	Chapitre	pH	Substrat/Inoculum (gDCO <sub>substrat</sub> /gMV <sub>inoculum</sub> )	Tampon MES	Tampon Phosphate	Solution d'oligo-éléments	Milieu Starkey modifié
Fermentation en milieu salin à pH 8	III.1.2	8	15	-	100 mM	X	-
Fermentation en milieu salin à pH 6	III.1.3	6	15	100 mM	-	X	-
Couplage Fermentation / Electrolyse microbienne : Influence des espèces exogènes sur le biofilm électroactif (production de biomasse)	Chapitre V	6	10	50 mM	-	-	X
		7					
		8					

### II.1.1.2. ANALYSE DES DONNEES DE PRODUCTION D'HYDROGENE

Dans les cultures en batch réalisées pour la production d'hydrogène, les courbes de suivi de l'hydrogène ont présenté, en phase de production d'hydrogène, une allure de courbe exponentielle de croissance. L'utilisation d'un modèle a permis de déterminer des paramètres cinétiques de la production d'hydrogène. Le type de modèle le plus rencontré est le modèle de Gompertz modifié qui s'applique principalement dans le cas des cultures pures en batch (Wang and Wan, 2009c; Rafrafi, 2010). Par extension, ce modèle a aussi été utilisé pour les cultures mixtes. L'intérêt de cette courbe est qu'elle fournit une méthode permettant la comparaison des productions par rapport aux données de la littérature. La courbe de Gompertz est décrite par l'équation suivante :

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

Avec :  $H_2(t)$  : hydrogène cumulé en fonction du temps ;  $H_{2max}$  : quantité maximale d'hydrogène produite ;  $V_{max}$  : vitesse de production maximale d'hydrogène ;  $\lambda$  : temps de latence

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

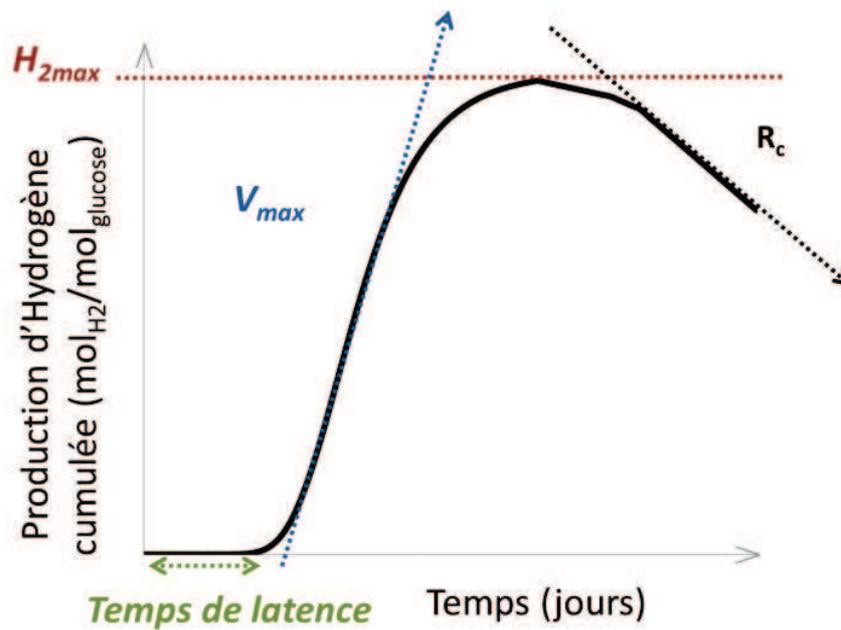


Figure I-1 : Courbe de production d'hydrogène en Batch.

Les paramètres de Gompertz sont obtenus pour la première phase de production d'hydrogène. Les valeurs estimées de  $H_{2max}$  et de  $V_{max}$  correspondent au potentiel de production d'hydrogène (en mol<sub>H<sub>2</sub></sub>/mol<sub>Glucose</sub>) et à la vitesse de production maximale d'hydrogène (en mol<sub>H<sub>2</sub></sub>/mol<sub>Glucose</sub>/jour). La vitesse de consommation  $R_c$  a été estimée par la diminution mesurée expérimentalement de la quantité d'hydrogène, ramenée à la quantité  $H_{2max}$  initiale.

## II.1.2. ELECTROLYSE MICROBIENNE

### II.1.2.1. REACTEURS ELECTROCHIMIQUES

#### II.1.2.1.1. Cellule à trois électrodes

Le système utilisé pour l'étude du biofilm était un système à trois électrodes mettant en jeu une électrode de travail, support du biofilm, une électrode de référence, permettant d'appliquer un potentiel à l'électrode de travail et une contre-électrode permettant de mesurer le courant généré par le biofilm sur l'électrode de travail.

Ces essais dits en « demi-cellule » ont été réalisés dans des réacteurs de 700 mL surmontés d'un couvercle permettant de maintenir 1 à 3 électrodes de travail, une électrode de référence (Ag/AgCl ou ECS), une contre-électrode (grille de platine). Le réacteur était clos hermétiquement grâce à un joint en silicone et une bague à sertir en acier. Le réacteur est maintenu à 37°C grâce à un bain marie maintenu à température avec un thermostat (Polystat). Le milieu est homogénéisé jusqu'à l'adhésion sur l'électrode des espèces électroactives par un barreau aimanté en rotation à 250 rpm.

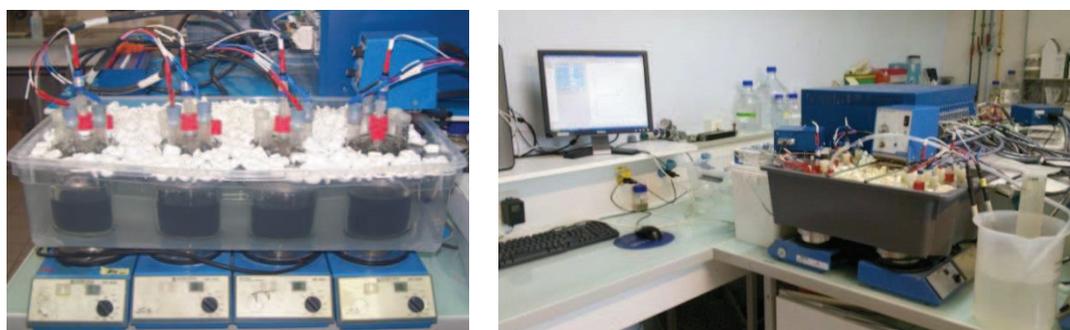


Figure I-2 : Mise en place des réacteurs en demi-cellule dans un bain marie maintenu à 37°C et agité par agitation magnétique à 250 rpm.

#### II.1.2.1.2. N-Stat : Réacteur à plusieurs électrodes de travail

Le dispositif NStat (Bio-Logic SA) permet de placer dans un même bioréacteur plusieurs électrodes de travail pour le développement de biofilms électroactifs. Ces électrodes ont été construites par des plaques de graphite d'une surface totale de 13 cm<sup>2</sup> accrochées sur des tiges de titane (cf. II.1.2.2.1). Le dispositif était complété par une contre électrode de platine et une électrode de référence qui permettait le maintien par le potentiostat (VMP3 BioLogic

Science Instruments) du potentiel appliqué (+0,200 V vs ECS). La contre électrode constituait la cathode du système où se déroule la réduction des protons en dihydrogène. Une sortie gaz et une sortie liquide ont été mises en place pour assurer l'échantillonnage dans les deux phases.

La grille de platine utilisée avec le N-Stat présente la même maille qu'en demi-cellule mais une taille plus grande, de 5x5 cm afin d'assurer une surface non-limitante par rapport à l'électrode de travail en graphite.

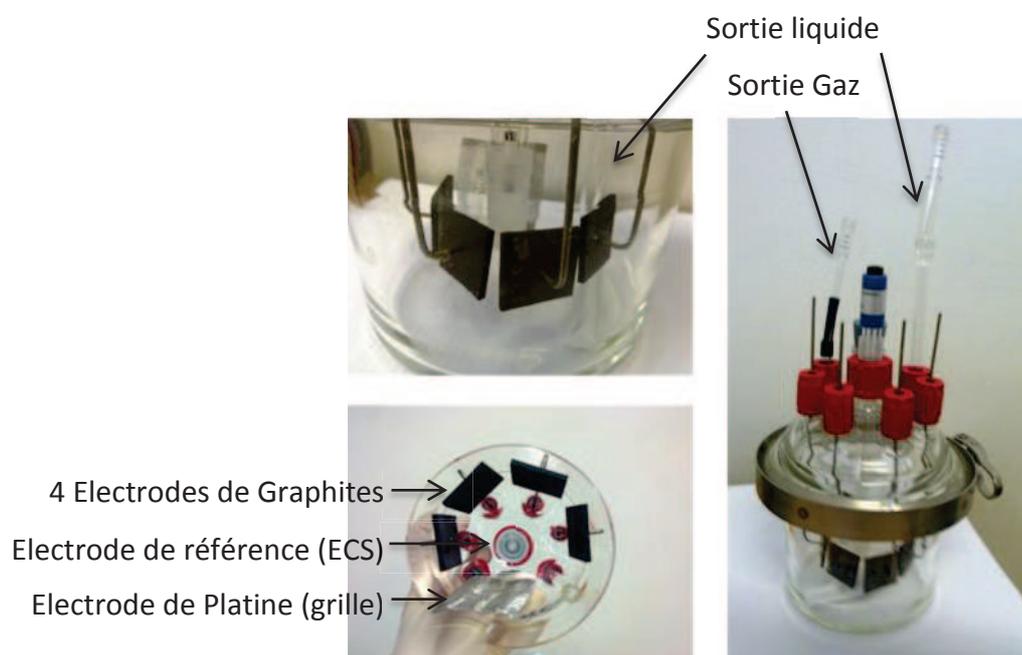


Figure I-3 : Dispositif N-Stat utilisé contenant 4 électrodes de travail en graphite, 1 électrode de référence au calomel saturé (ECS) et une contre électrode en platine (grille)



Figure I-4 : Branchement des électrodes dans un réacteur en configuration N-Stat dans un bain-marie.

## II.1.2.2. MATERIEL ELECTROCHIMIQUE

### II.1.2.2.1. Electrodes

Les électrodes de travail en graphite étaient des plaques de dimension 25 mm x 25 mm x 2 mm (Goodfellow) connectées électriquement par une tige de titane (diamètre 2 mm, Goodfellow) filetée et vissée dans l'électrode. Ces électrodes étaient préalablement nettoyées à l'eau et au papier de verre P800, puis rincées à l'éthanol et conservées dans une solution d'éthanol (50/50 v/v).

Deux types d'électrodes de référence ont été utilisés :

- une électrode au calomel saturé (ECS, Hg/Hg<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Cl)
- une électrode au chlorure d'argent : chlorure d'argent préparé à partir d'un fil d'argent (diamètre 1.5 mm, Goodfellow) plongé successivement dans une solution d'acide nitrique à 65 % puis dans une solution saturée de KCl.

Les électrodes de référence ont été conservées dans une solution de KCl saturée.

Les contre-électrodes correspondaient à des grilles de platine/iridium (90%/10%) (Heraeus) de diamètre de fil 0.25 mm et de largeur de maille 0.75 mm et de dimension totale 25 mm x 25 mm pour les réacteurs à 3 électrodes et 50 mm x 50 mm pour les réacteurs N-Stat. Elles ont été préalablement traitées sous la flamme d'un bec Bunsen pendant une minute avant d'être utilisées.

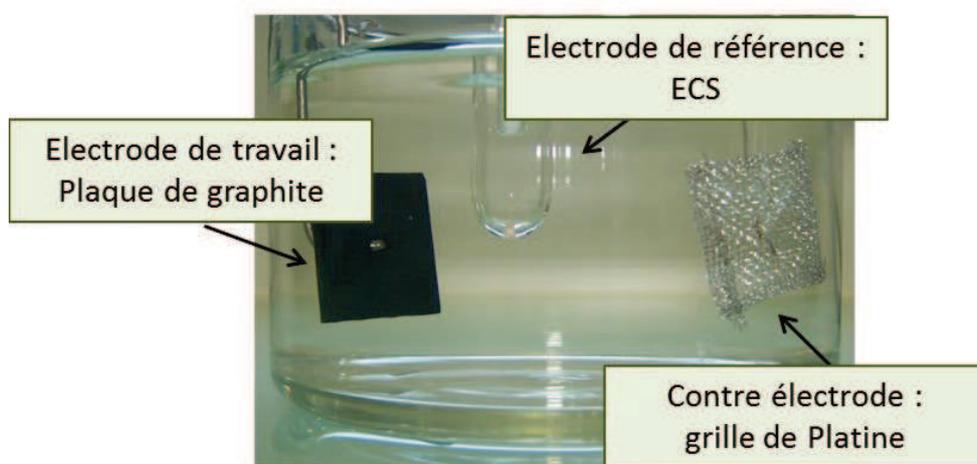


Figure I-5 : Dispositif expérimental à 3 électrodes.

#### II.1.2.2.2. Chrono-ampérométrie

La chronoampérométrie consiste à imposer un potentiel constant à l'électrode de travail et à enregistrer la réponse en production de courant au cours du temps. Les courants enregistrés sont divisés par la surface de l'électrode de travail et sont donc exprimés en densité de courant  $j$  ( $A/m^2$ ).

L'ensemble des mesures électrochimiques a été réalisé avec un multipotentiostat (VMP, Bio-Logic S.A., France) piloté par le logiciel EC-Lab. Le potentiel appliqué était de +0,2 V vs Ag/AgCl ou ECS. Le courant était enregistré toutes les 300 s. La durée totale d'une chronoampérométrie était d'environ 15 jours.

Nota : Plusieurs électrodes de travail placées dans un même milieu peuvent être polarisées indépendamment via une unique électrode de référence et une unique contre-électrode par l'utilisation du dispositif N-Stat (Bio-Logic SA) (cf. II.1.2.1.2).

## II.2. INOCULA ET MILIEUX

Les sédiments utilisés comme inoculum ont été fraîchement prélevés à partir de sédiments de bord du lac salé de Gruissan (Aude) ou de sédiments issus d'un canal de récupération des eaux des plateformes des salins de Saint-Martin à Gruissan. Le pH des sédiments issus des salins de Saint-Martin dans leur milieu était de 8 et la concentration en chlorure de sodium dans les sédiments de  $67,4 \text{ g}_{\text{NaCl}}/\text{L}$ . Ces sédiments contenaient  $0,481 \pm 0,008 \text{ g}_{\text{MS}}/\text{g}_{\text{sédiments}}$  et  $0,042 \text{ g}_{\text{MV}}/\text{g}_{\text{sédiments}}$ . La conductivité de cet inoculum était de  $105,6 \text{ mS/cm}$



Figure I-6 : Sédiments issus des salins de Saint Martin (Gruissan, Aude)

Les inocula « Fermenteur », « curet », « vinasses », « compost » et « sol » ont été utilisés pour une présélection d'inocula. Leurs concentrations en matières sèches et volatiles ainsi que leurs conductivités sont reportées dans le tableau suivant :

Tableau I-2 : Caractéristiques (MS, MV et conductivité) des inocula utilisés pour la présélection d'un inoculum.

Inoculum	Matières Sèches ( $\text{g}_{\text{MS}}/\text{g}$ )	Matières Volatiles ( $\text{g}_{\text{MV}}/\text{g}$ )	Conductivité (mS/cm)
Fermenteur	0,018	0,015	5,83
Curet	0,354	0,013	7,15
Vinasses	0,009	0,005	5,71
Compost	0,023	0,005	5,80
Sol	0,079	0,006	6,03

## II.3. ANALYSES PHYSICO-CHIMIQUES

---

### II.3.1. MESURE DE LA CONCENTRATION EN ACIDES GRAS VOLATILS (AGV) PAR CPG

---

L'analyse des acides gras volatils (AGV) a été réalisée à l'aide d'un chromatographe GC Clarus 580 (Perkin Elmer). Les échantillons liquides étaient contenus dans des flacons de 1 mL disposés dans un passeur automatique. Chaque flacon contenait 300  $\mu\text{L}$  d'échantillon et 300  $\mu\text{L}$  d'une solution d'étalon interne d'acide éthyl 2 butyrique à 1 g/L. Une seringue prélevait automatiquement 0,5  $\mu\text{L}$  d'échantillon et le plaçait dans l'injecteur, chauffé à 250°C. La colonne utilisée est une ELITE FFAP, 15000 x 0,53 mm, (Perkin Elmer). Le four était chauffé sous un gradient de température de 80 à 120°C. Le gaz vecteur était de l'azote à 6mL/min. La température de l'injecteur était fixée à 250°C et celle du détecteur FID à 280°C.



Figure I-7 : Chromatographe GC Clarus 580 (Perkin Elmer) et son passeur automatique

### II.3.2. MESURE DE LA CONCENTRATION DES ACIDES ORGANIQUES PAR HPLC

---

Les concentrations en sucres résiduels et sous-produits métaboliques tels que les acides organiques (lactate, formate, AGV) et les alcools (éthanol, butanol...) ont été mesurées par chromatographie liquide haute performance (HPLC). Après centrifugation à 20 000 g pendant 10 minutes le surnageant de l'échantillon est récupéré et est directement placé sur le passeur. L'HPLC était équipée d'un passeur automatique et couplée à un réfractomètre (Waters R410). Une pré-colonne (Micro guard cation H refill cartbridges, Bio-Rad) était disposée en amont de la colonne pour filtrer les éventuels résidus de l'échantillon. Au moment de l'analyse, 10 $\mu\text{L}$  d'échantillon étaient injectés dans la colonne à l'aide d'une seringue automatique. Les composés étaient séparés en utilisant une colonne Aminex HPX-

87H, 300 x 7,8 mm (Bio-Rad) placée dans un four. Une solution d'  $\text{H}_2\text{SO}_4$  à  $0.222 \mu\text{l.L}^{-1}$  était utilisée comme éluant.

La température de la colonne était fixée à  $35^\circ\text{C}$ , la température du réfractomètre à  $40^\circ\text{C}$  et le débit de l'éluant à  $0,4 \text{ mL.min}^{-1}$ .



Figure I-8 : Chromatographe liquide haute performance (HPLC)

### **II.3.3. MESURE DE LA CONCENTRATION EN BIOMASSE**

---

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

Les sédiments ont été introduits dans un creuset en porcelaine préalablement séché et pesé. Le creuset a été mis à l'étuve à  $105^\circ\text{C}$  pendant 24 heures. L'eau ainsi évaporée, il ne reste dans le creuset que les matières en suspension (MS). Le creuset est ensuite pesé après refroidissement dans un dessiccateur. La différence de masse entre le creuset après son passage à l'étuve et le creuset vide correspond donc aux MS de l'échantillon. En considérant la masse de liquide initial, la mesure est exprimée en  $\text{g.g}_{\text{sédiments}}^{-1}$ .

Le creuset a ensuite été mis au four à  $550^\circ\text{C}$  pendant 2 heures. Après refroidissement le creuset a de nouveau été pesé, ne restant plus que les matières minérales. La masse des MV est obtenue par différence entre la masse des MS et la masse des matières minérales.

### II.3.4. MESURE DE LA COMPOSITION DE BIOGAZ

---

La composition du gaz a été déterminée à partir d'un prélèvement effectué directement dans le ciel gazeux de la fiole ou du réacteur à l'aide d'une seringue. Ainsi, 0,2 mL de gaz a été analysé par chromatographie en phase gazeuse.

La composition en biogaz ( $O_2$ ,  $CO_2$ ,  $CH_4$ ,  $H_2$  and  $N_2$ ) a été analysée à l'aide d'un chromatographe (Clarus 580, Perkin Elmer) équipé de deux colonnes : une colonne RtQBond et un tamis moléculaire (Molsieve, 5Å), ainsi que d'un détecteur de conductivité thermique (TCD). La première colonne (RtQBond) était utilisée pour séparer  $H_2$ ,  $O_2$ ,  $N_2$ , et  $CH_4$  et la seconde (RtMolsieve) pour séparer le  $CO_2$  des autres gaz. La calibration a été réalisée avec un gaz standard (Linde™) composé de 25%  $CO_2$ , 2%  $O_2$ , 10%  $N_2$ , 5%  $H_2$  et 58%  $CH_4$ . Toutes les valeurs de potentiel hydrogène sont exprimées en conditions standards ( $0^\circ C$ , 1013hPa).

Le gaz vecteur utilisé était de l'argon placé à une pression initiale de 3.5 bar. La température du four était de  $60^\circ C$ , celle de l'injecteur, de  $250^\circ C$  et celle du détecteur de  $150^\circ C$ . La détection a été réalisée à l'aide d'un détecteur de conductivité thermique (principe du pont de Wheatstone) dont l'intensité du courant était fixé à 40 mA.



Figure I-9 : Chromatographe Clarus 580 (Perkin Elmer)

### II.3.5. MESURE DE LA CONDUCTIVITE

---

La conductivité (mS/cm) et la salinité (g/L) ont été mesurées à l'aide d'un conductimètre Multi 340i (WTW) équipé d'une cellule de mesure de conductivité (TetraCon® 325)

## **II.4. ANALYSES MICROBIOLOGIQUES**

---

### **II.4.1. EXTRACTION DE L'ADN**

---

Une méthode spécifique d'extraction d'ADN a été sélectionnée car elle permet d'obtenir de bons résultats malgré des échantillons contenant des inhibiteurs et/ou peu de matière.

Les échantillons provenant des différents bioréacteurs ont été traités selon cette méthode d'extraction. Pour éviter sa dégradation lors de sa décongélation, l'ADN a d'abord été protégé par l'ajout de guanidine et N-LS 10%. Puis le mélange de Lauryl-sarosine 5% – tampon phosphate 0,1 M a permis la lyse des membranes bactériennes (activité du détergent ionique). Les échantillons ont été homogénéisés à l'aide d'un vortex pendant une minute puis ont été incubés une heure dans un bain-marie à 70°C. Les échantillons ont ensuite été placés pendant 30 secondes et à vitesse maximale dans un vibro-broyeur (FastPrep 24® MP™) après l'ajout de 500 µL de billes de zirconium. Environ 15 mg de PVPP (Polyvinylpolypyrrolidone) ont été ajoutés aux mélanges pour fixer certains inhibiteurs de la polymérase (acides humiques). Un passage au vortex et une centrifugation de 3 minutes à vitesse maximale a permis de récupérer les surnageants.

Les culots contenant les billes de zirconium ont été traités par trois lavages successifs au TENP (Tris-Cl 50mM, EDTA pH 8 20mM, NaCl 100mM et PVPP 1%). Cette étape permet de récupérer une quantité maximale d'ADN, d'éliminer les inhibiteurs de la polymérase et de chélater les cofacteurs des ADNases et autres enzymes dégradant le matériel génétique en empêchant ainsi leur action. Ces lavages se sont déroulés par ajout successif de 500 µL du mélange TENP, suivi de 3 minutes de centrifugation à 20 000 g. Les surnageants récupérés ont été mélangés dans un même tube Eppendorf de 2 mL par échantillon.

La précipitation de l'ADN et l'élimination des impuretés résiduelles ont été réalisées comme suit : les surnageants sont répartis en deux tubes de 1 mL dans lesquels un volume d'isopropanol a dû être ajouté (1 mL). Une agitation lente est appliquée aux tubes. Les échantillons sont ensuite laissés 10 minutes à température ambiante. Après 15 minutes de centrifugation à 20 000 g, les culots ont été récupérés dans de l'eau pour préparations injectables (ppi) et réunis. Cette étape de purification d'ADN a alors été complétée par un ajout de RNase à 1mg/mL, un passage au vortex et une incubation de 10 minutes à 37°C.

L'ADN a été purifié selon le protocole du kit QIamp DNA stool® Mini Kit.

Après les étapes d'extraction et de purification, la pureté et la quantité d'ADN extraits ont été vérifiées par mesure des absorbances à 260 et 280 nm (spectromètre Infinite M 200 NanoQuant, Tecan). Le ratio  $DO_{260nm}/DO_{280nm}$  permet de vérifier la pureté de l'ADN. Il doit être compris entre 1,8 et 2.



Figure I-10 : spectromètre Infinite M 200 NanoQuant (Tecan)

#### II.4.2. AMPLIFICATION DE L'ADN PAR PCR

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

Dans le cas de la PCR précédant la SSCP, la région V3 du gène codant l'ARNr 16S (d'environ 200 pb) a été amplifiée pour cibler spécifiquement les bactéries à l'aide des amorces universelles W49 et W104. Afin de permettre la détection du fragment amplifié par le laser de la CE-SSCP, l'amorce w104 était marquée par un fluorochrome. Chaque mix PCR (50  $\mu$ L) contenait 36,9  $\mu$ L d'H<sub>2</sub>O pure, 5  $\mu$ L de tampon 10x Pfu Turbo, 4  $\mu$ L de dNTP (2,5 mM), 1,3  $\mu$ L de W49 (100ng. $\mu$ L<sup>-1</sup>), 1,3  $\mu$ L de W104 (100ng. $\mu$ L<sup>-1</sup>), 0,5  $\mu$ L Pfu Turbo (2,5 U/ $\mu$ L) et 1  $\mu$ L d'ADN (dilué si nécessaire). Les différents cycles de la PCR ont été réalisés dans un Mastercycler egradient S (Eppendorf) (Figure I-11). La région V3 a été amplifiée en appliquant le programme suivant : 2 minutes de dénaturation de l'ADN à 94°C, puis 25 cycles de 30 secondes de dénaturation à 94°C, 30 secondes d'hybridation à 61°C et 30 secondes de

ligation à 72°C. Une fois les 25 cycles terminés, une étape d'élongation finale de 10 minutes à 72°C a été effectuée.

L'efficacité des PCR a été vérifiée à l'aide du Bioanalyzer 2100 (Agilent) (Figure I-11) qui permet l'analyse des produits PCR par électrophorèse miniaturisée. L'ajout d'un marqueur fluorescent a permis de détecter les fragments d'ADN par fluorescence aux UV induite par un laser. Cette technique est basée sur le principe de l'électrophorèse qui permet de séparer les brins d'ADN en fonction de leur poids moléculaire. Les acides nucléiques, chargés négativement, migrent sous l'effet d'un champ électrique. La séparation s'effectue au travers d'un gel matrice. Le maillage est plus ou dense selon le pourcentage d'agarose. Plus les molécules sont petites plus elles migrent rapidement. L'intensité des bandes permet d'estimer les dilutions à effectuer pour la CE-SSCP.



Figure I-11 : à gauche : Mastercycler epgradient S (Eppendorf) pour l'amplification de l'ADN par PCR, à droite : Bioanalyzer 2100 (Agilent) pour l'analyse des produits de PCR.

#### II.4.3. QUANTIFICATION DES COMMUNAUTE MICROBIENNES PAR PCR QUANTITATIVE

---

La PCR quantitative permet le suivi en continu (« en temps réel ») du processus d'amplification par PCR en détectant la fluorescence émise par le produit PCR. La quantification se fait en comparant l'échantillon étudié amplifié à un échantillon de référence. Une quantification absolue de l'échantillon testé pourra être obtenue en nombre de copies grâce à l'utilisation comme référence d'un échantillon où le nombre de molécule est connu.

La réaction de quantification des bactéries par PCR quantitative (qPCR) a été réalisée dans des plaques RT-PCR 96 puits (Eppendorf) par un Mastercycler ep realplex2S (Eppendorf). L'amplification a été réalisée pour les bactéries dans 25 µL de mélange PCR contenant 12,5 µL d'Express qPCR Supermix pré-mélangé à du ROX (Invitrogen), 5 µL d'ADN dilué, 100 nM de l'amorce BAC338F, 250 nM de l'amorce BAC805R, et 50 nM de sonde TaqMan, complétés avec de l'eau pure pour obtenir le volume réactionnel souhaité. Le programme de température appliqué était de 95°C pendant 2 min, suivi de 40 cycles de 15 s à 95°C, 1 min à 60°C. Une courbe de référence a été générée pour chaque essai en utilisant 10 degrés de dilution d'un produit PCR provenant de clones connus. Le clone DF10 a été utilisé comme standard de référence pour les bactéries. Chaque échantillon est testé en 3 dilutions.

#### **II.4.4. CARACTERISATION DE LA COMMUNAUTE MICROBIENNE PAR CE-SSCP**

---

Les empreintes moléculaires, basées sur la mise en évidence de la variabilité de longueur et/ou de séquence nucléotidique des fragments amplifiés, permettent d'avoir rapidement une image représentative de l'ensemble de la communauté microbienne.

La technique d'analyse de polymorphisme de conformation d'acides nucléiques simples brins par électrophorèse capillaire (CE-SSCP : Capillary Electrophoresis Single Strand Conformation Polymorphism) est basée sur la migration différentielle des brins d'ADN simple brin selon leur structure secondaire (Figure I-12). La migration a été réalisée, en CE-SSCP, dans un séquenceur équipé de capillaires, contrairement aux méthodes classiques d'électrophorèse sur gel en gradient (DGGE, TGGE ou TTGE). Elle est donc plus précise, reproductible et permet d'analyser un plus grand nombre d'échantillons. Le principe de cette méthode réside dans le marquage de l'une des deux amorces utilisées en PCR un fluorophore. En conséquence, un seul des deux brins des fragments néoformés est marqué. Les fragments ont ensuite été dénaturés thermiquement (à 95°C) puis refroidis brusquement (à 0°C). Chaque fragment d'ADN simple brin adopte alors une conformation tridimensionnelle secondaire unique et répétable. La formamide déionisée permet de maintenir cette conformation. Cette dernière dépend de la composition en bases azotées (A, G, C ou T) du fragment d'ADN et de la succession de ces bases azotées. Lors de la migration électrophorétique de l'ADN simple brin dans le capillaire, la masse moléculaire et la structure secondaire de chaque brin définissent la vitesse de migration de chaque fragment.

Lors de leur passage devant un détecteur laser, l'intensité de fluorescence émise est mesurée et transcrite sous la forme d'un pic. Elle est proportionnelle au nombre de brins marqués de même conformation. Chaque pic représente une « espèce moléculaire ». Cependant des phénomènes de co-migration peuvent intervenir et plusieurs espèces différentes peuvent générer un même pic.

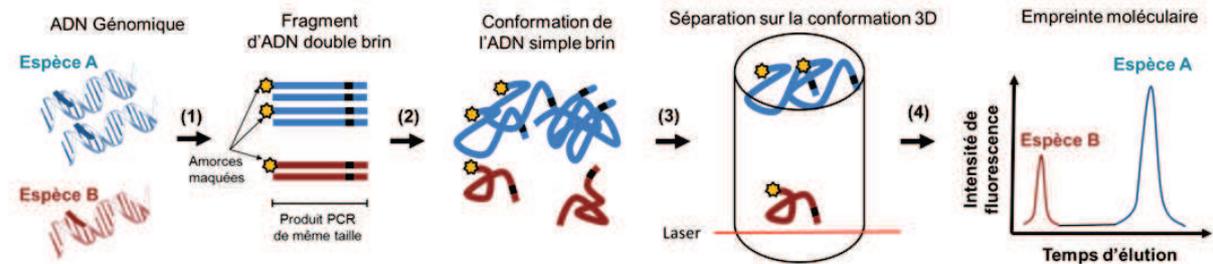


Figure I-12 : Principe de la CE-SSCP (Braun, 2012)

Un volume de 1  $\mu\text{L}$  de produit PCR amplifié à l'aide du couple d'amorces W49/W101 marqué en 5' (fluorophore FAM) a été dilué dans de l'eau ppi, de manière à ce que la fluorescence émise ne dépasse pas la limite de détection du laser. 1  $\mu\text{L}$  de chaque dilution a ensuite été déposé dans une plaque 96 puits avec 18.8  $\mu\text{L}$  de formamide et 0.2 %L de standard interne GeneScan ROX (Applied Biosystems). Ce dernier permet d'attribuer à chaque fragment une position de migration spécifique de sa structure secondaire, donc de sa séquence. Les échantillons ont ensuite été dénaturés par chauffage (5 min à 95°C), puis refroidis rapidement (10 min dans de la glace).

L'électrophorèse a été réalisée en séquenceur par l'ABI Prism 3130 genetic analyser (Applied Biosystems, Figure I-13). Les fragments d'ADNr 16S migrent dans un capillaire (47cm $\times$ 50 $\mu\text{m}$ ) rempli à 5,6% d'un polymère d'analyse de conformation (GeneScan polymer, Applied Biosystems). Chaque amorce marquée par un fluorophore est détectée par le laser de l'appareil, qui transcrit le signal sous la forme d'un pic où chaque pic correspond à un fragment d'ADN. La migration de chaque échantillon a été réalisée à 32°C sous une intensité de courant de 12 kV pendant 320 minutes.



Figure I-13 : Séquenceur capillaire SSCP ABI Prism 3130 genetic analyser

Chaque profil CE-SSCP a été aligné avec un standard interne ROX pour corriger toute modification de la mobilité électrophorétique entre les différents passages. La somme des surfaces des pics a été normalisée à l'unité avant l'analyse statistique. La complexité des communautés microbiennes a été estimée en utilisant l'indice de Simpson (D) à partir des profils (Simpson 1949). Cet indice a été calculé à partir du nombre de pic et de leur abondance relative (aire sous les pics) avec à la formule suivante :

$$D = -\ln(\sum(\text{aire des pics})^2)$$

Ces étapes de traitement des profils ont été réalisées à l'aide du package StatFingerprints (Michelland et al., 2009) sur la version 2.11.1 de R (R. Development Core Team, 2010)

Une analyse en composante principale (ACP) a été faite en utilisant le logiciel R (Michelland et al., 2009) afin de visualiser et analyser rapidement les corrélations entre les profils CE-SSCP, de visualiser et d'analyser les observations initialement décrites par les variables sur un graphique à deux dimensions, construit de manière à ce que la dispersion entre les données soit aussi bien préservée que possible. L'ACP est une méthode de projection permettant de visualiser une série de données dans des dimensions réduites. Cette étape a permis de comparer sur un graphique, les relations entre les profils CE-SSCP entre eux. En pratique, les profils SSCP sont divisés en 824 parties (correspondant aux scans individuels du laser). Les individus consistent à chaque profil SSCP et les variables à chacune des 824 parties du profil.

## II.4.5. PYROSEQUENÇAGE

Le séquençage permet de déterminer l'enchaînement des nucléotides d'une séquence d'ADN donnée. Cette méthode consiste à séquencer un ADN monobrin par synthèse du brin complémentaire, base par base, en détectant pour chaque étape le nucléotide qui a été ajouté. Le pyroséquençage par la technologie 454-FLX Titanium a pour avantage d'être rapide et moins coûteux que les méthodes de séquençage classiques. Les échantillons d'ADN sont amplifiés dans une émulsion de fines gouttelettes, puis sont fixés sur des billes et placés dans des micropuits où s'effectuent le pyroséquençage. Le nucléotide (A, T C, G) est lu dès qu'il s'incorpore à la séquence en synthèse (Figure I-14). Chaque nucléotide est donc incorporé successivement à la réaction (contrairement aux méthodes classiques d'amplification PCR). Chaque nucléotide incorporé dans le brin d'ADN synthétisé libère un pyrophosphate (PPi). Ce PPi est transformé en ATP par une ATPsulfurylase et une luciférase couple cet ATP à une luciférine. Le produit de ce couplage est une oxyluciférine qui émet un signal lumineux capté par le scanner du séquenceur. Le surplus de nucléotides dans le milieu est dégradé par une apyrase. Le processus peut alors se poursuivre avec l'ajout d'un autre nucléotide.

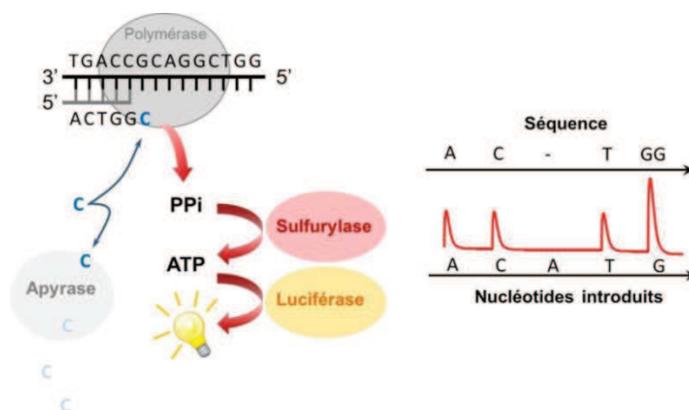


Figure I-14 : Principe du pyroséquençage (Braun, 2012)

Après sélection à partir des profils SCCP, les échantillons d'ADN totaux paraissant comme les plus intéressants ont été envoyés à la société Research and Testing Laboratory (Lubbock, USA). Le séquençage de l'ADNr 16S des bactéries a été réalisé sur GS-FLX 454 Titanium de Roche et les analyses bioinformatiques standard (contrôles qualité du process, qualité des séquences, groupement en OTU) ont été réalisées par cette même société. Les noms des espèces indiqués ce travail sont ceux de l'espèce cultivée la plus proche.

---

## CHAPITRE III. FERMENTATION EN MILIEU SALIN

---

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



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

---

---

#### III.1.1. AVANT-PROPOS

---

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

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

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

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

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

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

---

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

---

#### Fermentative hydrogen production under moderate halophilic conditions

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

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

*(DOI: 10.1016/j.ijhydene.2013.08.035)*

#### **Abstract**

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

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

### III.1.2.1. INTRODUCTION

---

The actual increasing interest in hydrogen (H<sub>2</sub>) as a promising clean and sustainable energy carrier is mainly due to its high energy density (122 kJ g<sup>-1</sup>) as well as the high efficiency of fuel cells to convert H<sub>2</sub> to electricity for transportation purposes (Hawkes et al., 2007; Hallenbeck, 2009; Guo et al., 2010). Nowadays, most of the hydrogen produced worldwide is generated by natural gas reforming. However, producing hydrogen from fossil fuel produce more than twice carbon oxide equivalent compared to biohydrogen and contribute to resource depletion (Das and Veziroglu, 2001; Hajjaji et al., 2013). Developing alternatives technologies to produce hydrogen from renewable energy sources and minimizing their environmental impact are therefore of high priority. Producing hydrogen in biological processes is considered more environmentally friendly and sustainable than from conventional techniques. Particularly, dark fermentation is a process that aims at producing biohydrogen and treating organic waste at the same time (Hallenbeck and Benemann, 2002; Hawkes et al., 2007; Rittmann, 2008; Hallenbeck, 2009; Wang and Wan, 2009a, 2009b; Guo et al., 2010). During anaerobic digestion of those compounds, several microbial metabolism pathways outcompete for hydrogen which is a key intermediate in the trophic chain, as electron carrier (Figure III-1). When applying specific operating conditions (low pH, high substrate/inoculum ratio), consumption and concurrent routes for hydrogen production can be avoided (Guo et al., 2010).

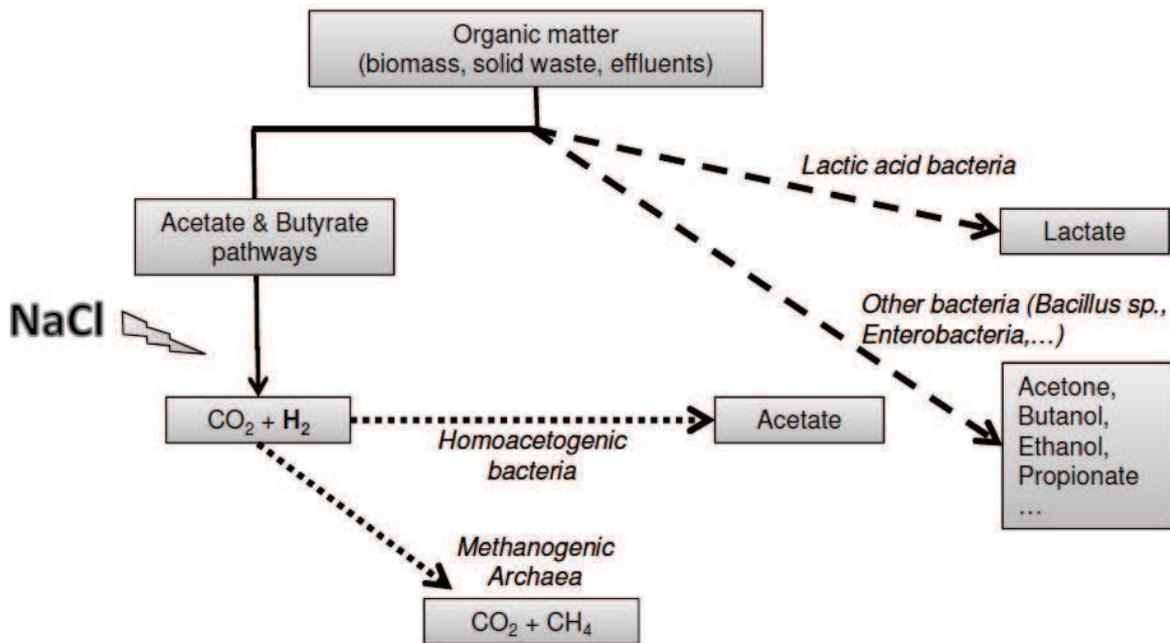


Figure III-1 : General pathways for hydrogen production. Bold arrows are represented for hydrogen production pathways, dotted arrows for hydrogen consumption pathways and dashed arrows for hydrogen production concurrent routes (adapted from Guo et al. (2010)).

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

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

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

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

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

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

### **III.1.2.2. MATERIALS AND METHODS**

---

#### **III.1.2.2.1. Source of inoculum**

The seed sediment used for hydrogen production was sampled in a lagoon collecting wastewaters from a salt factory. The sediments were filtrated through a 2 mm sieve and stored at lab temperature before inoculation. The initial pH of the sediments was 8.5 and the salinity 67.4 g<sub>NaCl</sub> L<sup>-1</sup>.

#### **III.1.2.2.2. Hydrogen production in batch tests**

Hydrogen production experiments were performed in 600 mL glass bottles in batch conditions. About 1.5 g of the seed sediment was added to the culture medium to obtain a final concentration of 300 mg<sub>VS</sub> L<sup>-1</sup> (final working volume of 200 mL). The culture medium was composed of 100mM phosphate buffer, 5 g L<sup>-1</sup> glucose and a solution oligoelements with the following final concentrations : 7.50 g L<sup>-1</sup> FeCl<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, 0.30 g L<sup>-1</sup> H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O, 0.59 g L<sup>-1</sup> MnSO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O, 0.13 g L<sup>-1</sup> CoCl<sub>2</sub>, 6H<sub>2</sub>O, 0.35g L<sup>-1</sup> ZnCl<sub>2</sub>, 0.13 g L<sup>-1</sup> NiCl<sub>2</sub>,6H<sub>2</sub>O, 0.075 g L<sup>-1</sup> CuCl<sub>2</sub>,2H<sub>2</sub>O, 0.13 g L<sup>-1</sup> NaMoO<sub>4</sub>,2H<sub>2</sub>O , 0.8 g L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl. The initial pH was adjusted to 8 using NaOH (1M). All batch tests were carried out in triplicate. To ensure anaerobic conditions, each bottle headspace was flushed and purged with nitrogen gas after inoculation for 5 min. Composition of headspace gas was checked and oxygen content was less than 0.5% in all bottles. Then, the bottles were capped with a rubber stopper and incubated at 35°C for more than 20 days. Two-milliliter aliquots were periodically collected and centrifuged (20,000g, 10 min). Supernatants and pellets were stored at -20°C. Supernatants were used for further chemical analysis and pellets for DNA extraction.

### III.1.2.2.3. Chemical analyses

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

Biogas production volume was periodically estimated by measuring the gas pressure in headspace. Biogas composition (CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> and N<sub>2</sub>) was determined using a gas chromatograph (Clarus 580, Perkin Elmer) coupled to Thermal Catharometric detection (TCD), as described elsewhere (Quéméneur et al., 2012).

### III.1.2.2.4. Data analysis

To assess accurately H<sub>2</sub> production performances, cumulative H<sub>2</sub> production curves were fitted to a modified Gompertz equation for each batch experiment, as proposed by Quéméneur et al. (Quéméneur et al., 2011) :

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

where H<sub>2max</sub> corresponds to the maximum experimental H<sub>2</sub> yield (in mol<sub>H<sub>2</sub></sub> mol<sub>Glc</sub><sup>-1</sup>), V<sub>max</sub> : the maximum H<sub>2</sub> production rate (in mol<sub>H<sub>2</sub></sub> mol<sub>Glc</sub><sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>), λ the lag phase (in days), and t the incubation time (in days) (see Figure III-2).

Specific H<sub>2</sub> consumption rates R<sub>c</sub> (in d<sup>-1</sup>) (Figure III-2) were estimated from the H<sub>2</sub> decrease in cumulative H<sub>2</sub> values at H<sub>2max</sub> time and at the end of the experiment, that was then normalized according to the corresponding H<sub>2max</sub> value.

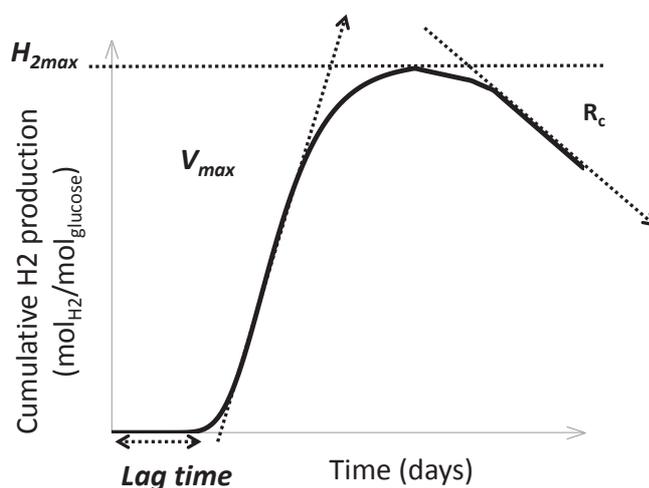


Figure III-2 : Representation of H<sub>2</sub> production dynamics from a mixed culture cultivated with glucose as substrate in batch.

The estimated values of  $H_{2max}$ ,  $V_{max}$  and Lag time correspond to the H<sub>2</sub> production potential (molH<sub>2</sub> molGlc-1), the maximum H<sub>2</sub> production rate (molH<sub>2</sub> molGlc-1 day<sup>-1</sup>) and the lag phase time (day), respectively. The  $R_c$  value corresponds to the H<sub>2</sub> consumption rate and was estimated by the H<sub>2</sub> decrease measured experimentally between the  $H_{2max}$  time and the end of the experiments, and then normalized according to  $H_{2max}$  value.

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

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

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

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

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

#### III.1.2.2.6. Statistical analyses of CE-SSCP fingerprints

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

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

### III.1.2.3. RESULTS AND DISCUSSION

#### III.1.2.3.1. Hydrogen production performances according to NaCl concentrations

Throughout the batch experiments, no CH<sub>4</sub> was detected in head space, and only H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> were found as gaseous products. The Gompertz model showed a good fit with the experimental H<sub>2</sub> production data, with determination coefficients  $r^2$  over 0.994 for all batch tests. Figure III-3 presents the hydrogen production parameters according to NaCl concentrations. The maximum hydrogen production yield ( $H_{2max}$ ) decreased from 0.65 ( $\pm 0.01$ ) mol<sub>H<sub>2</sub></sub> mol<sub>Glucose</sub><sup>-1</sup> to 0.42 ( $\pm 0.02$ ) mol<sub>H<sub>2</sub></sub> mol<sub>Glucose</sub><sup>-1</sup> when NaCl concentrations increased from 9 g<sub>NaCl</sub> L<sup>-1</sup> to 19 g<sub>NaCl</sub> L<sup>-1</sup>. This result was consistent with previous studies that showed an inhibition of fermentative hydrogen production at low NaCl concentrations (less than 30 g<sub>NaCl</sub> L<sup>-1</sup>) with the same substrate (glucose) (Zheng et al., 2005; Alshiyab et al., 2008). Alshiyab et al (Alshiyab et al., 2008) showed that *Clostridium butylicum* presented a decrease of hydrogen productivity (18% less) from 0 to 5 g<sub>NaCl</sub> L<sup>-1</sup> at slight lower pH and temperature conditions (pH 7, 30°C). Similarly, Zheng et al (Zheng et al., 2005) showed a continuous decrease of the hydrogen production rate from 0.597 mol<sub>H<sub>2</sub></sub> mol<sub>Sucrose</sub><sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> to 0.089 mol<sub>H<sub>2</sub></sub> mol<sub>Sucrose</sub><sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> with the increase of NaCl concentration from 0 to 30 g<sub>NaCl</sub> L<sup>-1</sup> in a more acidic medium (pH 6) with heat-treated anaerobically digested sludge. In the present study, the first loss in hydrogen production (35% for 9 to 19 g<sub>NaCl</sub> L<sup>-1</sup>) is consistent with these results, but the use of a not heat-treated inoculum made possible the selection of microbial populations that are halophilic tolerant, fermentative and hydrogen-producing rather than sporulating *Clostridium* strains, known to be inhibited by high NaCl concentrations.

By increasing NaCl concentration, maximum hydrogen production ( $H_{2max}$ ) increased constantly up to a maximum value of 0.90 ( $\pm 0.02$ ) mol<sub>H<sub>2</sub></sub> mol<sub>Glucose</sub><sup>-1</sup> at 75 g<sub>NaCl</sub> L<sup>-1</sup>. Interestingly, this NaCl concentration (75 g L<sup>-1</sup>) was very close to the natural salinity of the sediment used as inoculum (67 g L<sup>-1</sup>). This suggested that the hydrogen-producing fermentative bacteria present in the inoculum were already adapted to such high NaCl concentrations.

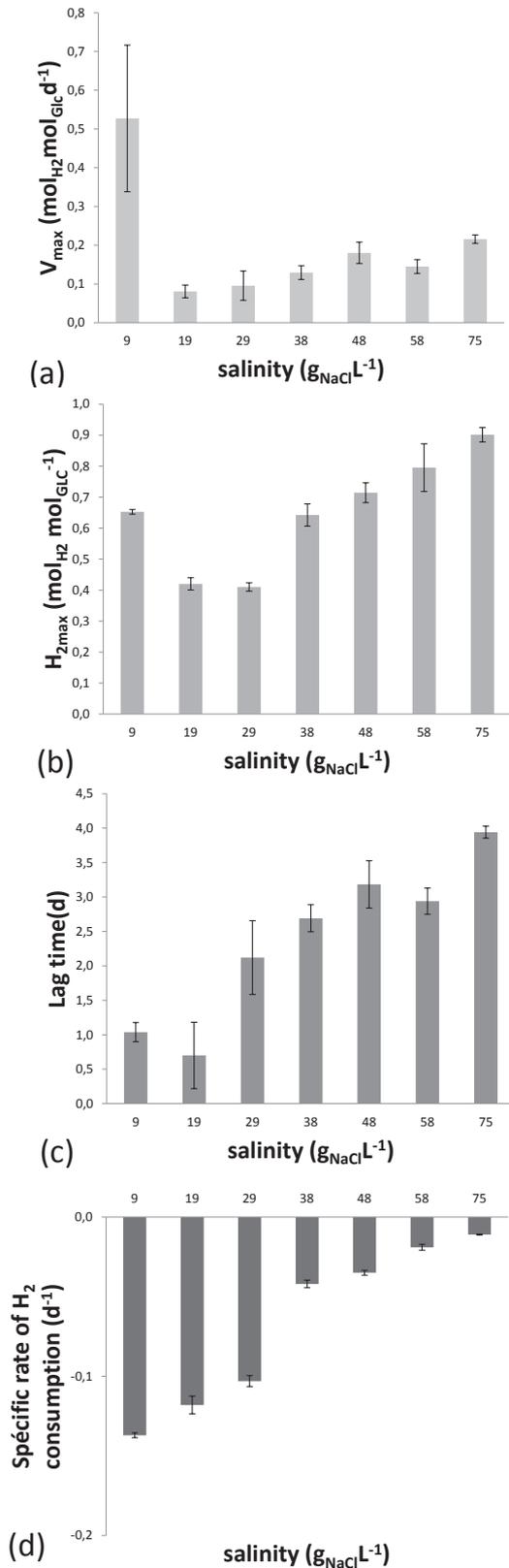


Figure III-3 : Hydrogen production parameters of the modified Gompertz model according to NaCl concentrations.

(a) maximum hydrogen production rate, (b) hydrogen production yield and (c) lag phase (d) H<sub>2</sub> consumption rate.

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

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

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

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

Figure III-4 presents the distribution of the soluble metabolites produced concomitantly with  $\text{H}_2$ . At a physiological NaCl concentration of  $9 \text{ g}_{\text{NaCl}} \text{ L}^{-1}$ , the production of acetate and butyrate as major fermentation products suggests that *Clostridium* spp were the dominant bacteria in the mixed culture. Hydrogen production is also presented on Figure III-4. As the theoretical rate of  $\text{H}_2$  production through the acetate and butyrate pathways is 2 moles  $\text{H}_2$  per mole of acetate or butyrate, the experimental observation of this ratio reflects whether hydrogen is entirely produced by the acetate and butyrate pathways (value close to 2) or if  $\text{H}_2$  is concomitantly consumed by homoacetic or other hydrogen-consuming bacteria causing an overproduction of acetate (lower than 2). Hydrogen consumption results either from homoacetogenesis producing only acetate from  $\text{H}_2$  and  $\text{CO}_2$  or from caproate formation from  $\text{H}_2$  and equimolar amounts of acetate and butyrate. In Figure III-4, a clear consumption pathway is shown with no caproate production, meaning that hydrogen consumption was likely due to the activity of homoacetogenic bacteria already present in the inoculum.

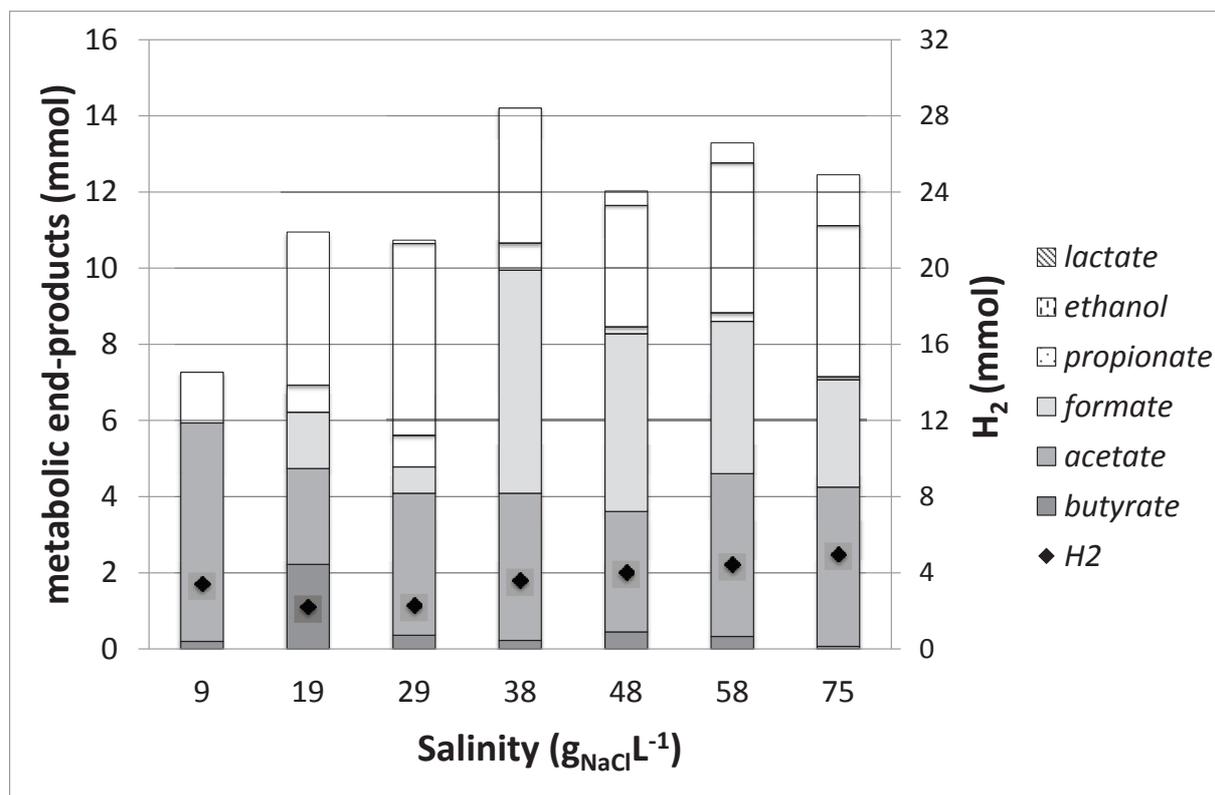


Figure III-4 : Metabolic end-product distribution (in mmoles) and maximal H<sub>2</sub> production (in mmoles) according to NaCl concentrations. The values correspond to the average of three replicates

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

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

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

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

First, the 16S rRNA gene-based CE-SSCP fingerprint profiles of the cultures operated at different NaCl concentrations are presented in Figure III-5 and each profile correspond to the average of three replicates determined at the maximum H<sub>2</sub> production time. Overall, these profiles presented very simple communities structures with an average Simpson diversity index of 0.88±0.05, and the emergence of only one or two main peaks as main dominant bacteria for each salt concentration. A clear shift in bacterial communities was observed from 19 g<sub>NaCl</sub> L<sup>-1</sup> up to the highest NaCl concentration, which is consistent with the results obtained on the distribution pattern of microbial metabolites and hydrogen production performances. According to the literature dealing with fermentative hydrogen producing bacterial community (Quéméneur et al., 2011; Quéméneur et al., 2012), the inoculum was more diverse than the profiles obtained within the reactors, with a Simpson diversity index of 0.98 for the inoculum bacterial community.

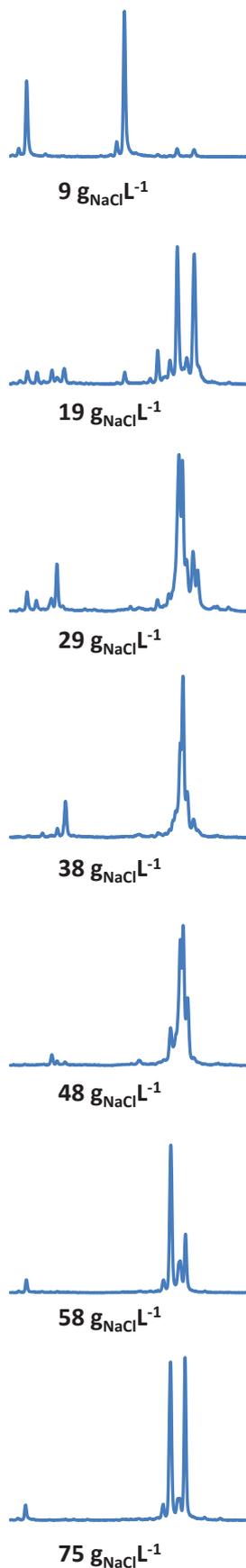


Figure III-5 : CE-SSCP profiles based on 16S rRNA gene fragments retrieved from  $H_2$ -producing mixed cultures supplemented with different NaCl concentration.

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

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

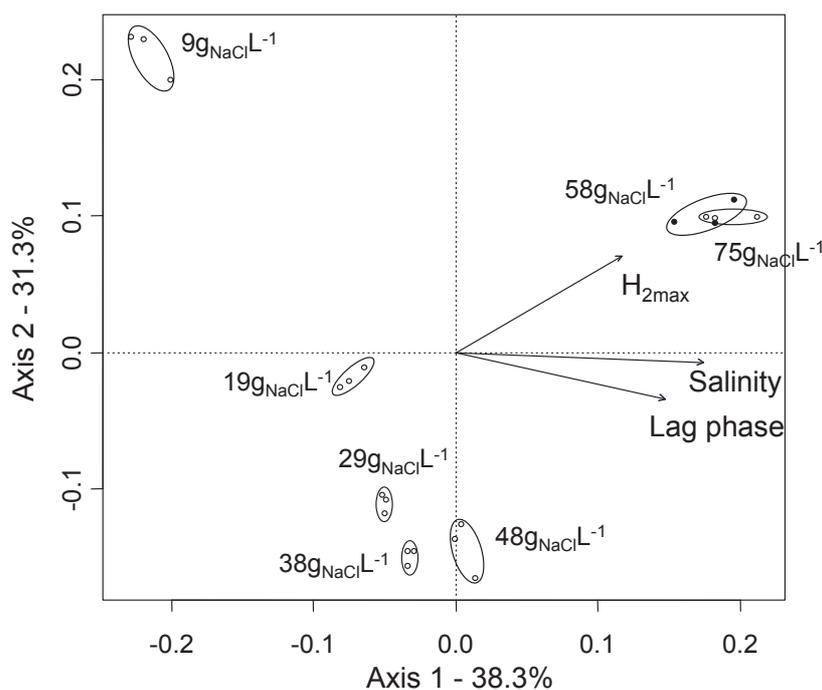


Figure III-6 : Principal Component Analysis (PCA) biplot of CE-SSCP profiles. For each salinity, triplicates were clustered with ovals. The first two principal components (Axis1 and Axis2) explained 69,6% of the genetic variation. Significant linear correlations between changes in genetic profiles and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

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

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

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

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

Species belonging to genera *Clostridium*, *Enterobacter* and *Escherichia* are well-known as highly efficient H<sub>2</sub> producers, often isolated from mixed cultures able to produce hydrogen by dark fermentation in mesophilic conditions (Hawkes et al., 2007; Wang and Wan, 2009a, 2009b; Guo et al., 2010; Quéméneur et al., 2010, 2012; Quéméneur, Hamelin, Benomar, et al., 2011; Quéméneur, Hamelin, Latrille, et al., 2011), which corroborates the results

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

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

from cyanobacterial mats and anaerobic sediments of the saline lagoons of lake Sivash (Crimea) of variable salinities. *Halocella cellulolytica* was able to produce hydrogen by dark fermentation from a large variety of substrates, including glucose, and produces acetate, ethanol, lactate, H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> as fermentation products with cellulose as substrate. The optimal growth parameters for this strain were pH 7, 150 g<sub>NaCl</sub> L<sup>-1</sup>, 39 °C. *Halocella cellulolytica* produced more than 4 mmol<sub>H<sub>2</sub></sub> L<sup>-1</sup> during microcrystalline cellulose breakdown. Oh et al. (Oh et al., 2003) showed recently that five *Vibrio* spp, isolated from anaerobic granular sludge, produced efficiently hydrogen with 1.22 and 1.12 mol<sub>H<sub>2</sub></sub> mol<sub>Glucose</sub><sup>-1</sup> with acetate and ethanol as main metabolites (Figure III-4). Those *Vibrio* spp presented high H<sub>2</sub> conversion properties among 34 isolates but they were not studied under moderate halophilic conditions.

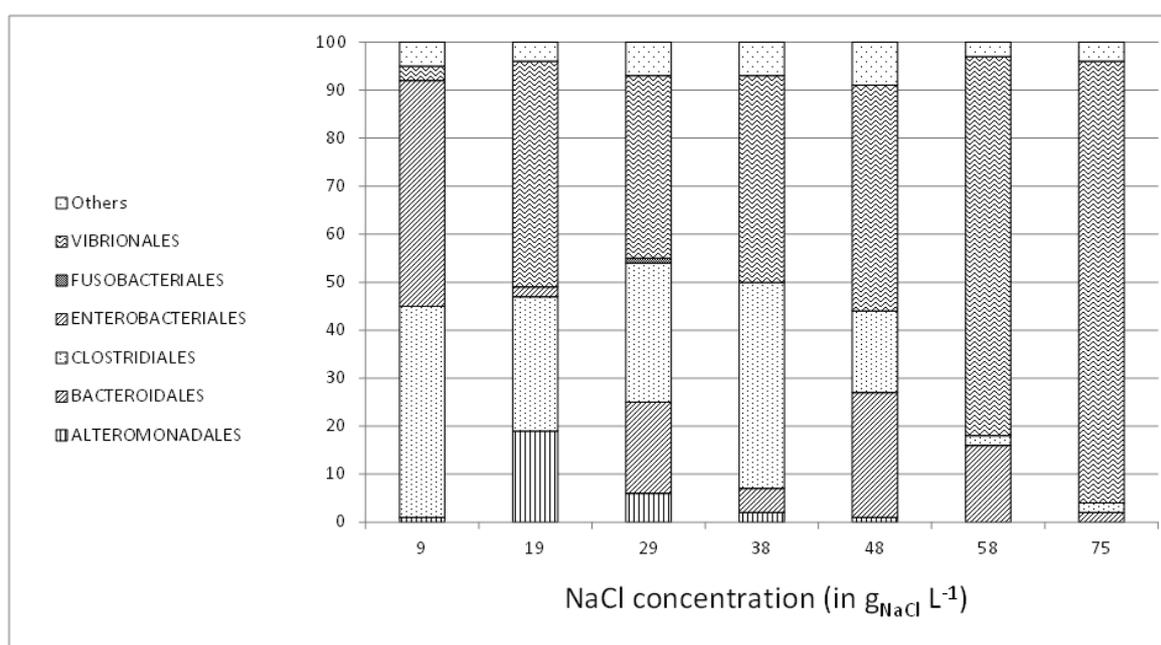


Figure III-7 : Phylogenetic distribution of bacterial orders found at the maximum hydrogen production time and for different NaCl concentrations.

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

#### III.1.2.4. CONCLUSION

---

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

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

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

---

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

#### III.1.3.1. MISE EN ŒUVRE

---

Comme dans l'étude à pH 8, l'inoculum utilisé était des sédiments de salins (salins de Saint Martin à Gruissan dans l'Aude), issus d'un fossé collectant les effluents des salins. Ces sédiments ont été filtrés à 2 mm à l'aide d'un tamis. Le pH initial des sédiments était de 8.5 et la salinité de 67,4 g/L. Environ 1,5g d'inoculum ont été ajoutés au milieu pour obtenir une concentration finale de 300 mg<sub>MV</sub>/L dans un volume liquide final de 200 mL dans des bouteilles de 600 mL. Le pH a été ajusté grâce à une solution tampon de MES (acide 2-(N-morpholino)éthanesulfonique) à 100 mM. La solution d'oligoéléments utilisée était la même que dans les expériences à pH 8 avec les concentrations finales suivantes : 7,50 g/L FeCl<sub>2</sub>,H<sub>2</sub>O, 0,30 g/L H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>,H<sub>2</sub>O, 0,59 g/L MnSO<sub>4</sub>,H<sub>2</sub>O, 0,13 g/L CoCl<sub>2</sub>,6H<sub>2</sub>O, 0,35 g/L ZnCl<sub>2</sub>, 0,13 g/L NiCl<sub>2</sub>,6H<sub>2</sub>O, 0,075 g/L CuCl<sub>2</sub>,2H<sub>2</sub>O, 0,13 g/L NaMoO<sub>4</sub>,2H<sub>2</sub>O, 0,8 g/L NH<sub>4</sub>Cl. Le pH initial a été ajusté avec une solution de soude NaOH (1M). Les expériences ont été réalisées en triplicats. Afin d'assurer l'anaérobiose, l'espace de tête de chaque bouteille a été purgé à l'azote pendant 5 minutes après inoculation. Les bouteilles ont ensuite été fermées avec un bouchon muni d'un septum et incubées à 35°C pendant plus de 20 jours. Un échantillon d'un volume de 2 mL a ensuite été prélevé périodiquement et centrifugé à 20 000g pendant 10 minutes. Le surnageant et le culot de centrifugation ont ensuite été stockés à -20°C pour des analyses chimiques d'AGV et de métabolites et pour l'extraction de l'ADN l'étude des structures de communautés microbiennes par PCR-CE-SSCP.

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

---

Aucune production de méthane n'a été détectée pendant la phase de production d'hydrogène et seules des productions d'hydrogène et de dioxyde de carbone ont été mesurées. La production d'hydrogène en mL<sub>H<sub>2</sub></sub>/g<sub>Glucose</sub> est reportée en Figure Annexe-8 dans

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

La *Figure III-8* présente le taux de conversion maximal d'hydrogène ( $H_{2max}$ ) en fonction de la salinité. Ce taux ( $H_{2max}$ ) varie entre  $0,023(\pm 0,001)$  mol<sub>H<sub>2</sub></sub>/mol<sub>Glucose</sub> pour 50 g<sub>NaCl</sub>/L et  $0,637(\pm 0,013)$  pour 12 g<sub>NaCl</sub>/L (*Figure III-8*). Bien qu'aucune tendance ne soit à noter dans l'influence de la salinité sur le taux production d'hydrogène, ces résultats montrent une meilleure production d'hydrogène à des concentrations moyennes en chlorure de sodium (comprises entre 12 et 41 g<sub>NaCl</sub>/L) qu'à 3 g<sub>NaCl</sub>/L et à plus de 50 g<sub>NaCl</sub>/L. Ces résultats se distinguent des résultats obtenus dans la littérature qui montrent une diminution du taux de conversion de différents substrats en hydrogène avec une augmentation de la salinité du milieu. En effet, les travaux de Zheng et al. (2005) ont montré une diminution constante de la production d'hydrogène à pH 6 de  $0,597$  mol<sub>H<sub>2</sub></sub>/mol<sub>Sucrose-j</sub> à  $0,089$  mol<sub>H<sub>2</sub></sub>/mol<sub>Sucrose-j</sub> en augmentant la concentration en chlorure de sodium de 0 à 30 g<sub>NaCl</sub>/L. De la même façon, Alshiyab et al. (2008) ont montré une inhibition de la production d'hydrogène avec une augmentation de la salinité jusqu'à 30 g<sub>NaCl</sub>/L à un pH plus élevé (pH 7). Cependant dans les travaux précédents de Zheng et al. (2005) et Alshiyab et al. (2008), les inocula utilisés provenaient de milieux non salins et étaient respectivement des boues de digesteur anaérobie prétraitées thermiquement et *Clostridium acetobutylicum* en culture pure. Les différences de tendances obtenues dans nos travaux peuvent être dues à la nature très différente de l'inoculum qui est adapté à une forte salinité car issu d'un environnement salin.

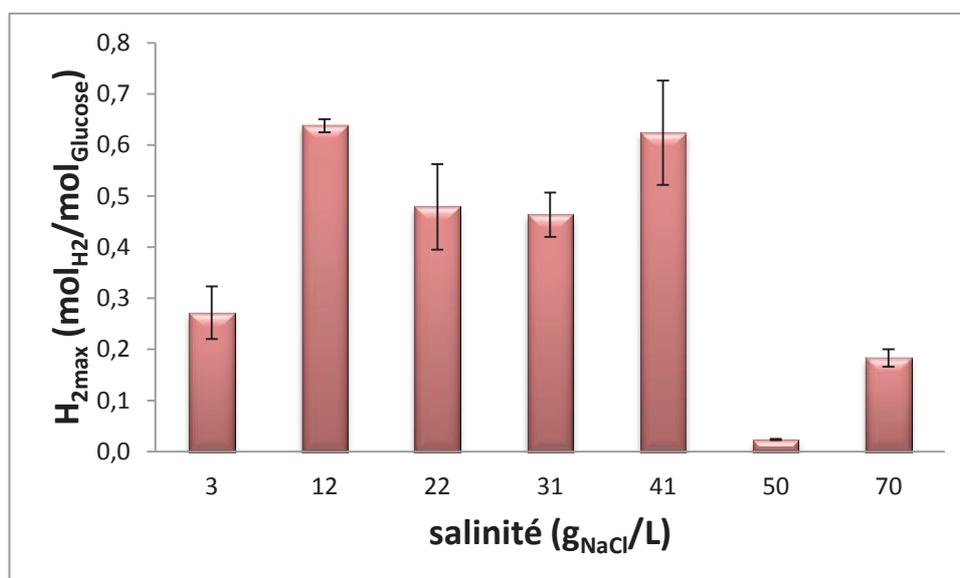


Figure III-8 : Production maximale d'hydrogène à pH 6 en fonction de la salinité (paramètre déterminé à partir du modèle de Gompertz).

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

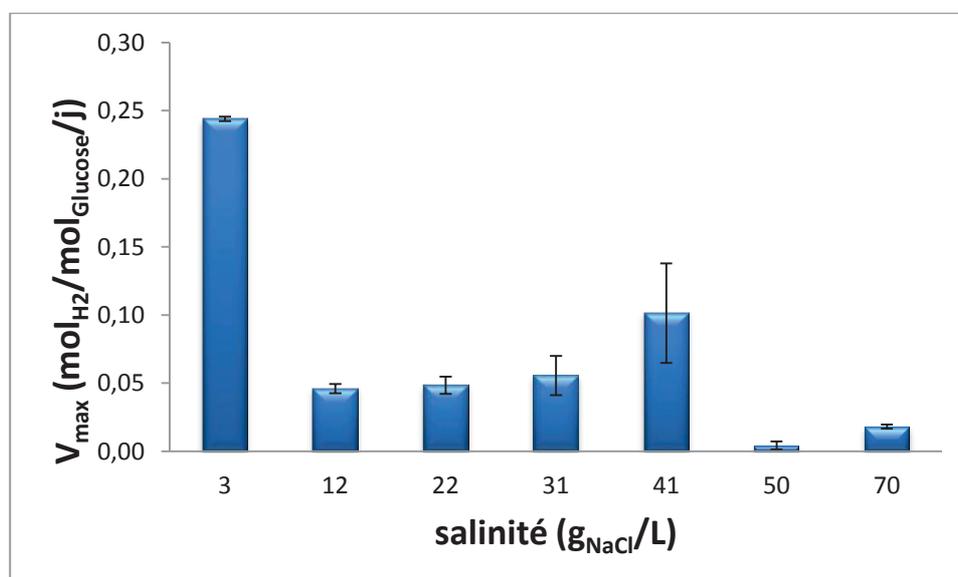


Figure III-9 : Vitesse de production maximale d'hydrogène à pH 6 en fonction de la salinité (paramètre déterminé à partir du modèle de Gompertz).

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

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

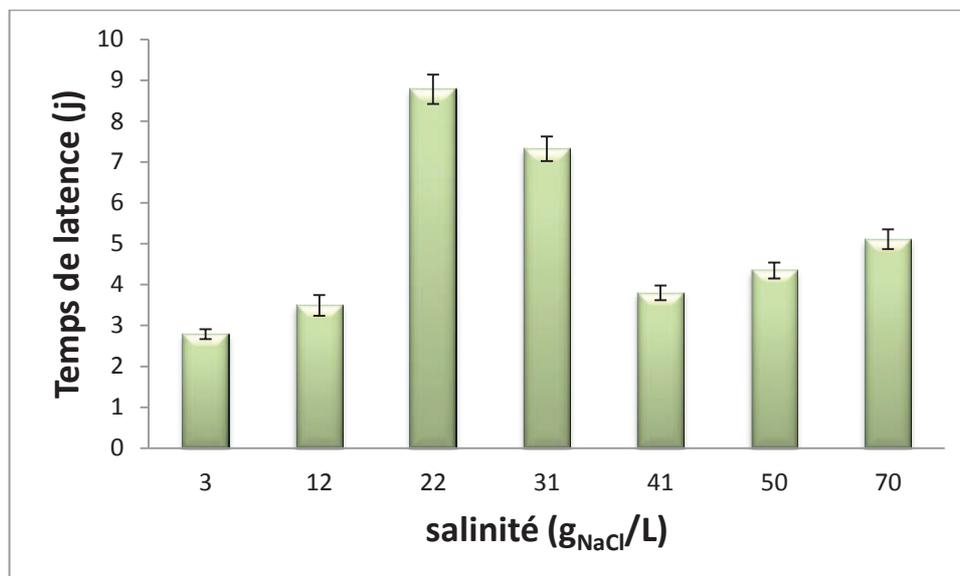


Figure III-10 : Temps de latence sur la production d'hydrogène à pH 6 en fonction de la salinité (paramètre déterminé à partir du modèle de Gompertz).

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

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

La consommation de l'hydrogène produit peut être due à la production d'acétate à partir d'H<sub>2</sub> et de CO<sub>2</sub> par les bactéries homoacétogènes ou à la formation de caproate à partir d'hydrogène et d'une quantité équimolaire d'acétate et de butyrate. L'absence de caproate sur la Figure III-11 élimine cette seconde voie. La consommation observée s'explique donc par une activité homoacétogène. Ces résultats s'accordent avec les résultats à pH 8. Toutefois, la nature de l'inoculum, issu de sédiments anaérobies salins, joue probablement un rôle sur ces voies car il apporte les bactéries homoacétogènes et surtout permet une inhibition de la voie caproate de consommation d'hydrogène.

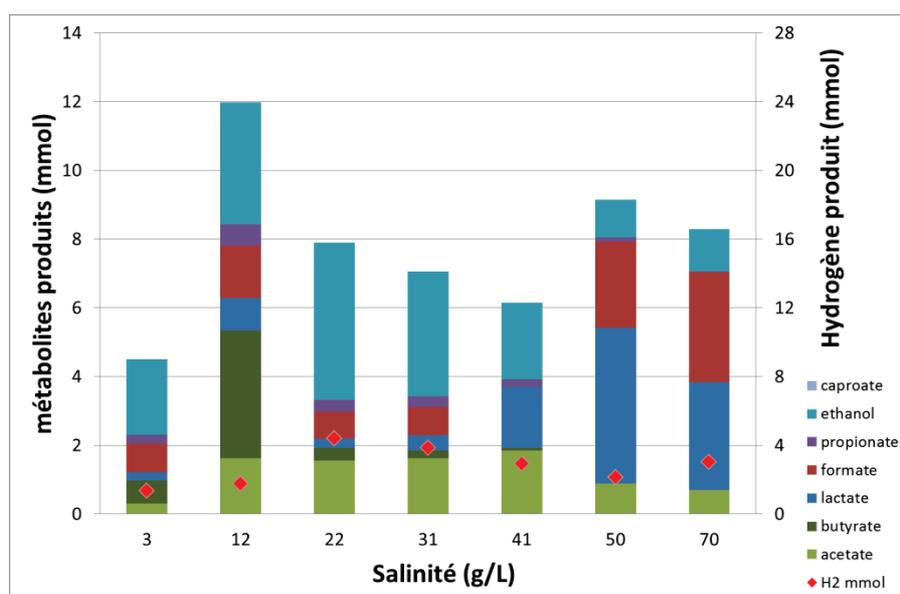


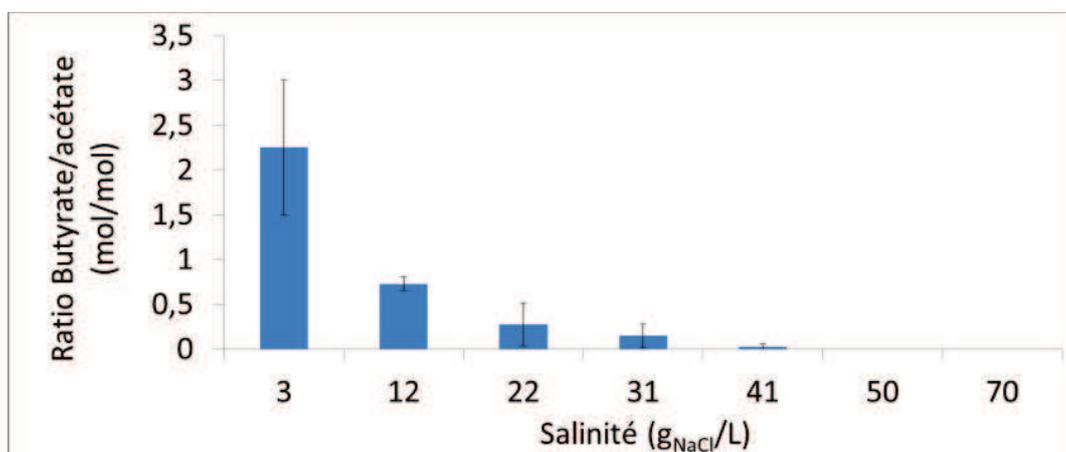
Figure III-11 : Métabolites produits (en mmoles) et production maximale d'hydrogène (en mmoles) en fonction de la salinité.

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

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

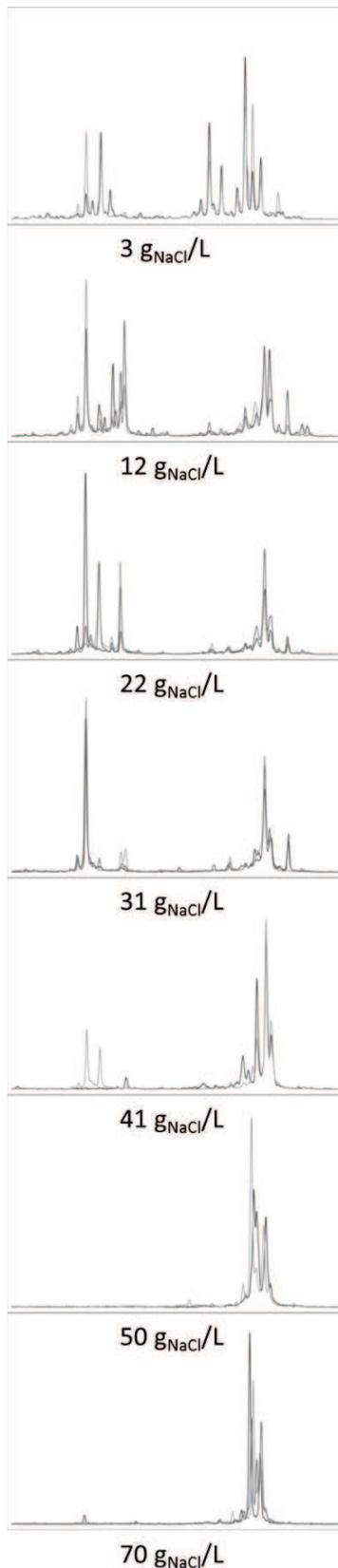
salinité. Aucune autre étude portant sur la production de biohydrogène en milieu salin n'a montré d'inhibition de la voie propionate, alors que Zheng et al. (2005) ont montré que la production de propionate ne change pas de manière significative de 0 à 30 g<sub>NaCl</sub>/L en cultures mixtes.

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



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

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



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

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

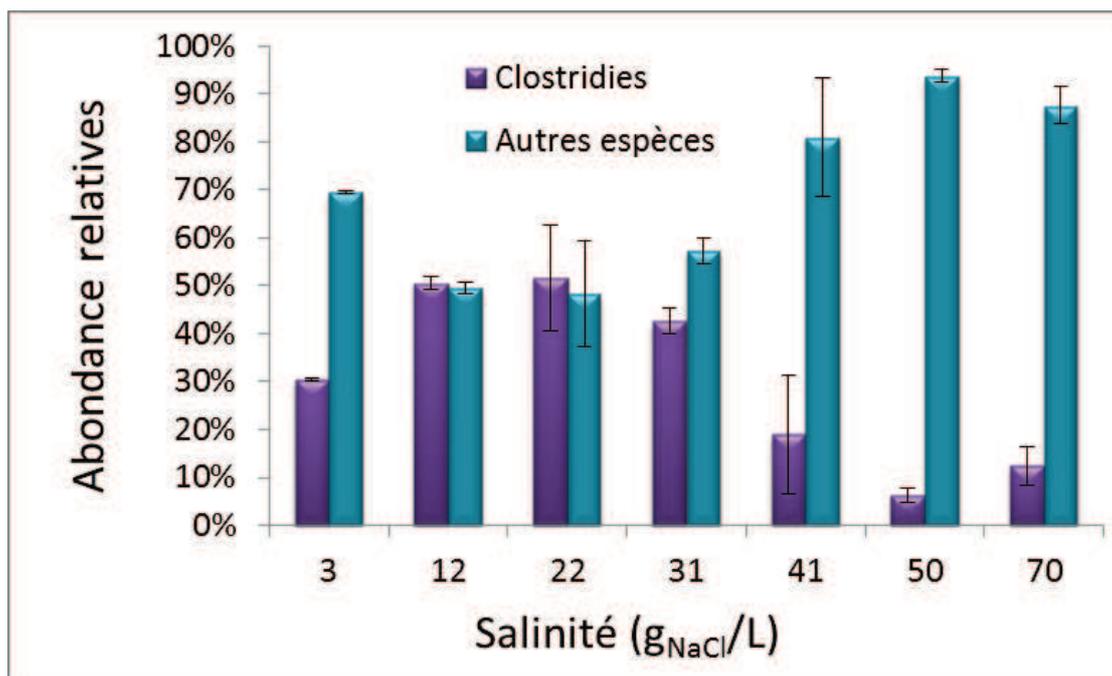


Figure III-14 : Abondances relatives cumulées des groupes de phylotypes bactériens observés sur les profils SSCP : Ces abondances calculées à partir des profils CE-SSCP donnent une identification hypothétique des groupes microbiens retrouvés à partir d'assignations observées de manière récurrentes dans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

La Figure III-15 présente l'analyse en composantes principales (ACP) des profils CE-SSCP. Elle permet de comparer les distances génétiques entre les différentes communautés bactériennes. Les deux premières composantes représentent 54.5% de la variance. Aucune corrélation n'a été observée entre les structures de communauté microbiennes et les paramètres de salinité, de production d'hydrogène H<sub>2</sub>max et de de vitesse de production maximale d'hydrogène V<sub>max</sub>. En comparaison avec les résultats à pH 8, les répliquats de profils SSCP sont beaucoup plus éloignés les uns des autres sur l'ACP, ce qui indique une dispersion plus importante des communautés bactériennes de ces répliquats et par conséquent, une moins bonne reproductibilité des sélections microbiennes à pH 6 qu'à pH 8.

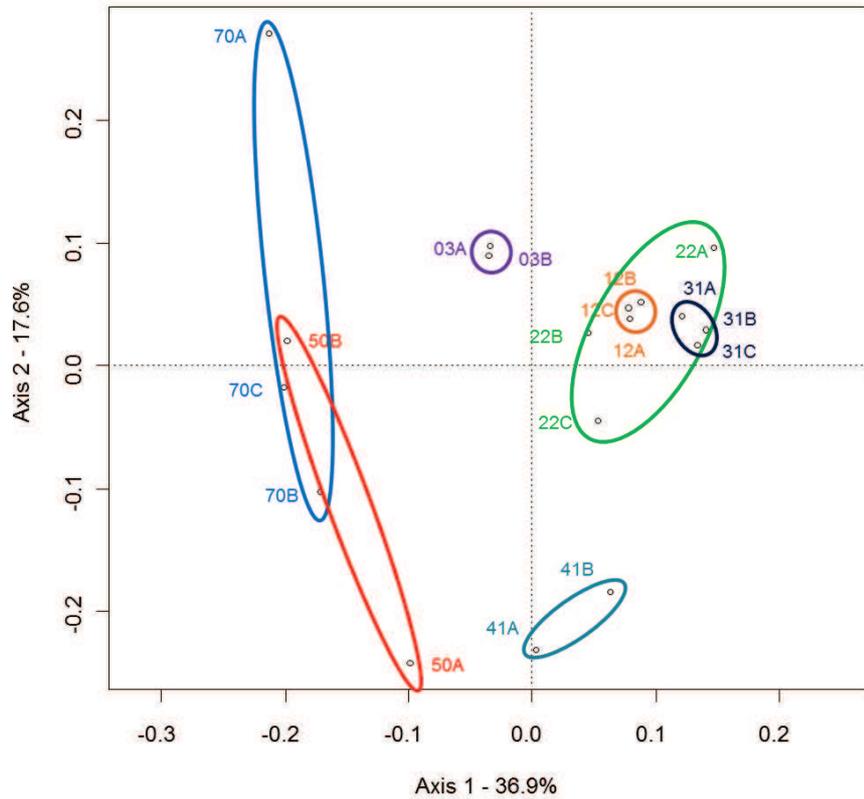


Figure III-15 : Analyse en composante principale (ACP) des profils CE-SSCP.

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

### III.1.3.5. CONCLUSION

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

### III.1.4. DISCUSSION DE SYNTHÈSE SUR LE CHAPITRE III

---

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

#### III.1.4.1. PRODUCTION D'HYDROGÈNE

---

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

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

#### III.1.4.2. SÉLECTION MICROBIENNE

---

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

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

### **III.1.5. CONCLUSION SUR LE CHAPITRE III**

---

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

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

---

## CHAPITRE IV. 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<sub>NaCl</sub>/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<sub>NaCl</sub>/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<sub>NaCl</sub>/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<sub>NaCl</sub>/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<sub>NaCl</sub>/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<sub>NaCl</sub>/L. Les plus performants, en termes de production de courant, sont les sédiments de l'étang de Gruissan (4.2 A/m<sup>2</sup>, dans l'eau de mer à pH 7) et un échantillon de sol (2.0 A/m<sup>2</sup> 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 <sup>2</sup> )
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 ( $2 \text{ A/m}^2$ ) et celui des sédiments de l'étang de Gruissan ( $4.2 \text{ A/m}^2$ ) 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 des 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  $10 \text{ mM}$ . 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  $4.2 \text{ A/m}^2$  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  $40 \text{ mM}$  d'acétate. Une densité de courant de  $85 \text{ A/m}^2$  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 ( $30 \text{ A/m}^2$ ). 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 bioH<sub>2</sub> (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<sub>NaCl</sub> l<sup>-1</sup>).

**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<sup>-2</sup>, 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  $390 \text{ A m}^{-2}$  (Chen *et al.* 2012).

On the other side, it has been extensively found that ARB are related to  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -*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  $2.5 \text{ A m}^{-2}$  using a natural marine biofilm on a graphite electrode polarized at  $-0.1 \text{ V/SCE}$  and fed with  $10 \text{ mM}$  acetate. Recently, Rousseau (2013) observed an increase of current density production under saline conditions in a potentiostatically controlled system fed with  $40 \text{ mM}$  acetate. A current density of  $85 \text{ A m}^{-2}$  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 ( $30 \text{ A m}^{-2}$ ). 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  $7.8 \pm 0.2$ ;  $36.1 \pm 3.5 \text{ g}_{\text{VS}} \text{ g}_{\text{sediments}}^{-1}$  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 ( $10 \text{ mmol l}^{-1}$ ) or a mixture of acetate ( $5 \text{ mmol l}^{-1}$ ) and butyrate ( $5 \text{ mM}$ ) 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 ( $1 \text{ mol l}^{-1}$ ).

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 $\mu$ 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 (N<sub>2</sub>) and the flame ionization detector gas is hydrogen (H<sub>2</sub>).

#### 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 $\mu$ L) contained 5 $\mu$ L of 10x Pfu Turbo DNA buffer, 200 nMf of dNTP, 500 nMf of each primer, 2.5 U  $\mu$ L<sup>-1</sup> 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<sup>-2</sup>, 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<sup>-2</sup>) 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).

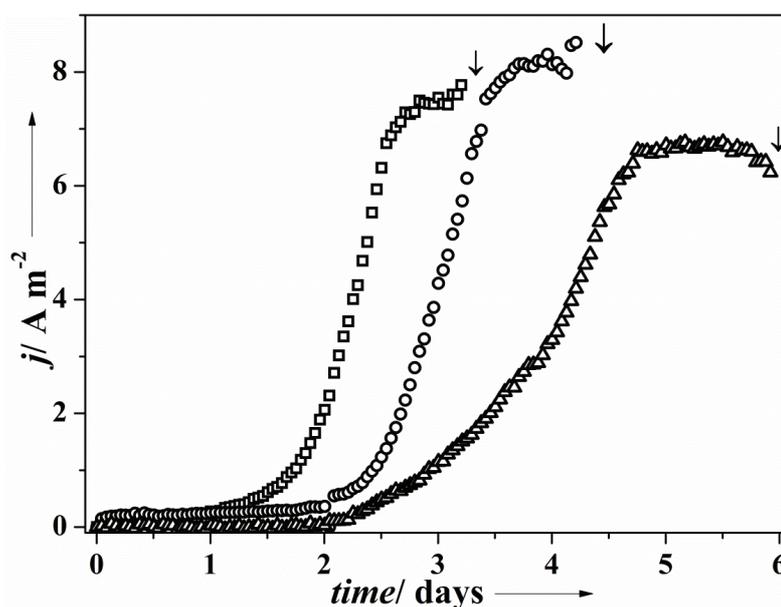


Figure IV-1 : Representative chronoamperometric batch cycles of electrochemically derived biofilms B7( $\Delta$ ), B8( $\square$ ) & B9( $\circ$ ).

Experiments realized under saline conditions (30 g l<sup>-1</sup> NaCl) and pH 7.0 at graphite planar electrodes (15 cm<sup>2</sup>). 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 potentiostatically 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	$j_{max}$ / $\text{A m}^{-2}$	CE/ %	Main dominant species identified in the biofilm <sup>†</sup>
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; <sup>†</sup> 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  $0.86 \pm 0.06$ . In comparison, the inoculum was more diverse with a Simpson diversity index of  $0.98 \pm 0.002$ . 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.

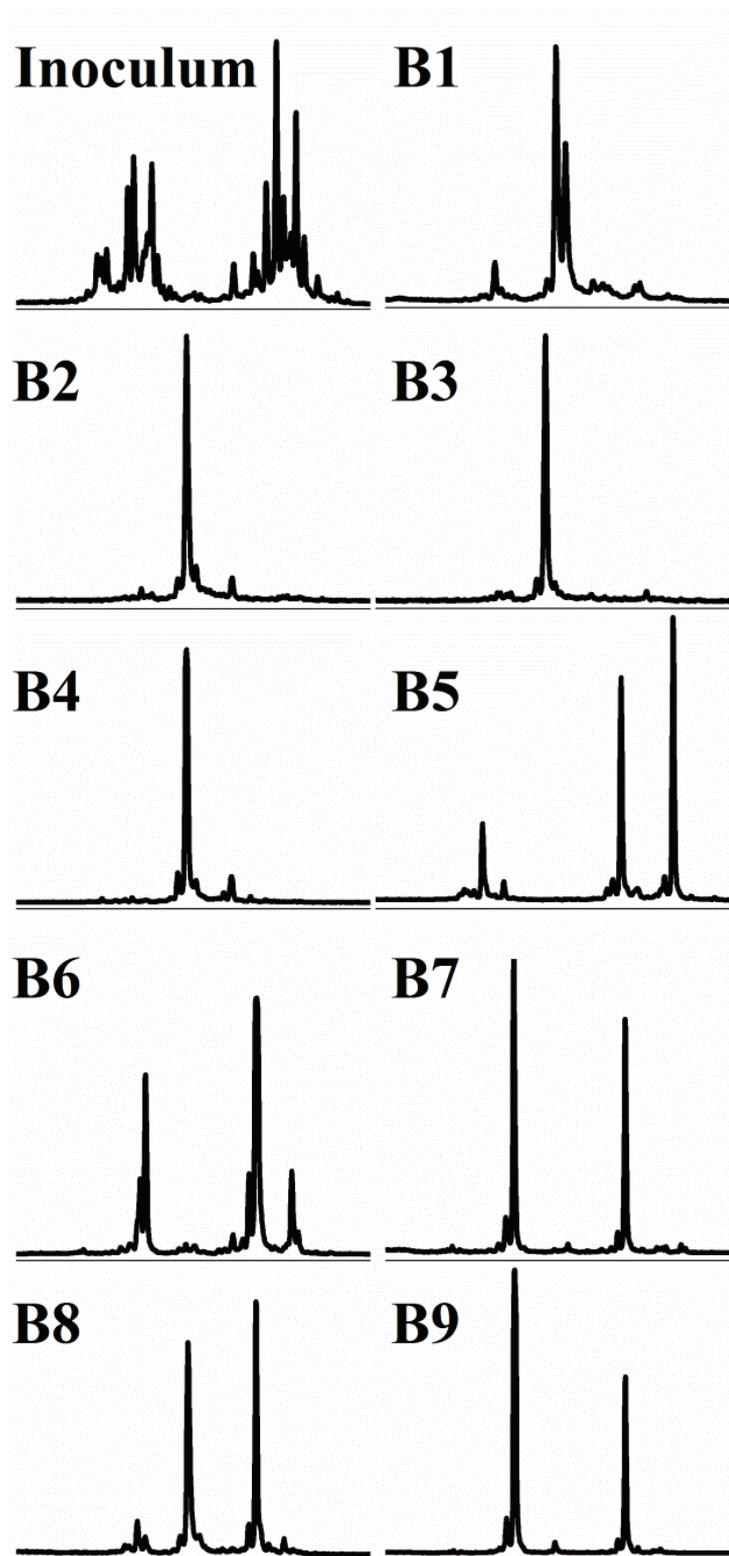


Figure IV-2 : CE-SSCP profiles based on 16S rRNA gene fragments retrieved from electroactive biofilms R1 to R9 grown in different operating conditions (see Tableau IV-1).

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 ( $67.9 \pm 16.2$  %) 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  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\delta$ -*Proteobacteria* and *Firmicutes*, with a majority of  $\beta$ -*Proteobacteria* in butyrate-fed biofilm and the predominance of  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\delta$  *Proteobacteria* with a majority of  $\beta$  and  $\delta$ -*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<sup>-2</sup>). 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<sup>-2</sup> 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  $\delta$ -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 *Geoalkalibacter 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 *Geoalkalibacter* reached from 3.87 to 8.73 A m<sup>-2</sup> 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<sub>NaCl</sub> L<sup>-1</sup>). 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 *Geoalkalibacter 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 *Geoalkalibacter subterraneus* in pure culture support our results to explain that the experimental conditions used here (such as a saline growth medium: 30 g<sub>NaCl</sub> l<sup>-1</sup>) can stimulate the enrichment of an halophilic ARB as *Geoalkalibacter subterraneus* (Carmona-Martínez 2013; Badalamenti 2013). Besides the study of the development of *Geoalkalibacter 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<sup>-2</sup>).

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<sup>-2</sup> 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 *Geoalkalibacter 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/m<sup>2</sup>) 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/m<sup>2</sup>) à 20 g<sub>NaCl</sub>/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/m<sup>2</sup>). 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 dûe 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 putrefaciens*, 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.

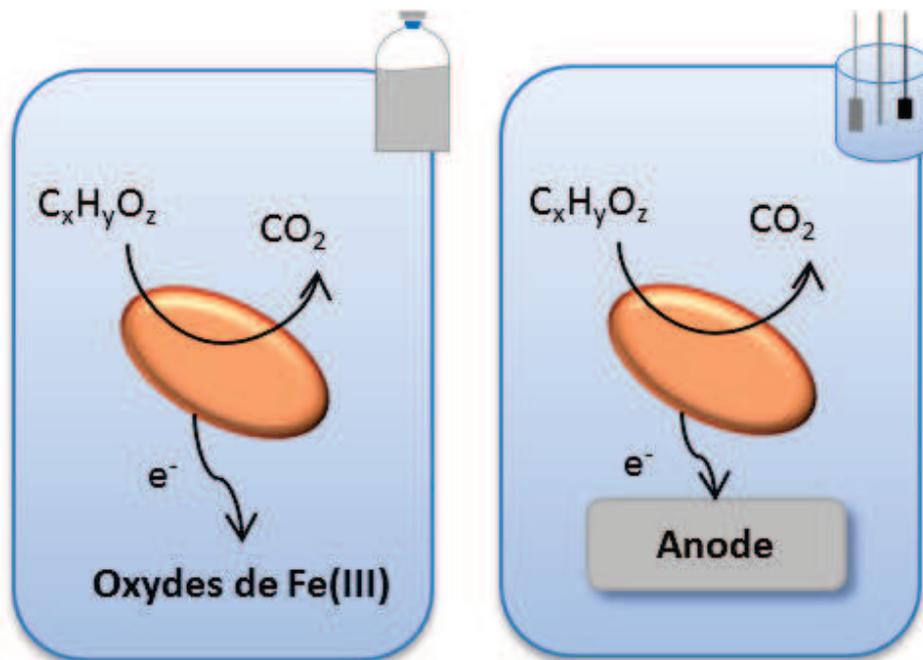


Figure IV-3 : Principe du procédé de pré-sélection de bactéries électroactives par enrichissement de DMRB sur oxydes de Fe(III).

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.

#### IV.2.2. ENRICHISSEMENT DE BACTERIES REDUISANT LE Fe(III) POUR LA SELECTION DE MICROORGANISMES ELECTROACTIFS : CARACTERISATION DE LA SELECTION MICROBIENNE.

---

### **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 «Bioressource 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 *Geoalkalibacter 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/m<sup>2</sup>, 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

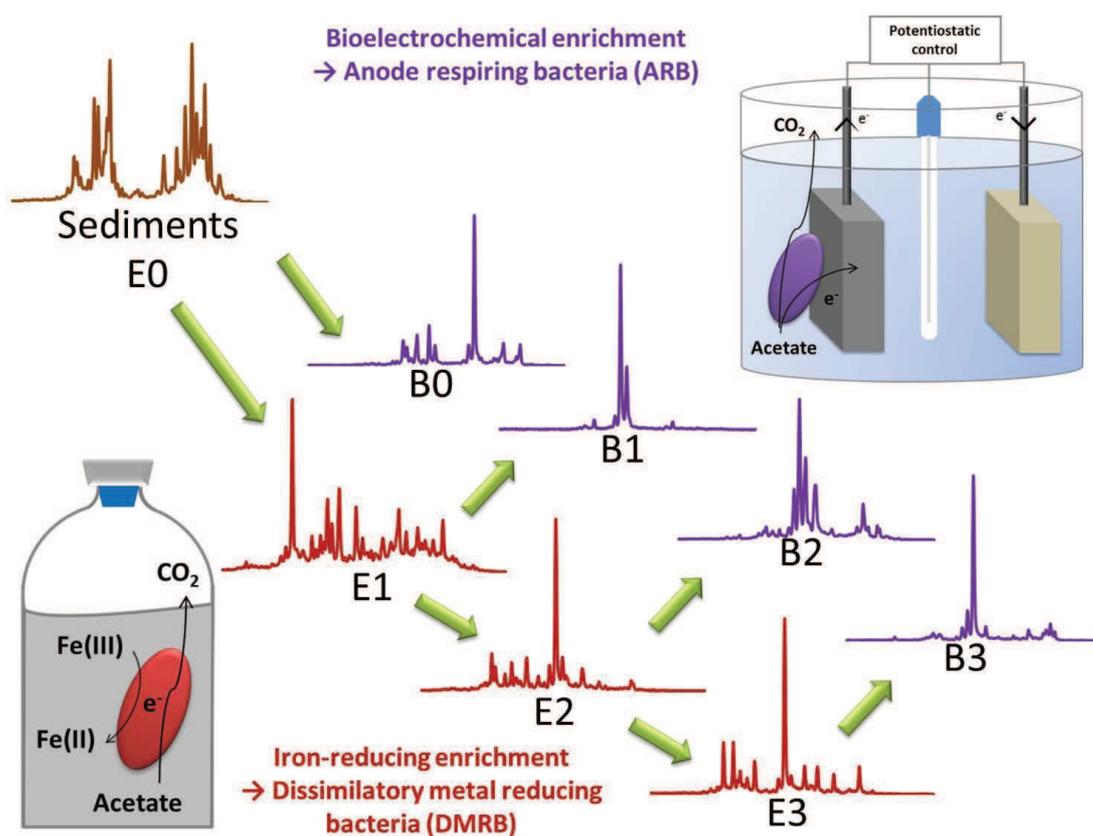
ARN on an electrode. In a first experimental stage, sediments were used to inoculate a saline medium containing Fe(III) ions. Secondly, part of the enriched community was transferred to a potentiostatically controlled system as inoculum to form an electroactive biofilm on a graphite anode. Successive 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 *Geoalkalibacter 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, *Geoalkalibacter 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  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -*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; Neelson 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 25<sup>th</sup> 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<sub>NaCl</sub>/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<sub>NaCl</sub>/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 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2g/L NH<sub>4</sub>Cl, 0.2g/L Yeast extract, 55mg/L MgCl<sub>2</sub>, 6H<sub>2</sub>O, 7mg/L FeSO<sub>4</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>·6H<sub>2</sub>O, 1mg/L ZnCl<sub>2</sub>, 2H<sub>2</sub>O, 1.2mg/L MnCl<sub>2</sub>, 4H<sub>2</sub>O, 0.4mg/L

CuSO<sub>4</sub>, 5 H<sub>2</sub>O, 1.3mg/L CoSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O, 0.1mg/L BO<sub>3</sub>H<sub>3</sub>, 1mg/L Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>, 4H<sub>2</sub>O, 0.05mg/L NiCl<sub>2</sub>, 6 H<sub>2</sub>O, 0.01mg/L Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>, 5 H<sub>2</sub>O, 60mg/L CaCl<sub>2</sub>, 2 H<sub>2</sub>O. 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)

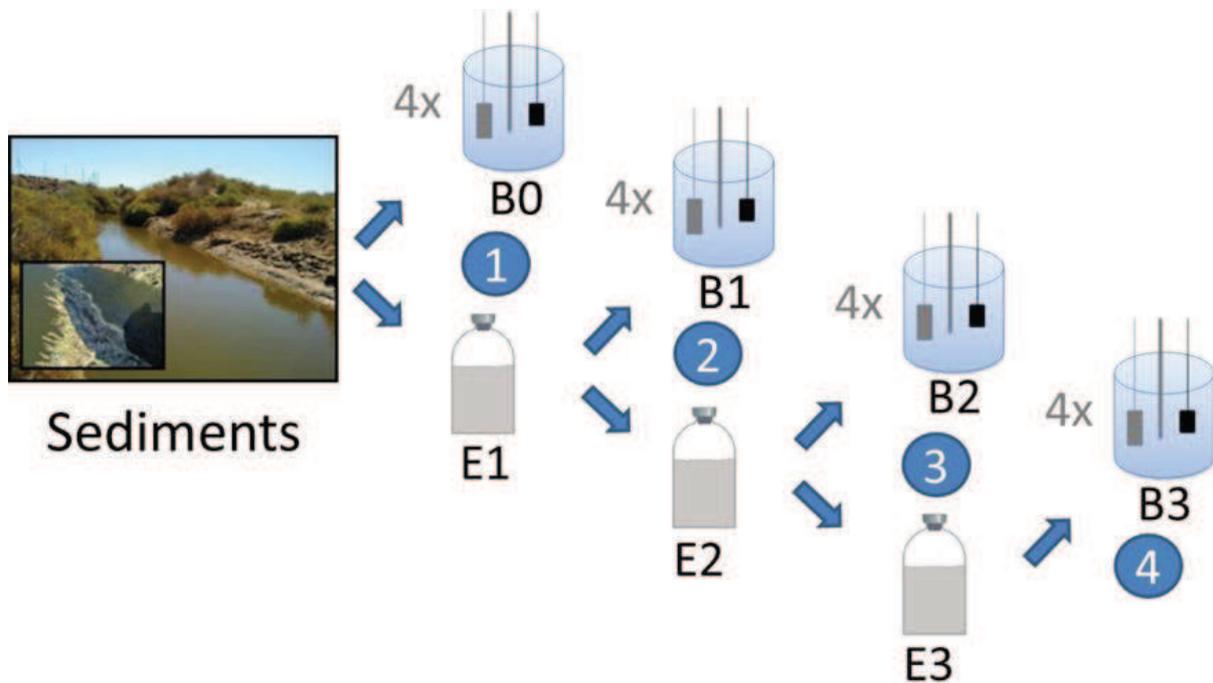


Figure IV-4 : Scheme of successive enrichments steps to grow electroactive biofilms.

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 $\mu$ 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 (N<sub>2</sub>) and the flame ionization detector gas is hydrogen (H<sub>2</sub>).

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);  $\lambda$ : 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).

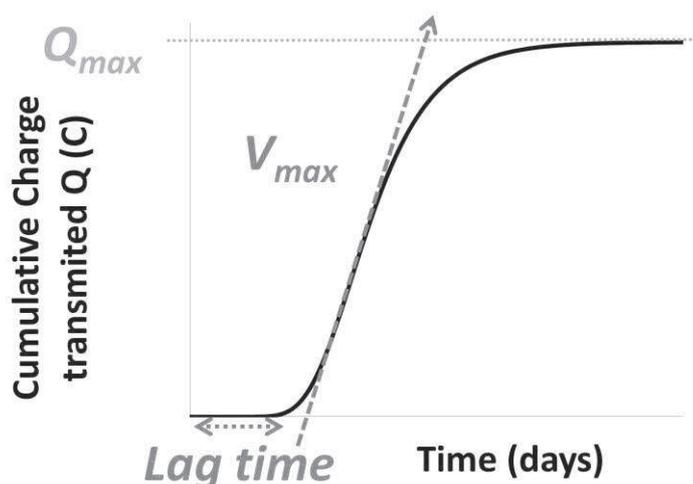


Figure IV-5 : Representation of electron transfer dynamics from a mixed culture cultivated with acetate as substrate in electrochemical systems equipped with a 3 electrode setup.

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 (50µL) contained 5µL of 10x Pfu Turbo DNA buffer, 200 nMf of dNTP, 500 nMf of each primer, 2.5 U µL<sup>-1</sup> 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 (1µL) was mixed with 18.925 µL of formamide and 0.075 µL 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<sub>Fe(II)</sub>/mol<sub>acetate</sub> 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<sub>Fe(II)</sub>/mol<sub>acetate</sub>. Roden & Lovley (1993) previously reported the same conversion rate (7.6 mol<sub>Fe(II)</sub>/mol<sub>acetate</sub>) 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.

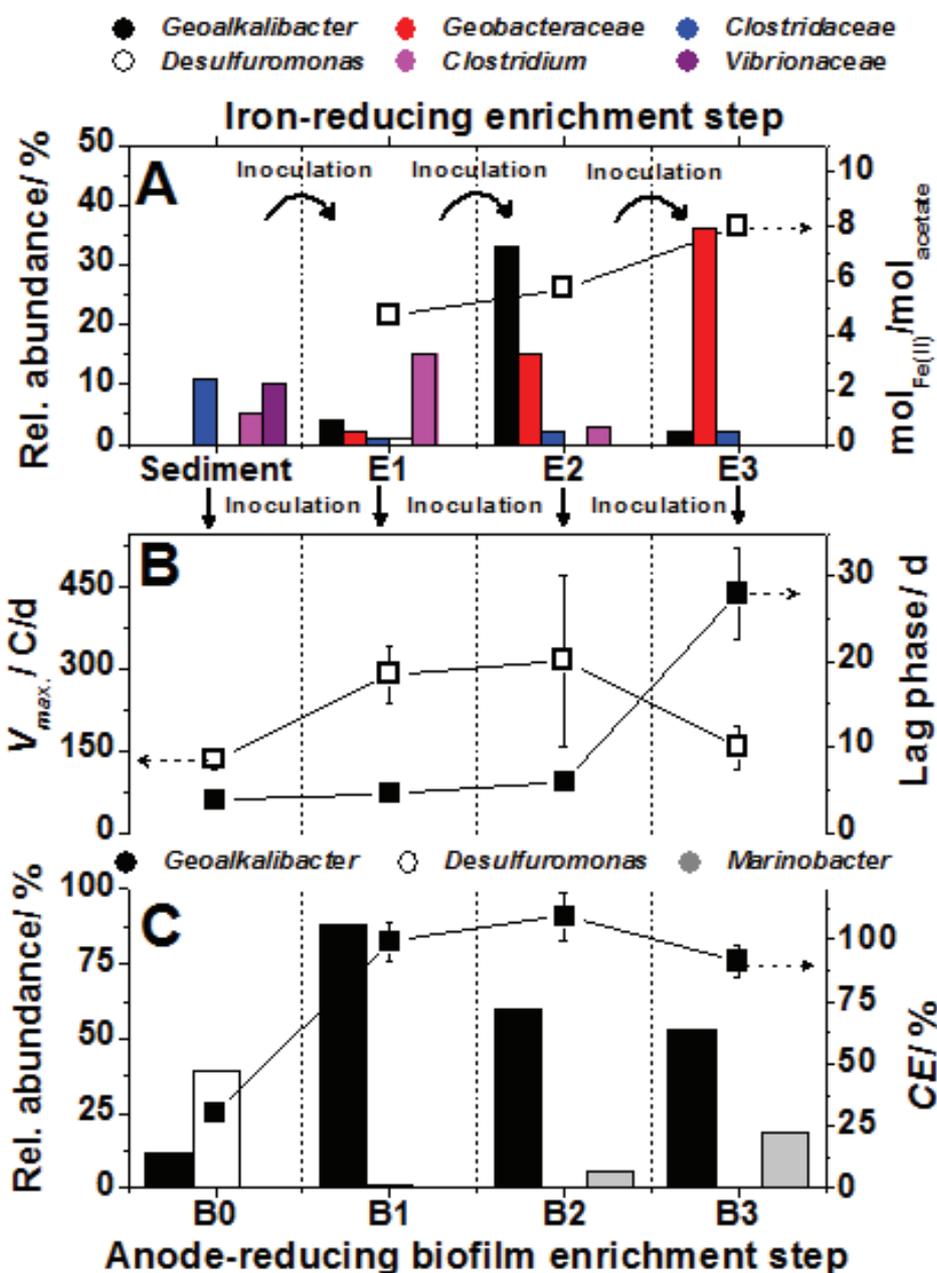


Figure IV-6 : Iron/anode enrichment parameters and relative abundance of main bacteria in microbial communities

(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 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> 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 ( $V_{\text{max}}$  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).

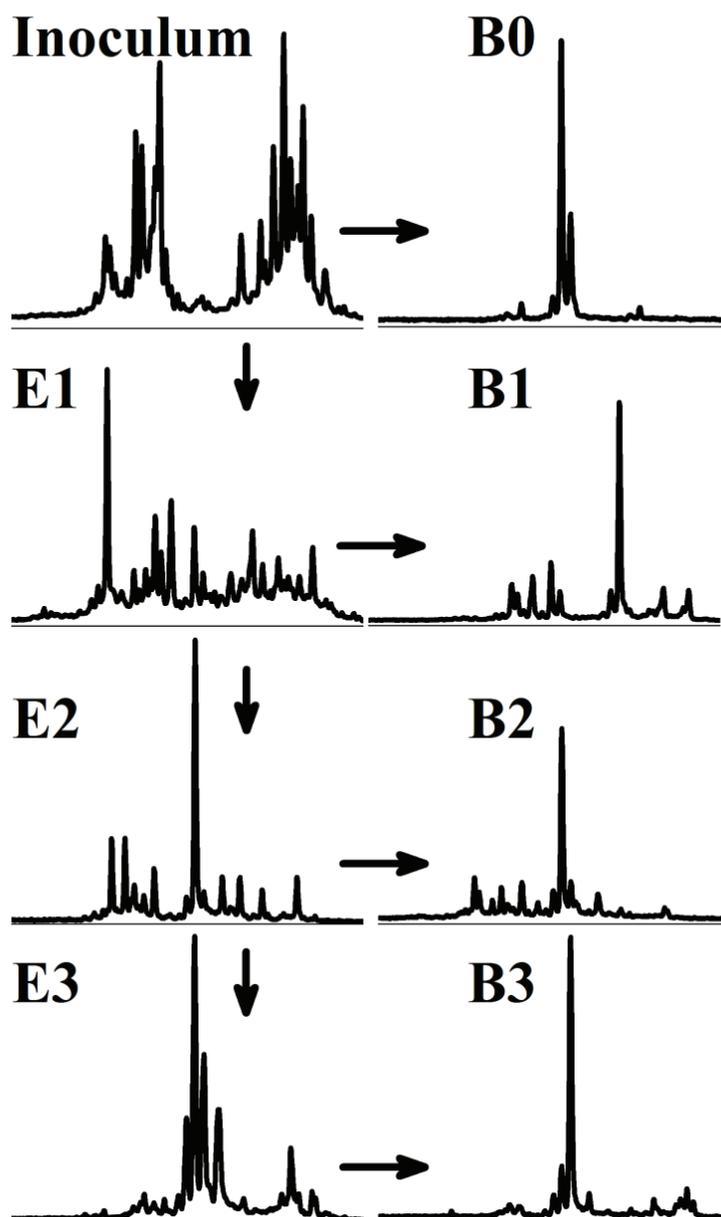


Figure IV-7 : CE-SSCP profiles based on 16S rRNA gene fragments retrieved from sediment, enriched cultures (E1, E2, E3) and biofilms (B0, B1, B2, B3) mixed cultures.

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±3.8% (B0) to 99.0±7.5% (B1) and 109.1±9.9% (B2) and then rather decreased to 97.1±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 CO<sub>2</sub> 8.4 %, H<sub>2</sub> 42.12 %, N<sub>2</sub> 33.26 % and CH<sub>4</sub> 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/m<sup>2</sup> and 1.6±0.8 A/m<sup>2</sup>. 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 25<sup>th</sup> 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.

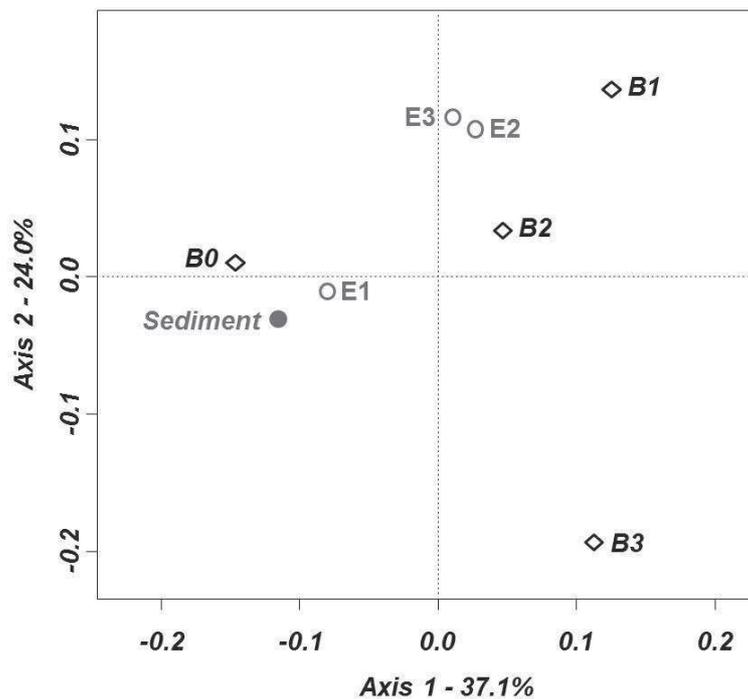


Figure IV-8 : Principal Component Analysis (PCA) biplot of CE-SSCP profiles.

For each biofilm (B0, B1, B2, B3), an average of the 4 replicate profiles is presented (◇). CE-SSCP profiles of the sediment originate inoculum E0 (●) and of iron-enrichments microbial communities (E1, E2 E3) are also presented (○). 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  $\delta$ -*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  $\delta$ -*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  $\delta$ -*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/m<sup>2</sup>.

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  $3.3 \text{ A/m}^2$ , 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  $\delta$ -*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 *Geobacter sulfurreducens*. 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)

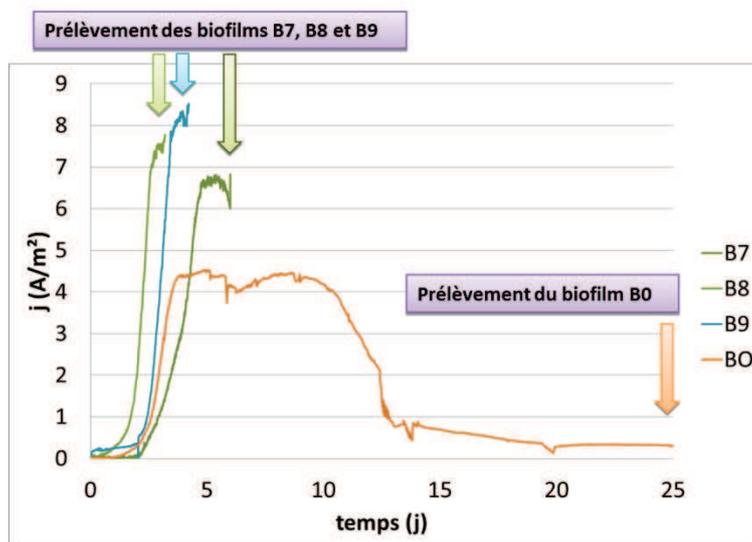


Figure IV-9 : Chronoampérométries réalisées sur les biofilms B7, B8 et B9 en partie IV.1 et B0 en partie IV.2.

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  $A/m^2$  et %.*

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

*Geoalkalibacter subterraneus* et *Desulfuromonas* 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.

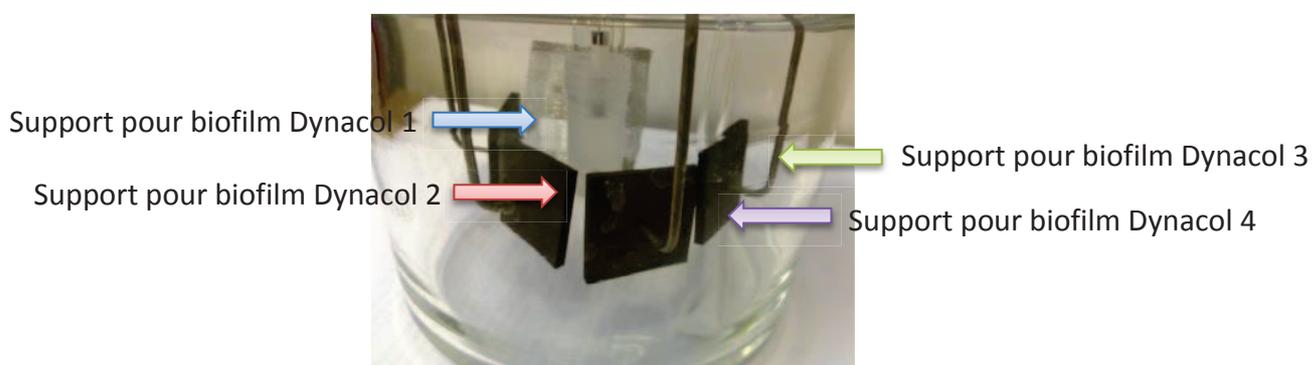
Cette étude vise à prélever le biofilm électroactif aux différents stades de sa formation afin d'étudier sa dynamique de colonisation et de vérifier si les deux espèces majoritaires obtenues systématiquement, *Geoalkalibacter subterraneus* et *Desulfuromonas* ssp., s'implantent de façon séquentielle 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<sub>NaCl</sub>/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  $10.6 \pm 0,5$  A/m<sup>2</sup>. Cette valeur s'accorde avec nos résultats précédents obtenus dans les mêmes conditions où une densité de courant de 8,5 A/m<sup>2</sup> 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).

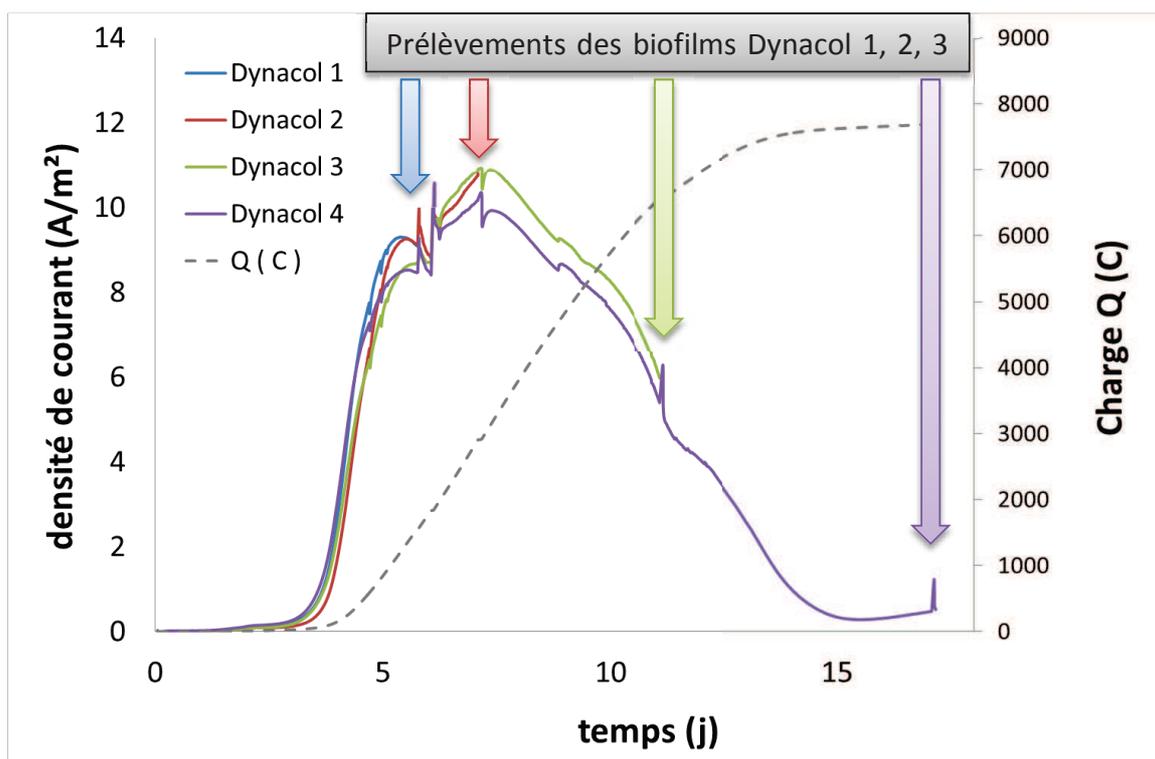
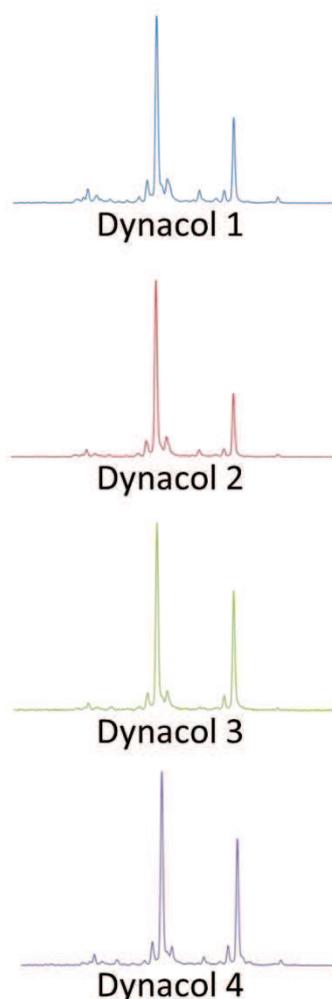


Figure IV-11 : Chronoampérométries réalisées sur les 4 électrodes Dynacol 1, 2, 3 et 4.

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 *Geokalibacter 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.

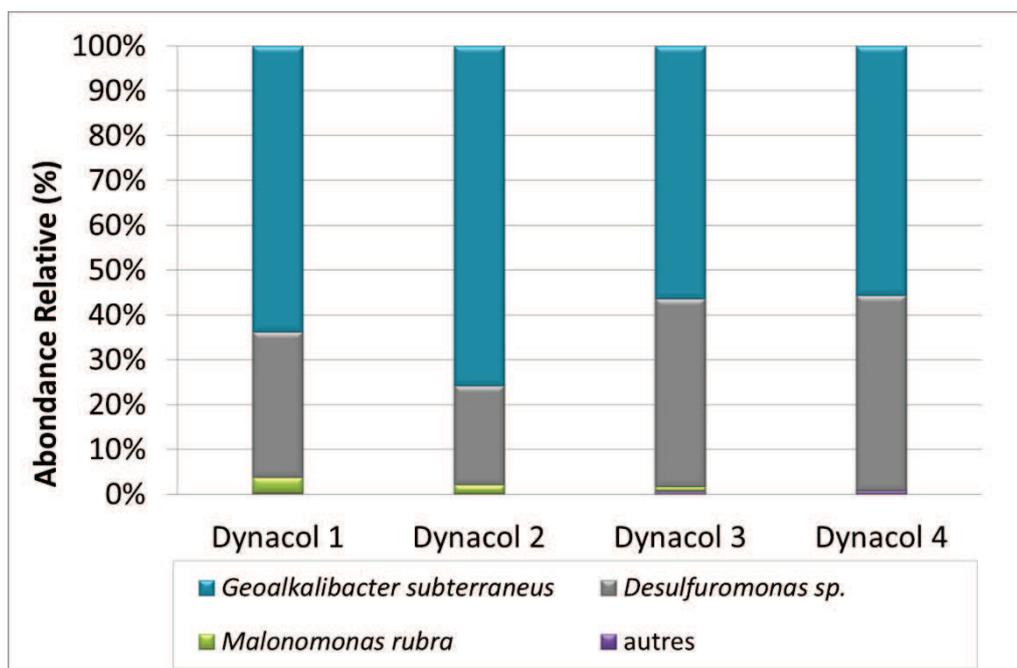


Figure IV-13 : Distribution taxonomique des bactéries phylogénétiquement les plus proches identifiées dans les différents biofilms collectés au cours de la colonisation de l'électrode.

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<sub>NaCl</sub>/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/m<sup>2</sup> (IV.1) en réacteur à 3 électrode et 10.6±0,5 A/m<sup>2</sup> 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.

Finalemt 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<sub>NaCl</sub>/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.

---

## CHAPITRE V. COUPLAGE FERMENTATION / ELECTROLYSE MICROBIENNE : INFLUENCE DES ESPECES EXOGENES SUR LE BIOFILM ELECTROACTIF.

---

*Les chapitres précédents ont principalement permis de montrer (1) la faisabilité de réaliser la fermentation en milieu salin à pH 6 et pH 8 et (2) la forte sélection d'espèces électroactives sur anode ou en enrichissement liquide sur Fe(III). Après établissement d'un biofilm électroactif, l'ajout de biomasse fermentaire issue de la fermentation dans le compartiment anodique peut également constituer une perturbation biotique sur le biofilm. Dans ce dernier chapitre nous nous intéressons au couplage de la fermentation en milieu salin à des pH variant de 6 à 8 et de l'électrolyse microbienne (opérée à pH 7). Plus particulièrement, nous étudions ici les interactions entre les deux communautés microbiennes propres à chacun de ces procédés. L'impact d'un ajout de biomasse issue de la fermentation sur le biofilm électroactif a été étudié en termes de transfert d'électrons et de dynamique des populations microbiennes du biofilm électroactif.*



## V.1. AVANT-PROPOS

---

Le but de ce travail de thèse a été d'étudier l'impact de conditions de conduite de procédés de fermentation et d'électrolyse microbienne en termes de performance du procédé et de sélection/changement de populations microbiennes. L'originalité de cette étude a été de travailler en milieux salin dans le but d'augmenter la conductivité du milieu en électrolyse microbienne et, de là, améliorer le transport de charges dans l'électrolyte de la cellule d'électrolyse microbienne (Lefebvre et al., 2012).

Les conditions favorables à la production d'hydrogène par fermentation sont communément un pH bas (5-6) et une température de 37°C (Guo et al., 2010). L'électrolyse microbienne est quant à elle réalisée à pH neutre ou alcalin (Liu et al., 2010) et une forte conductivité du milieu est favorable au transport de charges dans l'électrolyte.

Les deux premiers chapitres de résultats de cette thèse portent sur l'étude des variations de ces paramètres et de la faisabilité des procédés de fermentation et d'électrolyse microbienne dans des conditions intermédiaires permettant la conduite de chacun des procédés. Le Chapitre III de cette thèse porte sur l'étude de la fermentation dans des conditions salines et à pH 6 ou 8. Cette partie a notamment permis de montrer la faisabilité de la fermentation en milieu salin à pH 8 avec la sélection de bactéries appartenant à la famille des *Vibrionaceae* et une inhibition de la consommation d'hydrogène par la voie propionate. Le Chapitre IV a quant à lui permis de montrer la forte sélection d'espèces électroactives dans le biofilm en conditions salines en utilisant des sédiments salins comme inoculum. Les biofilms électroactifs obtenus à partir de ces sédiments ont permis d'atteindre de fortes densités de courant et des rendements faradiques élevés. Néanmoins, la faible diversité microbienne du biofilm électroactif conduit une certaine fragilité de la stabilité de l'écosystème. En effet, la robustesse des biofilms et leur résistance aux perturbations externes réside principalement dans leur diversité (Jouenne, 2008). Le couplage de la fermentation avec l'électrolyse microbienne peut induire des perturbations abiotiques telles que la composition du milieu, le pH, la température etc... mais aussi biotiques avec l'ajout d'espèces exogènes issues du fermenteur (*Figure V-1*).

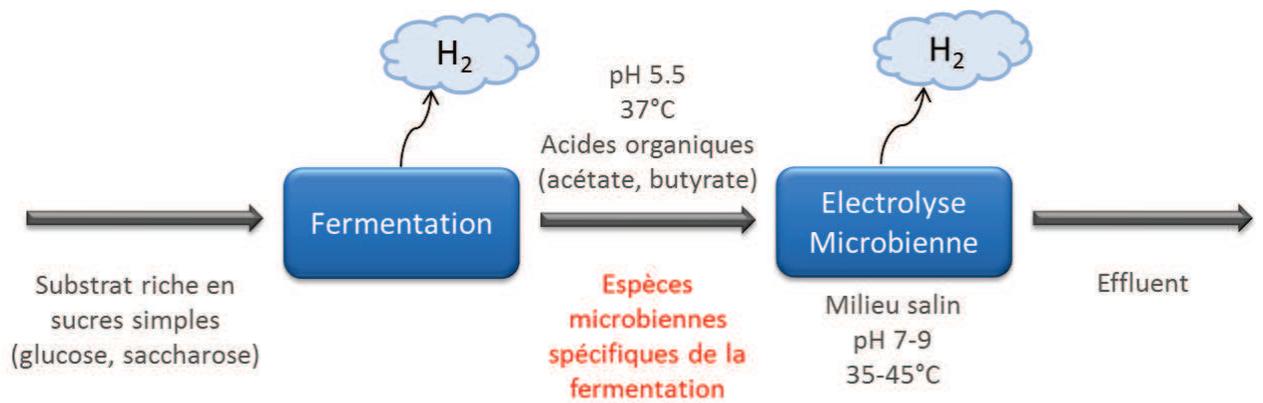


Figure V-1 : Paramètres spécifiques liés au procédé de fermentation et d'électrolyse microbienne dans le cadre du couplage.

*Le biofilm électroactif peut être affecté dans son fonctionnement et sa structure de communauté microbienne par des perturbations abiotiques mais aussi à des perturbations biotiques liées à l'apport d'espèces spécifiques dans le compartiment anodique de la cellule d'électrolyse microbienne*

Néanmoins, les précédentes études portant sur le couplage des deux procédés ont montré sa faisabilité (Lalauette et al., 2009; Lu et al., 2009; Wang et al., 2011; Tommasi et al., 2012; Lenin Babu et al., 2013). Ces études rapportent des rendements globaux de conversions du système combiné fermentation-électrolyse microbienne jusqu'à  $9,95 \text{ mol}_{H_2}/\text{mol}_{\text{glucose}}$  (Lalauette et al., 2009) et  $8,79 \text{ mol}_{H_2}/\text{mol}_{\text{glucose}}$  (Lu et al., 2009). Cependant, la majeure partie de ces études ont été conduites en s'affranchissant du facteur biotique de l'apport en micro-organismes fermentaires par centrifugation des effluents de fermentation pour séparer le milieu liquide des microorganismes avant alimentation de l'électrolyseur (Lalauette et al., 2009; Lu et al., 2009; Wang et al., 2011). Bien que les changements de conditions expérimentales en passant du fermenteur à l'électrolyseur puissent affecter ces bactéries exogènes, leur introduction dans le compartiment anodique peut également impacter la structure des communautés microbiennes au sein du biofilm ainsi que ses performances d'électroactivité. A notre connaissance, cet aspect n'a été étudié que dans une seule étude (Lenin Babu et al., 2013) où la présence de  $\gamma$ -protéobactéries (50%), bacilles (25%) et clostridies (25%) a été noté dans le compartiment anodique après couplage. L'identification de clostridies montre la présence et la survie de bactéries potentiellement issues de la fermentation. Cependant, l'influence de bactéries exogènes issues de la fermentation sur le biofilm en électrolyse microbienne n'est pas décrite dans la littérature

en termes d'impact sur l'activité du biofilm et sur la dynamique des communautés microbiennes.

L'objectif de l'étude présentée dans ce chapitre a été de déterminer si la biomasse issue de l'étape de fermentation pouvait avoir un impact sur le biofilm électroactif. L'article s'attache particulièrement à décrire (1) la dynamique de structure des communautés microbiennes du biofilm après ajout d'espèces exogènes au cours de batchs successifs et (2) les modifications de l'activité électroactive du biofilm. Trois biomasses issues d'effluents de fermentation réalisées dans des conditions de pH différentes ont été utilisées. La biomasse fermentaire a été obtenue à partir de fermenteurs en batch réalisés en milieu salin (suite aux résultats du Chapitre III) à pH 6, 7 ou 8 correspondant, respectivement, au pH de la fermentation classiquement décrit dans la littérature pour la production d'hydrogène (Guo et al., 2010), au pH de l'électrolyse microbienne (Logan, 2012) et au pH de l'inoculum ainsi qu'à celui de la fermentation réalisée dans le Chapitre III (Pierra et al., 2013).

Cette étude vise à apporter des réponses à la question suivante : les performances électroactives et la structure de communauté microbienne sont-elles affectées par l'ajout d'espèces exogènes issues de la fermentation?

## V.2. COUPLAGE FERMENTATION / ELECTROLYSE MICROBIENNE : INFLUENCE DES ESPECES EXOGENES SUR LE BIOFILM ELECTROACTIF

---

---

### **Influence of dark fermentative biomass on electroactive biofilm functionality and microbial community composition.**

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

*Cet article est en cours de préparation. Des résultats complémentaires sont attendus et il ne sera pas soumis en l'état.*

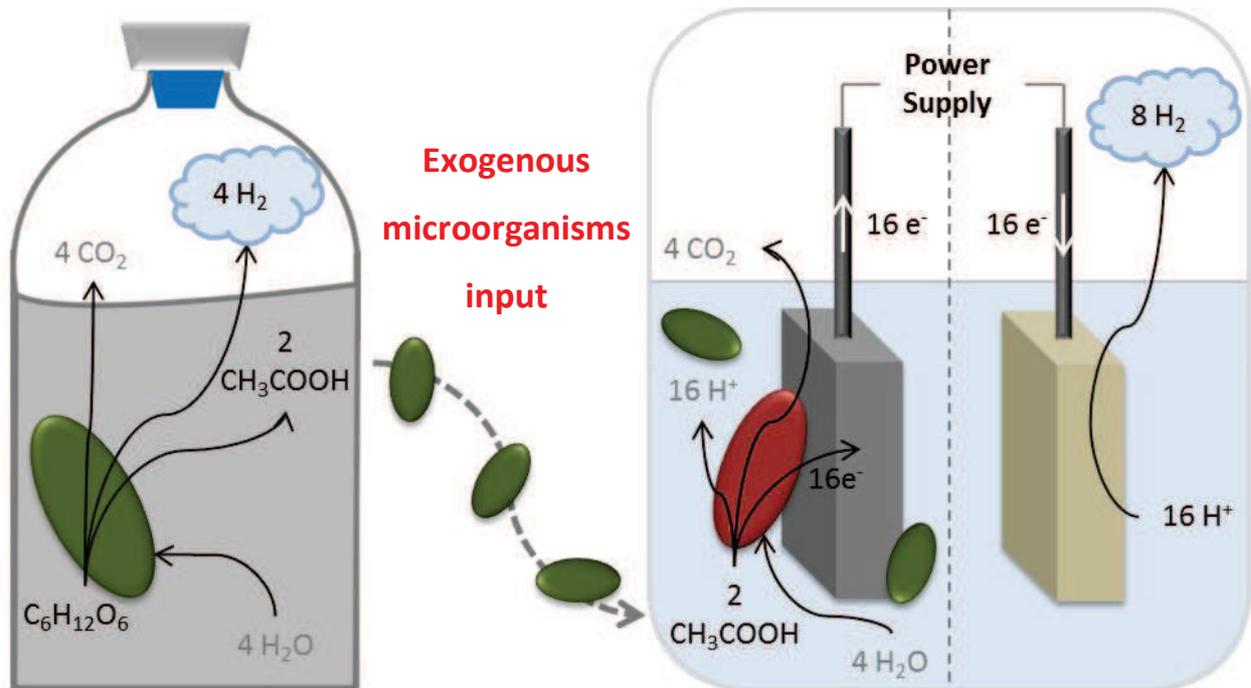
#### **Abstract :**

Biohydrogen production is of increasing interest in a context of fossil fuel increasing deficiency. Dark fermentation process is limited to a theoretical conversion yield of 4 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>/mol<sub>Glucose</sub> with concomitant production of organic acids such as acetate and butyrate. Microbial electrolysis completely oxidizes organic matter into carbon dioxide and hydrogen using electrochemical biofilms with a theoretical yield of 8 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>/mol<sub>Glucose</sub>. The association of the two processes would permit to convert all the disposable hydrogen of organic matter. So far, the dynamic of the impact of exogenous bacteria from fermentation process on the electroactive biofilm bacterial community of microbial electrolysis has not been further studied. This research aims at establishing whether electron transfer and bacterial community structure of the electroactive biofilm could be affected by bacteria originated from dark fermentation processes.

For this, a multi-electrode reactor was used. Electrodes were removed successively to characterize the electroactive performances and the bacterial community of biofilm changes among time after exogenous bacteria injection.

The findings of this study suggest that the electroactive biofilm originated from sediment presents a biofilm presenting high current densities up to 10,8±1,3 A/m<sup>2</sup> and a robust bacterial community structure. Exogenous bacteria coming from the batch dark fermenters did not have any effect on the biofilm bacterial structure. Nevertheless, it affected the current density generated by the biofilm likely due to EPS production and methane production occurring in batch conditions that respectively slowed down substrate transfer in the biofilm competed for substrate consumption.

**Keywords :** Biohydrogen, Microbial electrolysis cell (MEC), Acidogenic effluent, CE-SSCP fingerprinting

**Graphical abstract :****V.2.1. INTRODUCTION:**

Hydrogen ( $H_2$ ) as energy carrier is of increasing interest. It is a promising clean and sustainable energy carrier. This is due to its high energy density and its high efficiency as fuel cells for conversion of  $H_2$  to electricity for transportation purpose (Hawkes et al., 2007; Hallenbeck and Ghosh, 2009; Guo et al., 2010). Nowadays, hydrogen is mostly produced by natural gas reforming which causes twice carbon dioxide equivalent compared to biohydrogen and contributes to carbon depletion (Das and Veziroglu, 2001; Hajjaji et al., 2013). However, recent developments in the field of biotechnologies and sustainable development led to a renewed interest in alternative technologies to produce hydrogen from different biomass sources such as dark fermentation and, more recently, microbial electrolysis (Hallenbeck and Benemann, 2002; Logan et al., 2008; Gómez et al., 2011).

The past decades have seen increasing and rapid advances in the field of microbial electrolysis cells (MEC) development. A MEC is a process that permits to convert organic matter into hydrogen. It consists in an anode on which organic substrates are microbiologically oxidized with a release of electrons associated with a cathode that uses the

generated electrons to produce hydrogen following the electrochemical reduction of water (Logan et al., 2008; Liu et al., 2010). In MECs, the oxidation process is achievable because of the development on the anode of a bacterial biofilm which catalyses organic matter oxidation. This electroactive biofilm contains electroactive bacteria, also named anode respiring bacteria (ARB), that have the ability to transfer electrons released from organic matter oxidation to an insoluble and external electron acceptor, e.g. the anode. In comparison to hydrogen production with strictly electrochemical process of water electrolysis, MEC requires 5 to 10 less energy input, decreasing the energetic cost of so produced hydrogen (Liu et al., 2010).

Although microbial characterisation of several microbial BESs already showed the predominance of *Geobacter sulfurreducens* in electroactive biofilms, (Holmes, Bond, O'Neil, et al., 2004; Badalamenti et al., 2013), analysis of the microbial diversity of enriched anodic biofilms revealed that different microorganisms might be responsible for the observed electroactivity. However, these analyses did not reveal any tendency in dominant members within the biofilm communities. An example of such microbial diversity is shown by the ARBs usually found associated to either  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -*Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Acidobacteria* or *Actinobacteria* (Liu et al., 2010).

Biohydrogen production process by dark fermentation pathways in mixed cultures allows the conversion of hexose (saccharose, glucose) with limited conversion rate (2-3 moles of hydrogen per mole of hexose) and with the concomitant production of organic metabolites (mainly acetic and butyric acids) (Hawkes et al., 2007; Guo et al., 2010). Fed with acetate, a MEC produces up to 3 moles of hydrogen per mole of acetate (Liu et al., 2010; Gómez et al., 2011). The association of dark fermentation and MEC process could theoretically lead to the production from 8 to 9 moles of hydrogen per mole of hexose, which is close to the maximum theoretical potential hydrogen yield of 12 moles of hydrogen per mole of hexose.

However, environmental conditions are rather different between dark fermentation (low pH in a range of 5-6, 37°C) and MEC (neutral or alkaline pH, high conductivity). Nevertheless, previous studies showed the feasibility of dark fermentation at pH 8 under saline conditions (35g<sub>NaCl</sub>/L) in mixed culture (Pierra et al., 2013). While many species belonging to *Clostridium*, *Enterobacter* and *Escherichia* genera have been described in the literature as hydrogen-producing bacteria in mixed cultures (Hawkes et al., 2007; Wang and Wan, 2009a, 2009b; Guo et al., 2010; Quéméneur et al., 2010, 2012; Quéméneur, Hamelin, Benomar, et

al., 2011; Quéméneur, Hamelin, Latrille, et al., 2011), Pierra et al. (2013) reported a shift from *Clostridiales* to *Vibrionales* as main dominant bacteria in saline environment at pH 8 with an efficient hydrogen production of  $0,90 \pm 0.02 \text{ mol}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{Glucose}}$  at  $75 \text{ g}_{\text{NaCl}}/\text{L}$ .

Other studies considered the association of these two processes (Lalaurette et al., 2009; Lu et al., 2009; Wang et al., 2011; Tommasi et al., 2012; Lenin Babu et al., 2013). Tommasi et al. (2012) compared the two following coupling systems:  $\text{BioH}_2+\text{CH}_4$  (dark fermentation and methane production) and  $\text{BioH}_2+\text{MEC}$  (dark fermentation and  $\text{H}_2$ -producing MEC). The  $\text{BioH}_2+\text{MEC}$  system provided better results in terms of energetic conversion with  $2.41 \text{ mol}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{acetate}}$  with the MEC, which would correspond to a theoretical additional conversion rate of  $4.82 \text{ mol}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{glucose}}$  to dark fermentation. In this study, coupling was just simulated with a MEC fed with acetate and was not actually implemented. Other studies report a significant conversion of organic matter into hydrogen close to theoretical estimations, up to  $9.95 \text{ mol}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{glucose}}$  (Lalaurette et al., 2009) and  $8.79 \text{ mol}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{glucose}}$  (Lu et al., 2009).

So far, there has been little discussion about microbial aspects of such a coupling. Indeed, in most of the studies dealing with the association of dark fermentation and MEC for hydrogen production, effluent from dark fermentation process are centrifuged and the supernatant used to feed the anodic compartment of the MEC in order to avoid any disturbance of the MEC by fermentative bacteria (Lalaurette et al., 2009; Lu et al., 2009; Wang et al., 2011). This additional process implies increase in energy cost of the coupling. Whereas the experimental conditions change between dark fermentation and MEC (neutral pH, high conductivity, nutrient deprivation phenomenon), which could affect the fermentative bacteria, their introduction in the anodic compartment can also impact the ARB community structure and electrogenic activity. To date, this specific microbial interaction aspect has only recently been investigated (Lenin Babu et al., 2013). Lenin Babu et al. (2013) found the presence of *γ-Proteobacteria* (50%), *Bacilles* (25%) and *Clostridia* (25%) in the anodic compartment after coupling a dark fermenter and a MEC. Identification of *Clostridia* sp. shows the presence and the survival of fermentative bacteria in the anodic compartment. However, data are missing to better describe the influence of exogenous bacteria from dark fermentation process on microbial communities in terms of population structure and electroactive performances.

The objectives of this work are to determine whether the microbial biomass from the dark fermentation effluent could impact the activity of the ARB biofilm. This paper will focus on examining the dynamics of microbial community structures in successive batch experiments after introduction of the biomass obtained from dark fermentation performed at pH 6, pH 7 and pH 8. These pH conditions correspond respectively to the pH of dark fermentation (Guo et al., 2010), MEC (Logan, 2012) and to the inoculum or the possible dark fermentation process pH (Pierra et al., 2013).

The main issues addressed in this paper are: Are the electron transfer performances and the bacterial community structure of the ARB biofilm affected by exogenous bacteria issued from the dark fermentation process operated under three different pH conditions?

## **V.2.2. MATERIALS AND METHODS:**

---

Fermentative biomass was grown and collected from dark fermentation batch experiments at three different pH values: 6, 7 and 8. Then, the potential impact of these biomasses on an anodic biofilm in terms of bacterial community structure and performances was assessed using four different devices as described below. Four bioelectrochemical reactors were operated at pH 7, usual pH in BES (Logan, 2012). One was conducted at pH 7 with no addition of exogenous biomass as a control (RBC), and the three others were carried out with addition of the biomass from the dark fermenter operated at pH 6 (RB6), pH 7 (RB7) or pH 8 (RB8).

### **V.2.2.1. SOURCE OF INOCULUM**

---

The seed sediment used for hydrogen production in dark fermenter and biofilm growth in MEC was the same. It was sampled in a lagoon collecting wastewaters from a salt factory (Gruissan, France). The sediments were stored at lab temperature before inoculation. The initial pH of the sediments was 8.5 and the salinity 67.4 g<sub>NaCl</sub>/L.

### **V.2.2.2. BIOMASS COLLECTION FROM HYDROGEN-PRODUCING BATCH TESTS**

---

For each pH condition of biomass formation in batch cultures, hydrogen production experiments were performed in ten different 600 mL glass bottles. About 2.6 g of the seed

sediment was added to the culture medium to obtain a final concentration of 450 mgVS /L (final working volume of 200 mL). The culture medium was composed of 50mM MES (2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid) buffer, 5 g/L glucose and a mineral solution (Rafrafi *et al.*, 2013) (0.5g/L  $K_2HPO_4$ , 2g/L  $NH_4Cl$ , 0.2g/L Yeast Extract, 55mg/L  $MgCl_2$ , 6H<sub>2</sub>O, 7mg/L  $FeSO_4(NH_4)_2SO_4 \cdot 6H_2O$ , 1mg/L  $ZnCl_2$ , 2H<sub>2</sub>O, 1.2mg/L  $MnCl_2$ , 4H<sub>2</sub>O, 0.4mg/L  $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$ , 1.3mg/L  $CoSO_4$ , 7H<sub>2</sub>O, 0.1mg/L  $BO_3H_3$ , 1mg/L  $Mo_7O_{24}(NH_4)_6$ , 4H<sub>2</sub>O, 0.05mg/L  $NiCl_2$ , 6 H<sub>2</sub>O, 0.01mg/L  $Na_2SeO_3$ , 5 H<sub>2</sub>O, 60mg/L  $CaCl_2$ , 2 H<sub>2</sub>O, 35 g/L NaCl). The initial pH was adjusted to 6, 7 or 8 using NaOH (1M). To ensure anaerobic conditions, each bottle was flushed after inoculation with nitrogen gas for 15 minutes. Then, the bottles were capped with a rubber stopper and incubated at 35°C until they reached the maximum accumulated volume of hydrogen.

Biogas production was periodically estimated by measuring the headspace pressure. Biogas composition (CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> and N<sub>2</sub>) was determined using a gas chromatograph (Clarus 580, Perkin Elmer) coupled to Thermal Catharometric Detection (TCD), as described elsewhere (Quéméneur *et al.*, 2012).

The biomass was collected and centrifuged at 20,000 g for 30 minutes. Biomass was collected and resuspended in the original mineral medium (with no glucose). 40 mL of this biomass were added to the N-Stat reactor ( $OD_{620nm} = 16.6 \pm 0.8$ )

Aliquots of two-milliliters were collected at the end of each cycle and centrifuged (20,000g, 10 min). Supernatants and pellets were stored at -20°C. Supernatants were used for further chemical analysis and pellets for DNA extraction.

### **V.2.2.3. BIO-ELECTROCHEMICAL SYSTEMS (BES)**

---

#### **V.2.2.3.1. Medium for BES operation**

To be prepared to the coupling, the culture medium was the same as described previously in H<sub>2</sub> production batch tests operated for biomass collection, except that glucose as carbon source was replaced by 10 mM of acetate per graphite electrode present in the reactor.

Inoculum was added into culture medium (10% v/v for a final working volume of 500mL). To ensure anaerobic conditions, all reactors were flushed with nitrogen gas for 30 minutes after inoculation. Reactors were incubated at 37°C.

#### V.2.2.3.2. Bioelectrochemical arrangement set up

The devices used for the development of bacterial biofilms consisted of an arrangement of 6 electrodes including a reference electrode, a counter electrode and 4 working electrodes. All working electrodes were connected to the same reference and auxiliary electrodes using a multi-channel potentiostat equipped with a NStat system (VMP Bio-Logic SA). The electrodes corresponded to 4 graphite working electrodes (WE) 2.5x2.5x0.2cm (Goodfellow), a platinum Iridium grid (90%/10%) (Heraeus) as a counter electrode (CE) 5x5cm (Goodfellow) and a reference electrode (Saturated Calomel Electrode - SCE). To ensure the electrical connection with the working electrodes, titanium rods of 2 mm diameter and 12 cm long (Goodfellow) were used. The working electrodes were cleaned before use using a P800 sandpaper and rinsed with 99% purity ethanol. The platinum iridium grid cathode/or counter electrode was cleaned by heating in a blue flame. This system was particularly interesting as it permitted the simultaneous development of four identical electroactive biofilms using the four working electrodes as final electron acceptors.

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 SCE (potential +0.244 vs. SHE). Reactor medium was continuously homogenized thanks to a magnetic stirrer used at a 300 round per minute speed.

*Figure V-2* presents the N-Stat disposal used to get replicate biofilms on graphite plates. The 4 electrodes were successively removed from the disposal to follow the evolution of biofilm microbial community structure.

Current densities ( $j$  in  $A/m^2$ ) of the microbial biofilms were calculated considering the total immersed electrode surface area since electroactive biofilms covered both sides of the electrodes with the same microbial community profile (CE-SSCP patterns). Coulombic efficiencies ( $C_E$  in %) were calculated for each experiment according to Call *et al.* (2009).

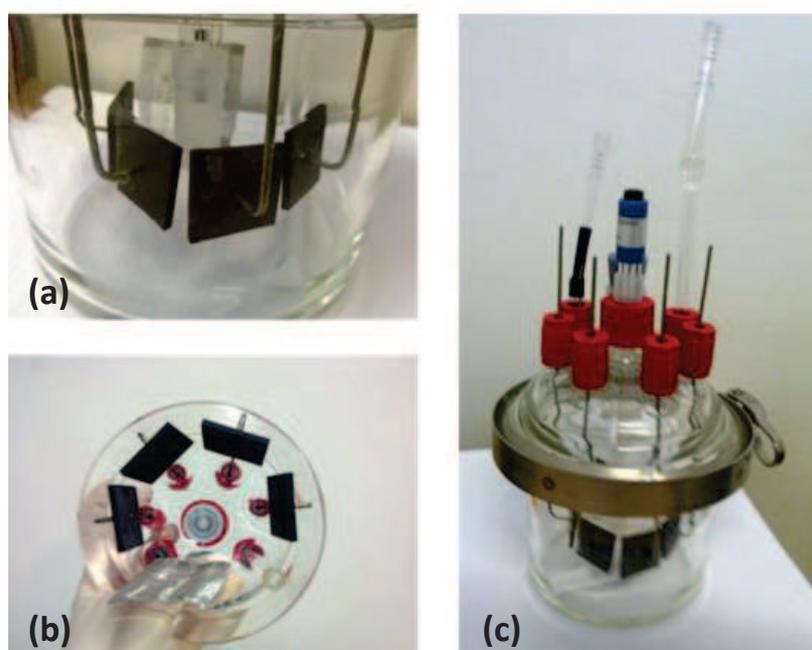


Figure V-2 : N-Stat arrangement to grow electroactive biofilms.

This disposal contains 4 graphite working electrodes, a platinum grid as a counter electrode and a reference electrode (Saturated Calomel Electrode - SCE). (a) View of the 4 graphite electrodes facing the SCE reference electrode and the platinum grid, (b) bottom view of the electrodes arrangement, (c) overall view of the empty reactor containing the 6 electrodes, a liquid and a gas sampling devices.

#### V.2.2.4. CHEMICAL ANALYSES

VFA composition of acetic (C2), propionic (C3), butyric and iso-butyric (C4 and iC4), valeric and iso-valeric (C5 and iC5) and caproic (C6) acids, was determined using a gas chromatograph (GC-3900 Varian) equipped with a flame ionization detector. Concentrations of non-VFA metabolic products such as ethanol, lactate and formate were measured by HPLC analysis and refractometric detection as described elsewhere (Quéméneur et al., 2012). Biogas production was periodically estimated by measuring the gas pressure in headspace. Biogas composition ( $\text{CH}_4$ ,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2$  and  $\text{N}_2$ ) was determined using a gas chromatograph (Clarus 580, Perkin Elmer) coupled to Thermal Catharometric detection (TCD), as described previously (Quéméneur et al., 2012).

#### V.2.2.6. MOLECULAR ANALYSES

---

##### V.2.2.6.1. DNA extraction, PCR amplification and CE-SSCP fingerprinting

DNA from biofilms was first extracted. Microbial community of biofilms and inoculum were 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 (50µL) contained 5µL of 10x Pfu Turbo DNA buffer, 200 nMf of dNTP, 500 nMf of each primer, 2.5 U µl<sup>-1</sup> 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).

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).

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

#### V.2.2.6.2. qPCR

PCRs were prepared using 96-well real-time PCR plates (Eppendorf, Hamburg, Germany) and Mastercycler ep gradient S (Eppendorf, Hamburg, Germany). Then, 12.5 µl of Express qPCR Supermix with premixed ROX (Invitrogen, France), 5 µl of DNA extract with three appropriate dilutions, 10 nM forward and reverse primers, 8 nM TaqMan probe, and water were added to obtain a final volume of 25 µl for all analyses. An initial incubation of 20 s at 95°C and 40 cycles of denaturation (95°C, 15 s; 60°C, 1 min) were performed. One standard curve was generated from each assay by using 10-fold dilutions in sterilized water (Aguettant Laboratory, Lyon, France) of the PCR products from known environmental clones. Clone LC103 was used as standard for Bacteria,. The initial DNA concentrations were quantified using the Infinite 200 PRO NanoQuant (Tecan, France). Two measurements were obtained per sample for each primer set.

### V.2.3. RESULTS AND DISCUSSION:

#### V.2.3.1. EXOGENOUS BIOMASS FROM DARK FERMENTATION

##### V.2.3.1.1. Hydrogen production in batch tests

Throughout the batch experiments, no  $\text{CH}_4$  was detected in the headspace and only  $\text{H}_2$  and  $\text{CO}_2$  were found as gaseous products. The maximum hydrogen production yields were  $0.469 \pm 0.209 \text{ mol}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{Glucose}}$ ,  $0.510 \pm 0.096 \text{ mol}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{Glucose}}$  and  $0.517 \pm 0.158 \text{ mol}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{Glucose}}$  at pH of 6, 7 and 8, respectively (Figure V-3). These results are in good agreement with previous results published on dark fermentation (Quéméneur et al., 2012; Pierra et al., 2013). As an illustration, Pierra et al. (2013) obtained  $0.65 \pm 0.04 \text{ mol}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{Glucose}}$  in dark fermentation batch reactors conducted under saline conditions at pH 8 and using a saline sediment inoculum.

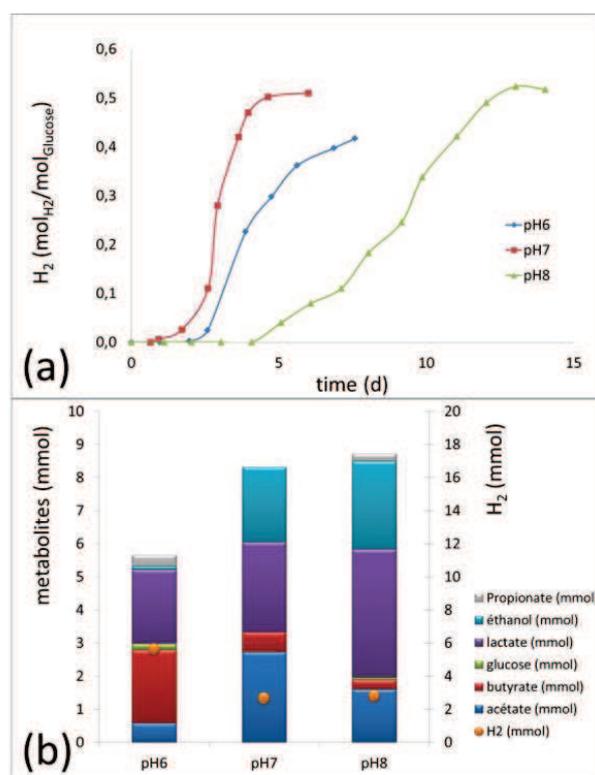


Figure V-3 : Hydrogen production of biomass used as exogenous bacteria on biofilm at the maximum hydrogen production point.

(a) Hydrogen production yield ( $\text{mol}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{Glucose}}$ ) for each series of batch of fermentation reactor at pH 6, pH 7 and pH 8. (b) Metabolic end-products (in mmoles) and maximum  $\text{H}_2$  production (in mmoles) according to pH. The values correspond to an average of batch replicates.

In the batch tests operated at pH 8, a substantial increase of the lag phase occurred from  $1.4 \pm 0.7$  days (pH 6-7) to 4 days. A possible explanation for this increase could be either a low amount of microorganisms capable of hydrogen production in the inoculum, a longer generation time of these microorganisms or an osmotic adaptation of the microorganisms (Oren, 2001; Van Niel et al., 2003).

The metabolic end products generated by fermentation at the maximum hydrogen production point are reported on *Figure V-3(b)*. The production of hydrogen occurred via acetate and butyrate pathways. However, concomitant concurrent routes inhibited the hydrogen conversion rate (ethanol and lactate). Interestingly, the low quantity of propionate measured in all batch reactor corroborates the hypotheses of Pierra et al. (2013) who suggested that hydrogen consuming propionate-producing bacteria were strongly inhibited by NaCl.

#### V.2.3.1.2. Microbial community

The 16S rRNA gene based CE-SSCP profiles of cultures operated at different pH are presented in *Figure V-4*. Each profile corresponds to a mix of batch bottles' bacterial communities at the maximum hydrogen production time. In comparison with the inoculum Simpson diversity index of 0.99, these profiles presented very simple communities structures with diversities indexes of 0.95, 0.91 and 0.86 (respectively for pH 6, pH 7 and pH 8). Moreover, a strong bacterial selection appears with only one or two main peaks as dominant bacteria for each pH batch communities. These results further support the idea of a high selection in bacterial communities due to dark fermentation process (Quéméneur, et al., 2011; Pierra et al., 2012; Quéméneur et al., 2012)

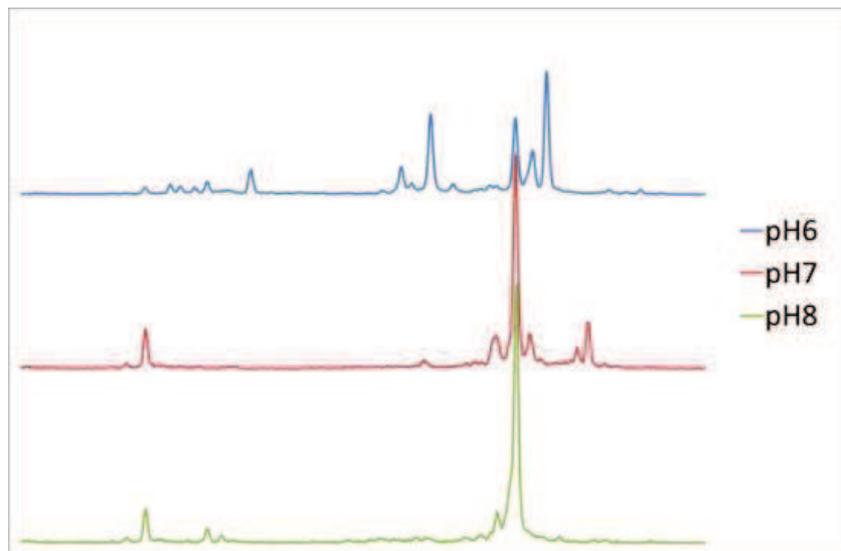


Figure V-4 : CE-SSCP profiles of biomass based on 16S rRNA gene fragments retrieved from fermentation batches at pH 6, pH 7 and pH 8.

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

### V.2.3.2. EFFECT OF EXOGENOUS BACTERIA ON ANODIC BIOFILM

#### V.2.3.2.1. Effect on electron transfer

All reactors were operated at pH 7. No biomass addition was operated in reactor RBC. The three others reactors were conducted with the addition of biomass from dark fermentation batch tests operated at pH 6 (RB6), 7 (RB7) or 8 (RB8). Figure V-5 presents the current densities among time (chronoamperometric curves) for all reactors with removal time for each biofilm and exogenous biomass addition time. On all graph (Figure V-5), each cycle starts with acetate addition and correspond to all acetate consumption. Current density is assessed to figure out the electron transfer rate to the anode. A conductive biofilm would permit to reach high current densities (Lovley, 2012). The chronoamperometric curves on first cycles of each reactor present a good reproducibility of biofilm performances with the N-stat device. Tableau v-1 presents the Coulombic efficiency ( $C_E$ ) as well as the maxima current densities values ( $J_{max}$ ).  $C_E$  depicts the fraction of electrons available in the substrate that ends up as electrical current in the system (Sleutels et al., 2011). This parameter indicates the percentage of electrons harvested from the oxidation of substrate and transferred to the anode by the biofilm. An increase of the Coulombic efficiency is consequently 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 (Hamelers et al., 2010) .

With no biomass addition (RBC), a conservation of the current densities was shown along the cycles with stable maximum currents densities from  $9.3 \pm 0.1 \text{ A/m}^2$  for the first cycle to  $9.2 \pm 0.6$  to the third cycle (Figure V-5, Tableau v-1).

Addition of biomass from batch fermenters performed at pH 6 in RB6 resulted in a decrease of the maximum current density from  $9.8 \pm 0.8 \text{ A/m}^2$  to  $5.7 \pm 0.1 \text{ A/m}^2$  for the first and third cycles, respectively (Figure V-5, Tableau v-1). Reactor RB8, in which the biomass from the batch fermenters performed at pH 8 was added, presented the same behavior with a decrease of the maximum current density from  $9.6 \pm 0.8 \text{ A/m}^2$  to  $5.4 \pm 0.5 \text{ A/m}^2$  from the first to the last cycle (Figure V-5, Tableau v-1). However the Coulombic efficiency was maintained in both reactors. This is consistent with a previous study of Lu et al. (2009) that operated a single chamber MEC with centrifuged and non-centrifuged effluent from ethanol dark fermentation to determine whether the microbial biomass and other particulate COD

affected hydrogen production. At an applied voltage of +0.6 V vs. Ag/AgCl, they obtained hydrogen production rates of  $1.39 \text{ m}^3 \text{ H}_2/\text{m}^3 \cdot \text{d}$  ( $135 \text{ A}/\text{m}^3$ ) using a centrifuged sample, compared with  $1.32 \text{ m}^3 \text{ H}_2/\text{m}^3 \cdot \text{d}$  ( $123 \text{ A} \cdot \text{m}^3$ ) with a non-centrifuged sample. This suggested that substrate conversion into electrons was not affected by the exogenous biomass. In the specific case of our study, the batch conditions could be the cause of the decrease of the current densities. Indeed, previous studies suggested that batch conditions advantage methanogens that requires a longer lag phase (Lee et al., 2009). Indeed, we measured methane in all ends of batch 3<sup>rd</sup> cycle with  $33.4 \pm 9.7\% \text{ CH}_4$ .

In RB6 and RB8, the decrease of the electron transfer rate of the biofilm ( $j_{\text{max}}$ ) was likely due to an increase of the biofilm thickness, as a thicker biofilm was observed. These simultaneous phenomena seemed to be linked and be related to the fact that the biofilm thickness was responsible for the decrease of the electron transfer rate. What can be hypothesized is that the stress provoked by the addition of exogenous bacteria species on the indigenous species developed on the anode could have activated metabolism pathways for the production of EPS (extracellular polymeric substances). The possible synergistic interactions between bacteria composing the mixed culture biofilm could explain the resistance observed in opposition to the different exogenous species added into the bioreactor where the electroactive biofilms could develop. Indeed, Burmølle et al. (2006) demonstrated that multispecies biofilms characterized with bacterial synergistic interactions were producing a greater amount of biomass and showing a particular resistance to bacterial invasion. These observations fit with the increase in biofilms thickness observed after the exogenous contamination but also regarding the resistance to any exogenous settlement in the biofilm structure. Thus, an increase of the biofilm thickness could be the cause of a more difficult access to the substrate and/or a complicated and longer transfer of the electrons from the outside bacteria layers of the biofilm to the bacteria layer in contact with the electrode, finally transferring the electrons. A thicker biofilm can be the place for the substrate sequestration. Indeed Freguia et al. (2007) showed that electroactivity of MFCs biofilms can be maintained after the primary substrate has been reduced to low concentrations in liquid phase, suggesting a crucial role of substrate storage in the thicker EPS matrix of the biofilm. This way, the acetate located in the extracellular matrix can only be used by electroactive bacteria and not by the suspended/planktonic ones.

The addition of the microbial biomass issued from the batch tests performed at pH 7 in RB7 showed an increase of the maximum current density in the second cycle (just after exogenous bacteria addition). This increase was likely due to a less important perturbation of biofilm with an exogenous biomass originating from a batch fermenter run at the same pH as the BES system. It could also be due to a technical constraint that caused the removal of 2 electrodes and provided more substrate (quantity added for 3 electrodes) to the 2 remaining electrodes. This higher substrate concentration in the reactor, compared to RB6 and RB8, could cause a higher current density (Torres et al., 2007). Then, the maximum current density of RB7 reactor decreased sharply from  $10,8 \pm 1,3$  to  $4.1 \text{ A/m}^2$ , presenting the same current production curve as RB6 and RB8 (Figure V-5, Tableau v-1). As observed for RB6 and RB8, RB7 presented maintenance of Coulombic efficiency (Tableau v-1). This supports the previous hypothesis made with RB6 and RB8 of a thicker biofilm limiting the electron transport through biofilm as naked eye observations were similar (thicker biofilm in RB6, RB7 and RB8 than in RBC).

On the other hand, the Coulombic efficiency ( $C_E$ ) seems to be maintained with the addition of exogenous species. In all reactors, the Coulombic efficiency, higher than 100%, was likely due to the oxidation of hydrogen produced at the cathode that can be operated by electroactive bacteria and produces more electrons sent to the cathode (Lalauette et al., 2009; Miceli et al., 2012) since a significant percentage of hydrogen was detected in the gas phase of our experiments (e.g., the percentage of hydrogen during chronoamperometry at the maximum of current production was 73.0% in RBC; 67.2% in RB6; 65.1% in RB7 and 53.1% in RB8).

A significant percentage of methane was observed at the end of the 3<sup>rd</sup> cycle as well as no hydrogen in the gas phase of our experiments (e.g., the percentage of methane during chronoamperometry at the end of the 3<sup>rd</sup> cycle was 40.0% in RBC; 35.1% in RB6; 19.2% in RB7; and  $\text{CH}_4$  39.2% in RB8). Hydrogen consumption and  $\text{CH}_4$  production were already observed during long batch cycles experiments (Lee et al., 2009). Indeed, methanogens could be brought with the inoculum in bioreactors. These methanogenic *Archaea* could also be present in the biomass coming from the dark fermentation tests. Since the doubling time is longer for methanogenic *Archaea* than for bacteria (Lee et al., 2009), batch conditions were more favourable to methanogens to grow not being washed. Using this property, in

continuous flow reactor, methane production could be avoided with a low hydraulic retention time (Lee et al., 2009).

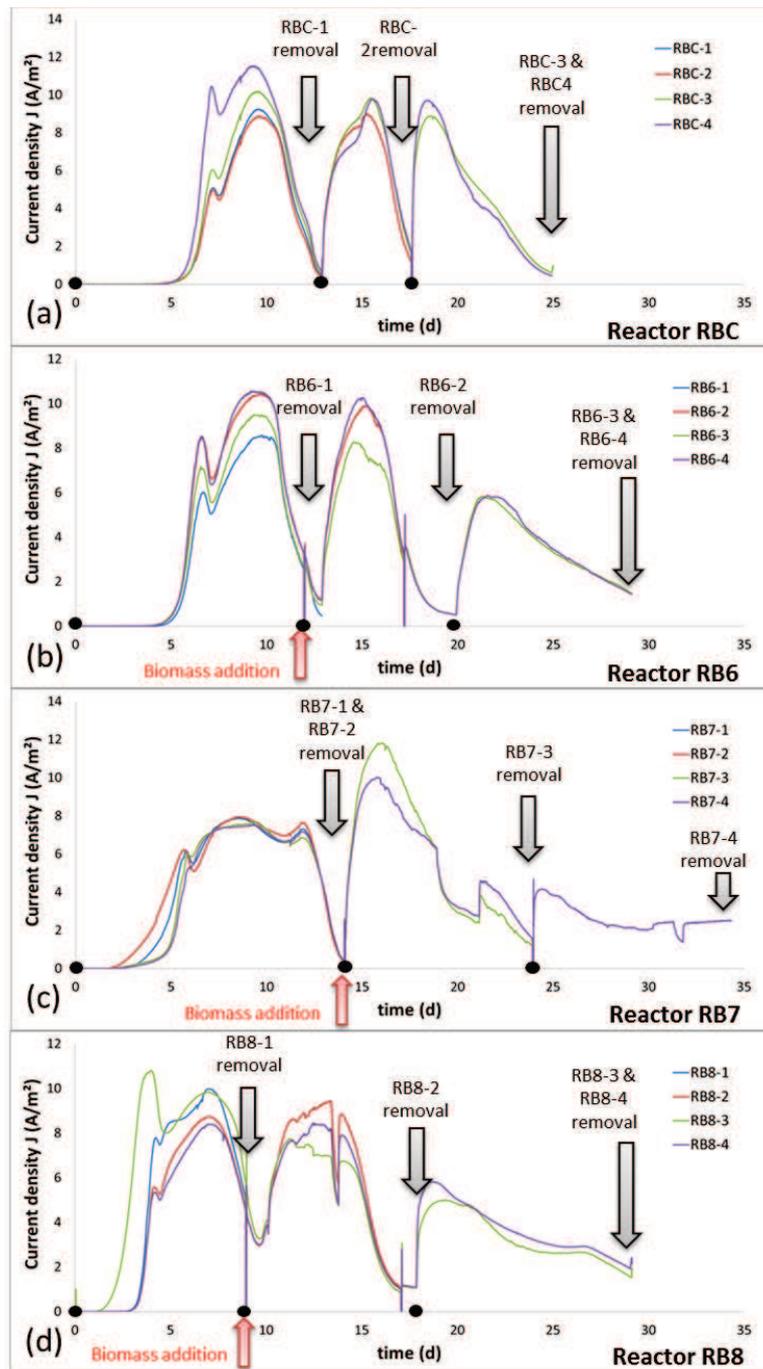


Figure V-5 : Chronoamperometry in the different systems:

Control reactor labeled RBC and biomass contaminated reactors with microbial communities harvested from batch fermenters performed at: (b) pH 6 for reactor RB6, (c) pH 7 for reactor RB7 and (d) pH 8 for reactor RB8. Black arrows present the removal of biofilms and red arrow present the biomass injection time. Biomass was injected after the first batch cycle. In the case of pH 7 batch contamination, 2 biofilms were collected first, due to technical constraint. On each graph, ● presents acetate injection.

Tableau V-1: Coulombic efficiencies (%) and maximum current densities ( $A/m^2$ ) obtained from biofilms in the different reactors for each acetate-feeding cycle.

RBC is the control reactor without biomass addition and RB6, RB7 and RB8 are the contaminated reactors with biomass originated from batch fermenters respectively conducted under pH 6, pH 7 and pH 8. Cycles are labeled 1, 2 and 3 for successive batch cycles.

Reactor	$C_E$ (%) $J_{max}$ ( $A/m^2$ )	Cycle 1	Cycle 2	Cycle 3
RBC	$C_E$	108%	88%	101%
	$J_{max}$	$9.3 \pm 0,1$	$9.4 \pm 0,5$	$9.2 \pm 0,6$
RB6	$C_E$	123%	93%	108%
	$J_{max}$	$9.8 \pm 1,0$	$9.4 \pm 1,2$	$5.7 \pm 0,1$
RB7	$C_E$	154%	168%	156%
	$J_{max}$	$7.7 \pm 0,2$	$10.8 \pm 1,3$	4.1
RB8	$C_E$	105%	132%	105%
	$J_{max}$	$9.6 \pm 0,8$	$8.4 \pm 0,9$	$5.4 \pm 0,5$

#### V.2.3.2.2. Impact of exogenous fermentative bacteria on biofilm communities

The 16S rRNA gene based CE-SSCP profiles of bacterial communities in reactors RBC, RB6, RB7 and RB8 are presented in Figure V-6. These profiles present very simple community structures with low Simpson diversity indexes of  $0.85 \pm 0.05$  in comparison to the inoculum diversity index of 0.99. A strong evidence of bacterial selection emerges with only one or two main peaks as dominant bacteria for each biofilm bacterial community. No specific trend of the Simpson diversity indexes among cycles was shown. These results show that there was no impact of exogenous bacteria originating from dark fermentation batch tests on biofilm bacterial community structures.

Since an increase of the biofilm thickness was observed among cycles in reactors RB6, RB7 and RB8, we assessed the quantity of bacteria per surface unit on electrodes with quantitative PCR. Analyses operated on all biofilm revealed no difference in quantity of bacteria among cycles and between reactors (data not shown). Again, this suggests that the increase of thickness observed for RB6, RB7 and RB8 could be due to an EPS production in order to protect settled bacteria (Burmølle et al., 2006) more than a bacterial growth.

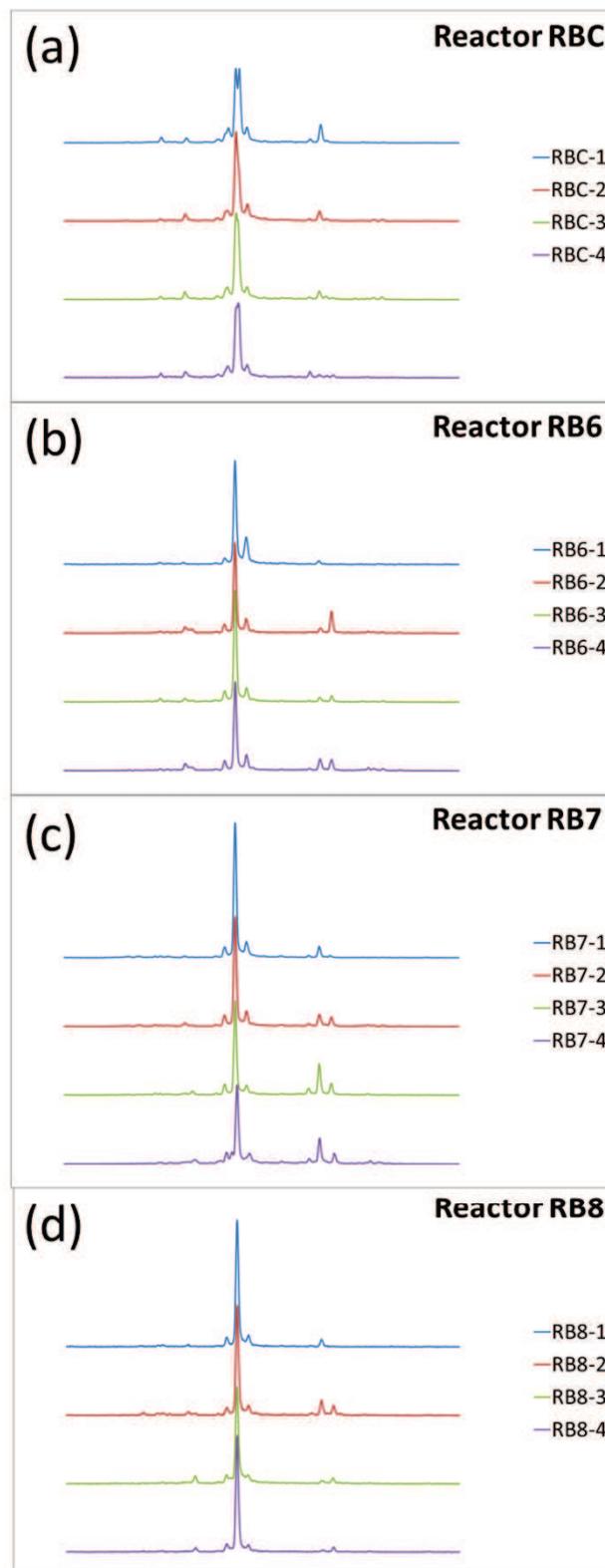


Figure V-6 : CE-SSCP profiles of biomass based on 16S rRNA gene fragments retrieved from biofilms in the 4 different reactors:

(a) Control and (b), (c) and (d) biomass contaminated reactors with microbial community harvested from batch fermenters performed at: (b) pH 6, (c) pH 7 and (d) pH 8. The profiles correspond to sampling times indicated on Figure V-5. X and Y axes of each peak represent respectively the relative peak electrophoresis migration distance and the relative peak intensity (Arbitrary units).

### V.2.3.2.3. Bacterial Identification results

#### V.2.3.2.3.1 Fermentative biomass

16S rDNA Pyrosequencing of pH 8 dark fermentative batch culture led to the identification of the main bacteria selected during fermentation process. These bacteria (percentage up to 1%) were related to *Psychrobacter psychrophilus* (64.1%), *Psychrobacter* sp. (21.2%), *Nesiotobacter* sp. (7.8%) and *Arthrobacter protophormiae* (3.4%). Despite *Psychrobacter* species have been described as aerobic and mesophilic bacteria, few studies showed that some of these bacteria can grow in fermenting environments (Yoon, 2003; Yoon, Lee, Kang, et al., 2005; Yoon, Lee, Yeo, et al., 2005; Li et al., 2013), which is concomitant with the selection operated of these main bacteria in dark fermentation batch reactors.

#### V.2.3.2.3.2 Biofilms

Tableau V-2 presents the percentage of species representing 1% or more of the bacterial community developed in biofilms of the first bioreactor contaminated with pH 8 batch fermenters biomass (RB8) and the electroactive biofilms developed in the uncontaminated bioreactor (RBC). These results had been obtained by 16S rDNA pyrosequencing. These results are in accordance with bacterial community structure fingerprints (Figure V-6) where no trend in microbial selection on the electroactive biofilm for reactor RB8 was observed. What is brought out here is that the maximum current density can be such high with an electroactive biofilm composed of more than 90% of *G. subterraneus* as with an electroactive biofilm composed of 65% *G. subterraneus*, 16% *Desulfuromonas* sp. and 16% *Malonomonas rubra*.

*Desulfuromonas* spp. has been widely studied in the literature as an ARB (Bond et al., 2002; Bond and Lovley, 2003; Holmes, Bond, O'Neil, et al., 2004; Logan and Regan, 2006; Nevin et al., 2009; Dumas et al., 2008b; Nevin et al., 2008; Call et al., 2009; Wei et al., 2010; Marsili et al., 2010; Qu et al., 2012; Miceli et al., 2012; Nercessian et al., 2012). In contrast, only one recent study found bacteria genetically related to *G. subterraneus* as a dominant ARB in mixed culture, i.e. in the microbial population of electroactive microbial biofilms enriched from shoreline and mangrove sediments (Miceli et al., 2012). *Geoalkalibacter* was dominant in highly enriched biofilms producing significant current densities (4.2 to 8.9

A/m<sup>2</sup>). Additionally, *G. subterraneus* anodic electron transfer was independently evidenced using a pure culture by two different research groups (Carmona-Martínez 2013; Badalamenti 2013). In those studies, *G. subterraneus* provided high current densities with respectively 5.06±0.15 A/m<sup>2</sup> and 5.0 A/m<sup>2</sup>.

Tableau V-2 : Taxonomic classification of bacterial taxonomic distribution (in %) according to biofilms retrieved from N-stat control reactor and from N-Stat contaminated reactors with fermentative biomass grown at pH 8.

Names correspond to the closest phylogenetical known sequence depending on percentage of identity (>97% for species identification). Relative abundance was defined as the number of sequences affiliated with that taxon divided by the total number of sequences per sample. Samples making up less than 1% of total composition were grouped in "others".

Name	RB8-1	RB8-2	RB8-3	RB8-4	RBC-1	RBC-2	RBC-3	RBC-4
	Reactor RB8				Reactor RBC			
<b><i>Geoalkalibacter subterraneus</i></b>	<b>96,1</b>	<b>89</b>	<b>94</b>	<b>93,7</b>	<b>65,8</b>	<b>76,9</b>	<b>72</b>	<b>59,4</b>
<b><i>Desulfuromonas</i> sp.</b>	3,2	7,9	1,5	1,1	16,4	7,4	7,9	2
<b><i>Desulfuromonas acetoxidans</i></b>	0	0	0	0	0,4	0	0	0
<b><i>Malonomonas rubra</i></b>	0	0	0,1	0	15,6	13,9	19	38,2
<b><i>Clostridium halophilum</i></b>	0,4	1,8	1,1	1,4	0,1	0,1	0,0	0,0
<b>Others</b>	0,3	1,3	3,3	3,8	1,7	1,7	1,1	0,4

*Malonomonas rubra* was interestingly described as a microbe phylogenetically closely related to *Desulfuromonas acetoxidans* (about 92% similarity between 16S rRNA sequences (Kolb et al., 1998)). This bacterium was shown to be particularly interesting as it produces c-type cytochrome similar to those of sulphur and sulphate reducers (Kolb et al., 1998). The presence of *Malonomonas rubra* in RBC biofilms can be explained by its ability to an external electron transfer which is similar to anodic respiration (Roden and Lovley, 1993; Wang et al., 2010).

The maintenance of RB8 biofilms among cycles and the absence of changes in bacterial community structure suggested that synergetic relations could permit to protect this structure against external factors. The involvement of exogenous bacteria in syntrophic

relation has already been shown, based on substrate consumption (Parameswaran et al., 2009; Kiely, Regan, et al., 2011). Moreover, the rather high current densities reached compared to the literature on graphite plate electrodes were similar to previous studies (Erable et al., 2009; Miceli et al., 2012) supported the idea that this mixed culture could develop a strong resistance to external perturbations. Indeed, there was no settlement of *Psychrobacter psychrophilus*, selected in pH 8 dark fermenters as main bacteria, neither of other minor population of the exogenous community.

#### **V.2.4. CONCLUSION**

---

The objectives of this research were to determine if the electron transfer performances and the bacterial community structure of the ARB biofilm could be affected by the exogenous bacteria originated from several dark fermentation pH conditions. Our results show that the electroactive biofilm originated from sediment presents a robust biofilm showing high current densities and a robust bacterial community structure. The input of exogenous bacteria from batch dark fermenters has no impacts on this strong biofilm bacterial structure. Nevertheless, these exogenous species addition affects the current density generated by the biofilm likely owing to EPS production and methane production occurring in such batch conditions.

### V.3. DISCUSSION ET CONCLUSION

---

Ce travail portait sur la détermination de l'impact de l'ajout d'espèces exogènes issues de la fermentation sur le biofilm électroactif, tant sur ses propriétés électroactives que sur sa structure de communauté microbienne. Les espèces exogènes et le biofilm électroactif ont été choisis en fonction des études préalables réalisées dans le cadre de cette thèse. Trois type de biomasses fermentaires différentes par leur pH de croissance ont été utilisées : pH 6, 7 ou 8 correspondant respectivement aux pH de la fermentation pour produire du bioH<sub>2</sub> dans la littérature (Guo et al., 2010), de l'électrolyse microbienne (Logan, 2012) et au pH naturel de l'inoculum également utilisé lors de la fermentation réalisée dans le Chapitre III (Pierra et al., 2013). Le biofilm électroactif a quant à lui été enrichi sur anode à partir de sédiments des salins de Saint Martin à Gruissan. Comme dans les chapitres précédents, tous les milieux (fermentation et réacteur bioélectrochimique) étaient salins avec une concentration en chlorure de sodium de 35 g<sub>NaCl</sub>/L. Tous les réacteurs bio-électrochimiques ont été conduits à pH 7.

Les densités de courants obtenues dans cette étude sont élevées par rapport à la littérature dans des conditions similaires de salinité (Erable et al., 2009; Miceli et al., 2012) (9.8±0.8 A/m<sup>2</sup> dans RB6, 10,8±1,3 dans RB7, 9.6±0.8 A/m<sup>2</sup> dans RB8, 9,3±0,1 A/m<sup>2</sup> dans RBC au premier cycle). Les communautés microbiennes développées sur le biofilm étaient très simplifiées avec un profil SSCP présentant un ou deux phylotypes principaux. L'ajout d'espèces exogènes n'a pas montré de modification significative de structure de communauté microbienne pour toutes les conditions de fermentation testées, ce qui laisse supposer que la forte sélection des espèces électroactives sur l'anode et l'efficacité de ce biofilm vont de pair avec la robustesse du biofilm.

De plus, l'augmentation de l'épaisseur du biofilm constatée visuellement lors des prélèvements successifs dans les réacteurs RB6, RB7 et RB8, (cf. exemple en Figure Annexe-9 de annexe 2) ayant reçu respectivement la biomasse exogène issue de fermenteurs à pH 6, pH 7 et pH 8 ainsi que le maintien de la quantité de bactéries dans ces biofilms laisse supposer que la communauté microbienne qui compose le biofilm ait développé un réseau d'EPS (Extracellular Polymeric Substances) pour se protéger d'une éventuelle colonisation du biofilm par les espèces exogènes (Burmølle et al., 2006).

L'augmentation de l'épaisseur du biofilm et la séquestration du substrat dans la matrice d'EPS pourrait expliquer le maintien d'une densité de courant plus faible sur une plus longue période en 3<sup>ème</sup> cycle de batch (*Figure V-5*) et un maintien du rendement faradique (*Tableau V-1*) (Freguia et al., 2007).

Enfin en perspectives, il serait intéressant de réitérer cette expérience en continu et non en batch successifs. En effet, la présence de méthane dans le ciel gazeux des réacteurs bioélectrochimique laisse supposer un développement de méthanogènes consommateurs d'hydrogène et d'acétate (Lee et al., 2009). Ces méthanogènes pourraient donc à la fois affecter directement la production d'hydrogène mais aussi être en compétition avec le biofilm électroactif pour la consommation de substrat (acétate). La conduite de réacteur en continue permettrait un lessivage de ces méthanogènes et éviterait qu'elles s'établissent dans le compartiment anodique du fait de leur temps de doublement plus long.

Pour l'heure en termes d'application sur le procédé de couplage, les résultats en termes de rendement faradique et donc de conversion du substrat en électrons montre une activité maintenue du biofilm électroactif. La réalisation du couplage en cellule d'électrolyse microbienne avec séparation des compartiments anodique et cathodique par une membrane permettrait d'éviter l'oxydation de l'hydrogène produit à la cathode par l'anode et d'obtenir une tendance plus juste de la réelle efficacité électroactive du biofilm.

*Nota : Les pyroséquençages des communautés microbiennes des réacteurs RB6 et RB7 ainsi que des communautés fermentaires issues des fermenteurs batch à pH 6 et pH 7 est en cours de réalisation.*



---

## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

---



L'objet de cette thèse était d'analyser les liens entre la structure des communautés microbiennes en MEC et en fermentation, les individus qui les composent et les fonctions macroscopiques (propriétés électroactives du biofilm, potentiel de production d'hydrogène) qui leur sont associées dans des conditions permettant de réaliser le couplage des deux procédés.

Dans un premier temps, la fermentation en condition saline (3-75 g<sub>NaCl</sub>/L) favorable au transport de charges dans l'électrolyte de la MEC, a été étudiée à pH 6, favorable à la production d'hydrogène, et pH 8, pH de l'inoculum salin dans son environnement. A pH 8 comme pH 6, la faisabilité de la production de biohydrogène par fermentation a été démontrée en lien avec l'inhibition de la consommation de l'hydrogène produit. Les essais en batch à pH 8 ont également révélé une très forte prédominance d'une nouvelle souche de *Vibrionaceae* pour les concentrations en sel les plus élevées (58-75 g<sub>NaCl</sub>/L). A pH 6, des espèces proches des clostridies produiraient de l'hydrogène jusqu'à 41 g<sub>NaCl</sub>/L avec de meilleurs rendement qu'à 3 g<sub>NaCl</sub>/L mais une vitesse de production maximale plus faible. Cette étude a montré, contrairement aux études précédentes, une production d'hydrogène supérieure aux concentrations en sel marines à pH 6 (entre 12 et 48 g<sub>NaCl</sub>/L) et croissantes à pH 8 (jusqu'à 70g<sub>NaCl</sub>/L). Ces résultats sont vraisemblablement dus à l'utilisation de sédiments salins comme inoculum, contenant donc des microorganismes adaptés à ces conditions salines.

Dans un deuxième temps, la sélection microbienne et les performances électroactives de biofilms (densité de courant produite et rendement faradique) ont été étudiées dans des conditions compatibles avec la fermentation et en condition saline pour augmenter la conductivité en MEC, en utilisant également un inoculum salin. Des conditions de pH de 5,5 et 7 ont été testées ainsi que l'alimentation du biofilm avec de l'acétate seul ou un mélange d'acétate et de butyrate. Ces essais ont permis la sélection de deux espèces microbiennes dominantes dans tous les biofilms anodiques (*Geoalkalibacter subterraneus* et *Desulfuromonas acetoxidans*). Ces espèces présentent des propriétés électroactives prometteuses avec des densités de courant produites jusqu'à 8,5 A/m<sup>2</sup>. Les performances atteintes par le biofilm à pH 5,5 et avec ajout d'un mélange d'acides organiques étaient moindres qu'à pH 7 alimenté avec de l'acétate seul. Dans le cadre d'un couplage de la fermentation et de l'électrolyse microbienne, les conditions de fermentation à pH 8 testées dans la première partie apparaissent particulièrement intéressantes du fait de la conduite difficile du biofilm électroactif à pH bas, même en milieu salin.

En parallèle, une méthode d'enrichissement a été étudiée afin de sélectionner ces espèces sur leur capacité à transférer leurs électrons à des oxydes de Fer(III) à partir d'une source d'inoculum naturelle. Trois étapes d'enrichissements successives sur Fer(III) ont été réalisées. Une divergence des communautés microbiennes sélectionnées dans les enrichissements liquides et sur l'anode a été observée. Celle-ci peut être corrélée à une diminution des performances électroactives du biofilm après deux ou trois étapes d'enrichissement sur Fe(III). Toutefois, l'utilisation de la première étape d'enrichissement liquide comme inoculum pour former un biofilm a permis d'augmenter la conversion d'acétate en électrons transférés à l'anode (le rendement faradique) de  $30\pm 4\%$  à  $99\pm 8\%$  par rapport à un biofilm directement inoculé avec les sédiments de départ. Ces résultats permettent d'expliquer la divergence des opinions rapportées dans la littérature sur l'efficacité de cette méthode pour sélectionner des ARB. En effet, les différentes études précédentes ont été réalisées avec un nombre variable de cycles d'enrichissements qui impactait les performances électroactives du biofilm. Suite à cette étude, il a été suggéré d'optimiser l'utilisation de cette méthode de pré-sélection des ARB en ne réalisant qu'un unique cycle d'enrichissement sur Fe(III) afin de ne pas spécialiser la communauté microbienne, par repiquages successifs, pour une respiration sur Fe(III).

De plus, deux espèces électroactives (*Geoalkalibacter subterraneus* et *Desulphuromonas* spp.) ont été retrouvées en dominance ou codominance dans les biofilms obtenus dans les expériences réalisées dans les deux premières parties de cette thèse. Ceci a mené à une étude de leur dynamique de colonisation sur l'électrode afin d'établir si ces deux espèces majoritaires obtenues systématiquement sur anode s'implantent de façon séquentielle. Au contraire, nous avons observé le caractère précoce de la dominance ou codominance de *Geoalkalibacter subterraneus* et *Desulphuromonas* spp. qui est établie dès le début de la phase exponentielle du transfert d'électrons du biofilm vers l'électrode, sans évolution de la communauté microbienne du biofilm par la suite. La sélection très marquée de ces espèces électroactives était vraisemblablement due au caractère très sélectif du milieu et aux paramètres opératoires très contrôlés (pH7, 37°C, 35 g<sub>NaCl</sub>/L, anode à potentiel contrôlé).

Enfin l'effet de l'ajout d'espèces exogènes issues de la fermentation en milieu salin sur l'écologie du biofilm électroactif a été étudié. Trois types de biomasses fermentaires ont été ajoutés au milieu contenant le biofilm électroactif formé au préalable. Ces biomasses étaient issues de réacteurs batch conduits à différentes valeurs de pH correspondants aux pH de la fermentation dans la littérature (pH 6), de l'électrolyse microbienne (pH 7) et de l'inoculum et de la fermentation réalisée dans la première partie de la thèse (pH 8). Cette expérience a montré que l'ajout des espèces exogènes sélectionnées en fermentation n'a pas d'impact significatif sur la structure de communauté microbienne du biofilm. Ceci suggère que malgré la forte sélection d'espèces électroactives et l'efficacité de ces biofilms, ils présentent une certaine robustesse vis-à-vis de perturbations biotiques. Cependant une augmentation de l'épaisseur du biofilm constatée visuellement dans les réacteurs contaminés avec des espèces exogènes et non dans le réacteur témoin suggère une production d'EPS (Extracellular Polymeric Substances) par le biofilm pour se prémunir d'une éventuelle invasion par ces espèces exogènes. Ceci pourrait expliquer la diminution de la densité de courant observée dans ces biofilms : le transfert de substrat y serait ralenti en raison de cet épaissement, se traduisant par une diminution de la vitesse de transfert d'électrons vers l'anode.

L'ensemble des expérimentations présentées dans cette thèse ont permis de mettre en lien les structures de communautés microbiennes en fermentation et en MEC avec leurs performances en termes de production d'hydrogène et d'électroactivité dans des conditions permettant de réaliser le couplage des deux procédés. Le même inoculum salin anaérobie et présentant une importante diversité a été utilisé avec succès en fermentation et en BES. Issu d'un environnement anaérobie riche en matière organique et en sel, soumis à des conditionnements et des pressions de sélections différents, il a fait émerger des communautés microbiennes performantes en fermentation comme en BES. Cette origine commune des différentes communautés microbiennes pourrait expliquer la non-contamination du biofilm électroactif en BES par les espèces issues des effluents de fermentation, sélectionnées à partir du même inoculum de départ. Ce travail souligne donc l'importance du choix de l'inoculum, de la stratégie de son conditionnement et de sa mise en œuvre sur le fonctionnement de bioprocédés en cultures mixtes.

Les résultats de cette thèse offrent d'intéressantes perspectives de recherche, notamment:

- Les deux souches systématiquement retrouvées dans les biofilms électroactif de cette étude comme dominantes ou co-dominantes (*Gealkalibacter subterraneus* et *Desulfuromonas acetoxidans*) peuvent être cultivées en culture pure et en co-culture à différents ratios d'inoculation afin d'étudier leurs éventuelles interactions et les conséquences sur l'électroactivité du biofilm. Les conclusions de cette étude pourraient permettre d'envisager une démarche d'ingénierie écologique consistant à ajouter ces souches à des inocula naturels pour améliorer les performances du système.
- D'autre part, la stratégie d'inoculation après enrichissement sur Fe(III) n'a été testée que sur un seul inoculum (sédiments). D'après les résultats de sélection d'un inoculum obtenus précédemment, ces sédiments constituaient une bonne source de bactéries électroactives. Cette méthode d'enrichissement pourrait être testée sur des sources d'inoculum différentes et qui ne présentent pas *a priori* un potentiel aussi élevé pour la formation de biofilm électroactifs.
- Dans cette étude, un dispositif à 3 électrodes a été utilisé pour étudier le biofilm électroactif. Ce dispositif permettait de fixer et de contrôler le potentiel de l'anode. Au terme de ce travail, il est suggéré que la sélection microbienne opérée dans le biofilm soit due à des paramètres opératoires très contrôlés, notamment ce potentiel fixe à l'anode. En électrolyse microbienne, sans électrode de référence, le potentiel anodique peut varier. Il serait donc intéressant de voir si dans une configuration d'électrolyse microbienne, malgré une stabilité moindre du potentiel anodique, une telle sélection est obtenue.
- Dans l'optique du développement d'un électrolyseur microbien, afin de découpler clairement les phénomènes se déroulant à l'anode et à la cathode, il serait judicieux de séparer les deux compartiments par une membrane. Il serait ainsi possible d'établir précisément les rendements faradiques à l'anode et de production d'hydrogène à la cathode. En effet, dans notre dispositif expérimental, une partie de l'hydrogène produit à la cathode pouvait être

oxydée à l'anode et fausser ainsi les calculs de ces rendements, à la hausse pour le premier, à la baisse pour le second.

- La présence de méthane dans le ciel gazeux des réacteurs bioélectrochimiques laisse supposer un développement de méthanogènes consommateurs d'hydrogène et d'acétate. Ces méthanogènes pourraient donc à la fois affecter directement la production d'hydrogène mais aussi être en compétition avec le biofilm électroactif pour la consommation de substrat (acétate). Il serait intéressant de réitérer l'expérience d'ajout d'espèces exogènes sur un biofilm électroactif en continu et non en batch successifs. La conduite de réacteur en continu permettrait un lessivage de ces méthanogènes et éviterait qu'elles s'établissent dans le compartiment anodique du fait de leur faible taux de croissance.
- Enfin, il pourra être envisagé d'intégrer la technologie des MEC dans une filière de production de biohydrogène par fermentation en réacteurs pilotes et ce en configuration en série ou en couplage intégré. Les interactions des microflore spécifiques de chaque procédé pourront être mises en regard avec les performances électroactives du biofilm et de production d'hydrogène des deux procédés. L'évolution au cours du temps de ces communautés microbiennes en fonction des paramètres opératoires (pH, température, temps de séjour) pourra être étudiée. De plus, suite aux résultats apportés par cette thèse, la conduite de fermenteurs en milieu salin pourra être envisagée dans le cadre du couplage afin d'augmenter la conductivité dans la MEC. Le traitement d'effluents salins spécifiques tels que les effluents issus d'industries agroalimentaires (salaisons), de tanneries ou de plateforme de traitement des déchets (lixiviats) pourrait ainsi être couplé à la production d'hydrogène par couplage de fermentation et d'électrolyse microbienne.



---

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---



- APHA, AWWA, WPCF, 1995. Standard methods for the examination of water and wastewater, 19th edition, i. ed. Washington DC.
- Abrevaya, X.C., Sacco, N., Mauas, P.J.D., Cortón, E., 2011. Archaea-based microbial fuel cell operating at high ionic strength conditions. *Extremophiles* 15, 633–642.
- Aceves-Lara, C.A., Latrille, E., Buffiere, P., Bernet, N., Steyer, J.-P., 2008. Experimental determination by principal component analysis of a reaction pathway of biohydrogen production by anaerobic fermentation. *Chemical Engineering and Processing* 47, 1968–1975.
- Adams, M.W.W., Mortenson, L.E., 1984. The Physical and Catalytic Properties of Hydrogenase I1 of *Clostridium pasteurianum*. *The Journal of Biological Chemistry* 259, 7045–7055.
- Aelterman, P., Rabaey, K., Verstraete, W., 2006. Continuous Electricity Generation at High Voltages and Currents Using Stacked Microbial Fuel Cells. *Environmental Science & Technology* 40, 3388–3394.
- Alleau, T., 2007. L'Hydrogène, énergie du futur ?, EDP Sciences
- Alshiyab, H., Kalil, M., Hamid, A., Wan Yusoff, W., 2008. Effect of salts addition on hydrogen production by *C. acetobutylicum*. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 11, 2193–2200.
- Amin, S. a, Green, D.H., Gärdes, A., Romano, A., Trimble, L., Carrano, C.J., 2012. Siderophore-mediated iron uptake in two clades of *Marinobacter* spp. associated with phytoplankton: the role of light. *Biometals* 25, 181–192.
- Arends, J.B. a, Verstraete, W., 2012. 100 Years of Microbial Electricity Production: Three Concepts for the Future. *Microbial Biotechnology* 5, 333–346.
- Argun, H., Kargi, F., Kapdan, I., Oztekin, R., 2008. Batch dark fermentation of powdered wheat starch to hydrogen gas: Effects of the initial substrate and biomass concentrations. *International Journal of Hydrogen Energy* 33, 1813–1819.
- Asghari, I., Mousavi, S.M., Amiri, F., Tavassoli, S., 2013. Bioleaching of spent refinery catalysts: A review. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 19, 1069–1081.
- Association Française de l'hydrogène, n.d. Association Française de l'hydrogène [WWW Document]. URL <http://www.afhypac.org/fr/accueil>
- Atif, a, Fakhurulrazi, A., Ngan, M., Morimoto, M., Iyuke, S., Veziroglu, N., 2005. Fed batch production of hydrogen from palm oil mill effluent using anaerobic microflora. *International Journal of Hydrogen Energy* 30, 1393–1397.
- Badalamenti, J.P., Krajmalnik-brown, R., Torres, C.I., 2013. Generation of high current densities by pure cultures of anode- respiring *Gealkalibacter* spp . under alkaline and saline conditions. *mBio* 4, 1–8.
- Bennetto, H.P., Dew, M.E., Stirling, J.L., 1981. Rates of reduction of phenothiazine “redox” dyes by *E.coli*. *Chemistry and Industry* 776–778.

Biffinger, J.C., Pietron, J., Bretschger, O., Nadeau, L.J., Johnson, G.R., Williams, C.C., Neelson, K.H., Ringeisen, B.R., 2008. Biosensors and Bioelectronics The influence of acidity on microbial fuel cells containing *Shewanella oneidensis*. *Biosensors and Bioelectronics* 24, 900–905.

Bond, D.R., Holmes, D.E., Tender, L.M., Lovley, D.R., 2002. Electrode-reducing microorganisms that harvest energy from marine sediments. *Science* 295, 483–485.

Bond, D.R., Lovley, D.R., 2003. Electricity production by *Geobacter sulfurreducens* attached to electrodes. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 1548–1555.

Bond, D.R., Lovley, D.R., 2005. Evidence for involvement of an electron shuttle in electricity generation by *Geothrix fermentans*. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 2186–2189.

Braun, F., 2012. Impact des communautés microbiennes sur la dynamique de dégradation de micropolluants organiques au sein d'écosystèmes épuratoires et sur l'expression de leur toxicité. Thèse de l'Université de Montpellier 2.

Braun, F., Hamelin, J., Gévaudan, G., Patureau, D., 2011. Development and application of an enzymatic and cell flotation treatment for the recovery of viable microbial cells from environmental matrices such as anaerobic sludge. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 8487–8493.

Brown, S.D., Begemann, M.B., Mormile, M.R., Wall, J.D., Han, C.S., Goodwin, L.A., Pitluck, S., Land, M.L., Hauser, L.J., Elias, D.A., 2011. Complete genome sequence of the haloalkaliphilic, hydrogen-producing bacterium *Halanaerobium hydrogeniformans*. *Journal of Bacteriology* 193, 3682–3683.

Burmølle, M., Webb, J.S., Rao, D., Hansen, L.H., Sørensen, S.J., Kjelleberg, S., 2006. Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents and bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multispecies biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 3916–3923.

Butler, J.E., Young, N.D., Lovley, D.R., 2010. Evolution of electron transfer out of the cell: comparative genomics of six *Geobacter* genomes. *BMC genomics* 11, 1–40.

Caccavo, F., Lonergan, D.J., Lovley, D.R., Davis, M., Stolz, J.F., McInerney, M.J., 1994. *Geobacter sulfurreducens* sp. nov., a hydrogen- and acetate-oxidizing dissimilatory metal-reducing microorganism. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 3752–3759.

Call, D., Logan, B., 2008. Hydrogen production in a single chamber microbial electrolysis cell lacking a membrane. *Environmental Science & Technology* 42, 3401–3406.

Call, D., Wagner, R., Logan, B., 2009. Hydrogen production by *Geobacter* species and a mixed consortium in a microbial electrolysis cell. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 7579–7587.

Carmona-Martinez, A. a, Harnisch, F., Fitzgerald, L. a, Biffinger, J.C., Ringeisen, B.R., Schröder, U., 2011. Cyclic voltammetric analysis of the electron transfer of *Shewanella oneidensis* MR-1 and nanofilament and cytochrome knock-out mutants. *Bioelectrochemistry* 81, 74–80.

Carmona-Martínez, A., Pierra, M., Trably, E., Bernet, N., 2013. Electrochemical and microscopic characterization of the novel anode respiring bacterium *Geoalkalibacter subterraneus* under saline

conditions: insights into its electron transfer mechanism and biofilm formation. *Physical Chemistry Chemical Physics*. DOI: 10.1039/c3cp54045f

Carmona-Martínez, A. a, Harnisch, F., Kuhlicke, U., Neu, T.R., Schröder, U., 2012. Electron transfer and biofilm formation of *Shewanella putrefaciens* as function of anode potential. *Bioelectrochemistry*.

Catal, T., Li, K., Bermek, H., Liu, H., 2008. Electricity production from twelve monosaccharides using microbial fuel cells. *Journal of Power Sources* 175, 196–200.

Chae, K.-J., Choi, M.-J., Lee, J.-W., Kim, K.-Y., Kim, I.S., 2009. Effect of different substrates on the performance, bacterial diversity, and bacterial viability in microbial fuel cells. *Bioresource Technology* 100, 3518–3525.

Chae, K.-J.K., Choi, M.-J.M., Lee, J., Ajayi, F.F.F., Kim, I.I.S., 2008. Biohydrogen production via biocatalyzed electrolysis in acetate-fed bioelectrochemical cells and microbial community analysis. *International Journal of Hydrogen Energy* 33, 5184–5192.

Chaudhuri, S.K., Lovley, D.R., 2003. Electricity generation by direct oxidation of glucose in mediatorless microbial fuel cells. *Nature Biotechnology* 21, 1229–1232.

Chen, S., He, G., Liu, Q., Harnisch, F., Zhou, Y., Chen, Y., Hanif, M., Wang, S., Peng, X., Hou, H., Schröder, U., 2012. Layered corrugated electrode macrostructures boost microbial bioelectrocatalysis. *Energy & Environmental Science* 5, 1–6.

Chen, S., Hou, H., Harnisch, F., Patil, S. a., Carmona-Martinez, A. a., Agarwal, S., Zhang, Y., Sinha-Ray, S., Yarin, A.L., Greiner, A., Schröder, U., 2011. Electrospun and solution blown three-dimensional carbon fiber nonwovens for application as electrodes in microbial fuel cells. *Energy & Environmental Science* 4.

Cheng, C.-H., Hung, C.-H., Lee, K.-S., Liao, P.-Y., Liang, C.-M., Yang, L.-H., Lin, P.-J., Lin, C.-Y., 2008. Microbial community structure of a starch-feeding fermentative hydrogen production reactor operated under different incubation conditions. *International Journal of Hydrogen Energy* 33, 5242–5249.

Cheng, S., Kiely, P., Logan, B.E., 2011. Pre-acclimation of a wastewater inoculum to cellulose in an aqueous-cathode MEC improves power generation in air-cathode MFCs. *Bioresource technology* 102, 367–371.

Chiao, M., Lam, K.B., Lin, L., 2006. Micromachined microbial and photosynthetic fuel cells. *Journal of Micromechanics and Microengineering* 16, 2547–2553.

Choi, Y.-U., Kwon, Y.-K., Ye, B.-R., Hyun, J.-H., Heo, S.-J., Affan, A., Yoon, K.-T., Park, H.-S., Oh, C., Kang, D.-H., 2012. Draft genome sequence of *Marinobacterium stanieri* S30, a strain isolated from a coastal lagoon in Chuuk state in Micronesia. *Journal of Bacteriology* 194, 1260.

Cohen, B., 1931. The bacterial culture as an electrical half-cell. *Journal of Bacteriology* 21, 1–18.

Costerton, J.W., Stewart, P.S., Greenberg, E.P., 1999. Bacterial biofilms : A common cause of persistent infections. *Science* 284, 1318–1322.

Damien, A., 1992. Hydrogène par électrolyse de l'eau. *Techniques de l'ingénieur* 6, 1–9.

Das, D., Veziroglu, T.N., 2001. Hydrogen production by biological processes : a survey of literature. *International Journal of Hydrogen Energy* 26, 13–28.

Dumas, C., Basseguy, R., Bergel, A., 2008a. Electrochemical activity of *Geobacter sulfurreducens* biofilms on stainless steel anodes. *Electrochimica Acta* 53, 5235–5241.

Dumas, C., Basseguy, R., Bergel, A., 2008b. DSA to grow electrochemically active biofilms of *Geobacter sulfurreducens*. *Electrochimica Acta* 53, 3200–3209.

Erable, B., Roncato, M., Achouak, W., Bergel, A., 2009. Sampling Natural Biofilms: A New Route to Build Efficient Microbial Anodes. *Environmental Science & Technology* 43, 3194–3199.

Fang, H., Liu, H., 2002. Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture. *Bioresource Technology* 82, 87–93.

Fang, H., Liu, H., Zhang, T., 2005. Phototrophic hydrogen production from acetate and butyrate in wastewater. *International Journal of Hydrogen Energy* 30, 785–793.

Feijoo, G., Soto, M., Méndez, R., Lema, J.M., 1995. Sodium inhibition in the anaerobic digestion process: Antagonism and adaptation phenomena. *Enzyme and Microbial Technology* 17, 180–188.

Flemming, H.-C., 2002. Biofouling in water systems--cases, causes and countermeasures. *Applied Microbiology and Biotechnology* 59, 629–640.

Fredrickson, J.K., Romine, M.F., Beliaev, A.S., Jennifer, M., Osterman, L., Pinchuk, G., Reed, J.L., Rodionov, D.A., Jorge, L.M., 2008. Towards environmental systems biology of *Shewanella*. *Nature Reviews Microbiology* 6, 592–603.

Freguia, S., Masuda, M., Tsujimura, S., Kano, K., 2009. *Lactococcus lactis* catalyses electricity generation at microbial fuel cell anodes via excretion of a soluble quinone. *Bioelectrochemistry* 76, 14–18.

Freguia, S., Rabaey, K., Yuan, Z., Keller, J., 2007. Electron and carbon balances in microbial fuel cells reveal temporary bacterial storage behavior during electricity generation. *Environmental Science & Technology* 41, 2915–2921.

Freguia, S., Rabaey, K., Yuan, Z., Keller, J., 2008. Syntrophic processes drive the conversion of glucose in microbial fuel cell anodes. *Environmental Science & Technology* 42, 7937–7943.

Freguia, S., Teh, E.H., Boon, N., Leung, K.M., Keller, J., Rabaey, K., 2010. Microbial fuel cells operating on mixed fatty acids. *Bioresource Technology* 101, 1233–1238.

Fromin, N., Hamelin, J., Tarnawski, S., Roesti, D., Forestier, N., Gillet, F., Aragno, M., Rossi, P., 2007. Minireview statistical analysis of denaturing gel electrophoresis ( DGE ) fingerprinting patterns. *Environmental Microbiology* 4, 634–643.

Gavin, R., Merino, S., Altarriba, M., Canals, R., Shaw, J.G., TomÀijs, J.M., 2003. Lateral flagella are required for increased cell adherence, invasion and biofilm formation by *Aeromonas* spp. *FEMS Microbiology Letters* 224, 77–83.

Gebauer, R., 2004. Mesophilic anaerobic treatment of sludge from saline fish farm effluents with biogas production. *Bioresource Technology* 93, 155–167.

Girbal, L., Croux, C., Vasconcelos, I., Soucaille, P., 1995. Regulation of Metabolic Shifts in *Clostridium acetobutylicum* Atcc-824. FEMS Microbiology Reviews 17, 287–297.

Godon, J.-J., Zumstein, E., Dabert, P., Habouzit, F., 1997. Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. Applied and Environmental Microbiology 63, 2802–2813.

Gorby, Y. a, Yanina, S., McLean, J.S., Rosso, K.M., Moyles, D., Dohnalkova, A., Beveridge, T.J., Chang, I.S., Kim, B.H., Kim, K.S., Culley, D.E., Reed, S.B., Romine, M.F., Saffarini, D. a, Hill, E. a, Shi, L., Elias, D. a, Kennedy, D.W., Pinchuk, G., Watanabe, K., Ishii, S., Logan, B., Neals, K.H., Fredrickson, J.K., 2006. Electrically conductive bacterial nanowires produced by *Shewanella oneidensis* strain MR-1 and other microorganisms. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103, 11358–11363.

Greene, A.C., Patel, B.K.C., Yacob, S., 2009. *Geokalibacter subterraneus* sp. nov., an anaerobic Fe(III)- and Mn(IV)-reducing bacterium from a petroleum reservoir, and emended descriptions of the family *Desulfuromonadaceae* and the genus *Geokalibacter*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 59, 781–785.

Guerrero, L., Omil, F., Méndez, R., Lema, J.M., 1997. Treatment of saline wastewaters from fish meal factories in an anaerobic filter under extreme ammonia concentrations. Bioresource Technology 61, 69–78.

Guo, X.M., Trably, E., Latrille, E., Carrère, H., Steyer, J.-P., 2010. Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: A review. International Journal of Hydrogen Energy 35, 10660–10673.

Gómez, X., Fernández, C., Fierro, J., Sánchez, M.E., Escapa, A., Morán, A., 2011. Hydrogen production: two stage processes for waste degradation. Bioresource technology 102, 8621–8627.

Ha, P.T., Tae, B., Chang, I.S., 2008. Performance and bacterial consortium of microbial fuel cell fed with formate. Energy & Fuels 658–662.

Hajjaji, N., Pons, M., Renaudin, V., Houas, A., 2013. Comparative life cycle assessment of eight alternatives for hydrogen production from renewable and fossil feedstock. Journal of Cleaner Production 44, 177–189.

Hallenbeck, P.C., 2009. Fermentative hydrogen production: Principles, progress, and prognosis. International Journal of Hydrogen Energy 34, 7379–7389.

Hallenbeck, P.C., Benemann, J.R., 2002. Biological hydrogen production ; fundamentals and limiting processes. International Journal of Hydrogen Energy 27, 1185–1193.

Hallenbeck, P.C., Ghosh, D., 2009. Advances in fermentative biohydrogen production: the way forward? Trends in Biotechnology 27, 287–297.

Hamelers, H.V.M., Ter Heijne, A., Sleutels, T.H.J. a, Jeremiasse, A.W., Strik, D.P.B.T.B., Buisman, C.J.N., 2010. New applications and performance of bioelectrochemical systems. Applied Microbiology and Biotechnology 85, 1673–1685.

Harnisch, F., Koch, C., Patil, S. a., Hübschmann, T., Müller, S., Schröder, U., 2011. Revealing the electrochemically driven selection in natural community derived microbial biofilms using flow-cytometry. *Energy & Environmental Science* 4, 1265.

Harnisch, F., Rabaey, K., 2012. The diversity of techniques to study electrochemically active biofilms highlights the need for standardization. *ChemSusChem* 5, 1027–1038.

Hawkes, F., Hussy, I., Kyazze, G., Dinsdale, R., Hawkes, D., 2007. Continuous dark fermentative hydrogen production by mesophilic microflora: Principles and progress. *International Journal of Hydrogen Energy* 32, 172–184.

He, G., Gu, Y., He, S., Schröder, U., Chen, S., Hou, H., 2011. Effect of fiber diameter on the behavior of biofilm and anodic performance of fiber electrodes in microbial fuel cells. *Bioresource technology* 102, 10763–10766.

He, Z., Kan, J., Mansfeld, F., Angenent, L.T., Nealson, K.H., 2009. Self-sustained phototrophic microbial fuel cells based on the synergistic cooperation between photosynthetic microorganisms and heterotrophic bacteria. *Environmental science & technology* 43, 1648–1654.

Holmes, D., Nicoll, J., Bond, D., Lovley, D., 2004a. Potential role of a novel psychrotolerant member of the family Geobacteraceae, *Geopsychrobacter electrodiphilus* gen. nov., sp. nov., in electricity production by a marine sediment fuel cell. *Applied Environmental Microbiology* 70, 6023–6030.

Holmes, D.E., Bond, D.R., Lovley, D.R., 2004. Electron transfer by *Desulfobulbus propionicus* to Fe ( III ) and graphite electrodes 70, 1234–1237.

Holmes, D.E., Bond, D.R., O'Neil, R. a, Reimers, C.E., Tender, L.R., Lovley, D.R., 2004. Microbial communities associated with electrodes harvesting electricity from a variety of aquatic sediments. *Microbial Ecology* 48, 178–190.

Holmes, D.E., Finneran, K.T., Neil, R.A.O., Lovley, D.R., 2002. Enrichment of Members of the Family Geobacteraceae Associated with Stimulation of Dissimilatory Metal Reduction in Uranium-Contaminated Aquifer Sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 2300–2306.

Holmes, D.E., Nicoll, J.S., Bond, D.R., Lovley, D.R., 2004b. Potential role of a novel psychrotolerant member of the family Geobacteraceae, *Geopsychrobacter electrodiphilus* gen. nov., sp. nov., in electricity production by a marine sediment fuel cell. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 6023–6030.

Huang, L., Logan, B.E., 2008. Electricity production from xylose in fed-batch and continuous-flow microbial fuel cells. *Applied Microbiology and Biotechnology* 80, 655–664.

Ishii, S., Kosaka, T., Hori, K., Hotta, Y., 2005. Coaggregation facilitates interspecies hydrogen transfer between *Pelotomaculum thermopropionicum* and *Methanothermobacter thermautotrophicus*. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 7838–7845.

Ishii, S., Shimoyama, T., Hotta, Y., Watanabe, K., 2008. Characterization of a filamentous biofilm community established in a cellulose-fed microbial fuel cell. *BMC microbiology* 12, 1–12.

Jang, J.K., Chang, I.S., Hwang, H.Y., Choo, Y.F., Lee, J., Cho, K.S., Kim, B.H., Neelson, K.H., 2010. Electricity generation coupled to oxidation of propionate in a microbial fuel cell. *Biotechnology Letters* 32, 79–85.

Jo, J.H., Lee, D.S., Park, D., Park, J.M., 2008. Biological hydrogen production by immobilized cells of *Clostridium tyrobutyricum* JM1 isolated from a food waste treatment process. *Bioresource Technology* 99, 6666–6672.

Jouenne, T., 2008. Biofilms bactériens. *Techniques de l'ingénieur*.

Jung, S., Regan, J.M., 2007. Comparison of anode bacterial communities and performance in microbial fuel cells with different electron donors. *Applied Microbiology and Biotechnology* 77, 393–402.

Katsikogianni, M., Missirlis, Y.F., 2004. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions. *European Cells & Materials* 8, 37–57.

Ketep, S.F., Bergel, A., Bertrand, M., Achouak, W., Fourest, E., 2013. Lowering the applied potential during successive scratching/re-inoculation improves the performance of microbial anodes for microbial fuel cells. *Bioresource Technology* 127, 448–455.

Kiely, P.D., Call, D.F., Yates, M.D., Regan, J.M., Logan, B.E., 2010. Anodic biofilms in microbial fuel cells harbor low numbers of higher-power-producing bacteria than abundant genera. *Applied Microbiology and Biotechnology* 88, 371–380.

Kiely, P.D., Cusick, R., Call, D.F., Selembo, P. a, Regan, J.M., Logan, B.E., 2011. Anode microbial communities produced by changing from microbial fuel cell to microbial electrolysis cell operation using two different wastewaters. *Bioresource Technology* 102, 388–394.

Kiely, P.D., Rader, G., Regan, J.M., Logan, B.E., 2011. Long-term cathode performance and the microbial communities that develop in microbial fuel cells fed different fermentation endproducts. *Bioresource Technology* 102, 361–336.

Kiely, P.D., Regan, J.M., Logan, B.E., 2011. The electric picnic: synergistic requirements for exoelectrogenic microbial communities. *Current Opinion in Biotechnology* 22, 378–385.

Kim, B.-H., Kim, H.-J., Hyun, M.-S., Park, D.-H., 1999. Direct electrode reaction of Fe(III)-reducing bacterium, *Shewanella putrefaciens*. *Microbiology and Biotechnology* 9, 127–131.

Kim, B.H., Park, H.S., Kim, H.J., Kim, G.T., Chang, I.S., Lee, J., Phung, N.T., 2004. Enrichment of microbial community generating electricity using a fuel-cell-type electrochemical cell. *Applied Microbiology and Biotechnology* 63, 672–681.

Kim, D., Han, S., Kim, S., Shin, H., 2006. Effect of gas sparging on continuous fermentative hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy* 31, 2158–2169.

Kim, G.T., Hyun, M.S., Chang, I.S., Kim, H.J., Park, H.S., Kim, B.H., Kim, S.D., Wimpenny, J.W.T., Weightman, a J., 2005. Dissimilatory Fe(III) reduction by an electrochemically active lactic acid bacterium phylogenetically related to *Enterococcus gallinarum* isolated from submerged soil. *Journal of Applied Microbiology* 99, 978–987.

Kim, H.-J., Hyun, M.-S., Chang, I.-S., Kim, B.-H., 1999. A microbial fuel cell type lactate biosensor using a metal-reducing bacterium, *Shewanella putrefaciens*. *Microbiology and Biotechnology* 9, 365–367.

Kim, J., Min, B., Logan, B., 2005. Evaluation of procedures to acclimate a microbial fuel cell for electricity production. *Applied Microbiology and Biotechnology* 68, 23–30.

Kim, J.R., Jung, S.H., Regan, J.M., Logan, B.E., 2007. Electricity generation and microbial community analysis of alcohol powered microbial fuel cells *Bioresource Technology*, 98, 2568–2577.

Kivisto, A., Santala, V., Karp, M., 2010. Hydrogen production from glycerol using halophilic fermentative bacteria. *Bioresource Technology* 101, 8671–8677.

Kolb, S., Seeliger, S., Springer, N., Ludwig, W., Schink, B., 1998. The fermenting bacterium *Malonomonas rubra* is phylogenetically related to sulfur-reducing bacteria and contains a c-type cytochrome similar to those of sulfur and sulfate reducers. *Systematic and Applied Microbiology* 21, 340–345.

Kumar, N., Ghosh, A., Das, D., 2001. Redirection of biochemical pathways for the enhancement of H<sub>2</sub> production by *Enterobacter cloacae*. *Biotechnology Letters* 23, 537–541.

Lalaurette, E., Thammannagowda, S., Mohagheghi, A., Maness, P., Logan, B., 2009. Hydrogen production from cellulose in a two-stage process combining fermentation and electrohydrogenesis. *International Journal of Hydrogen Energy* 34, 6201–6210.

Latrille, E., Trably, E., Larroche, C., 2011. Production de biohydrogène : voie fermentaire sombre. *Techniques de l'ingénieur*.

Lay, J., Fan, K., Chang, J.-, Ku, C., 2003. Influence of chemical nature of organic wastes on their conversion to hydrogen by heat-shock digested sludge. *International Journal of Hydrogen Energy* 28, 1361–1367.

Lay, J.J., 2000. Modeling and optimization of anaerobic digested sludge converting starch to hydrogen. *Biotechnology and bioengineering* 68, 269–278.

Lee, H., Torres, C., Parameswaran, P., Rittmann, B., 2009. Fate of H<sub>2</sub> in an upflow single-chamber microbial electrolysis cell using a metal-catalyst-free cathode. *Environmental Science & Technology* 43, 7971–7976.

Lee, M., Kim, T., Min, B., Hwang, S., 2012. Sodium (Na<sup>+</sup>) concentration effects on metabolic pathway and estimation of ATP use in dark fermentation hydrogen production through stoichiometric analysis. *Journal of Environmental Management* 108, 22–26.

Lefebvre, O., Moletta, R., 2006. Treatment of organic pollution in industrial saline wastewater: a literature review. *Water research* 40, 3671–3682.

Lefebvre, O., Quentin, S., Torrijos, M., Godon, J.J., Delgenès, J.P., Moletta, R., 2007. Impact of increasing NaCl concentrations on the performance and community composition of two anaerobic reactors. *Applied Microbiology and Biotechnology* 75, 61–69.

- Lefebvre, O., Tan, Z., Kharkwal, S., Ng, H.Y., 2012. Effect of increasing anodic NaCl concentration on microbial fuel cell performance. *Bioresource Technology* 112, 336–340.
- Lefebvre, O., Uzabiaga, A., Chang, I.S., 2010. Microbial fuel cells for energy self-sufficient domestic wastewater treatment — a review and discussion from energetic consideration. *Applied Microbiology and Biotechnology* 89, 259–270.
- Lefebvre, O., Uzabiaga, A., Chang, I.S., Kim, B.-H., Ng, H.Y., 2011. Microbial fuel cells for energy self-sufficient domestic wastewater treatment—a review and discussion from energetic consideration. *Applied Microbiology and Biotechnology* 89, 259–270.
- Lefebvre, O., Vasudevan, N., Torrijos, M., Thanasekaran, K., Moletta, R., 2006. Anaerobic digestion of tannery soak liquor with an aerobic post-treatment. *Water Research* 40, 1492–500.
- Lenin Babu, M., Venkata Subhash, G., Sarma, P.N., Venkata Mohan, S., 2013. Bio-electrolytic conversion of acidogenic effluents to biohydrogen: An integration strategy for higher substrate conversion and product recovery. *Bioresource Technology* 133, 322–331.
- Levin, D., Pitt, L., Love, M., 2004. Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. *International Journal of Hydrogen Energy* 29, 173–185.
- Li, A., Chu, Y., Wang, X., Ren, L., Yu, J., Liu, X., Yan, J., Zhang, L., Wu, S., Li, S., 2013. A pyrosequencing-based metagenomic study of methane-producing microbial community in solid-state biogas reactor. *Biotechnology for Biofuels* 6, 1–17.
- Li, C., Fang, H.H.P., Journals, P.S., 2007. Fermentative Hydrogen Production From Wastewater and Solid Wastes by Mixed Cultures *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 37, 1–39.
- Lin, C., Chang, C., Hung, C., 2008. Fermentative hydrogen production from starch using natural mixed cultures. *International Journal of Hydrogen Energy* 33, 2445–2453.
- Liu, D., Min, B., Angelidaki, I., 2008. Biohydrogen production from household solid waste (HSW) at extreme-thermophilic temperature (70°C) – Influence of pH and acetate concentration. *International Journal of Hydrogen Energy* 33, 6985–6992.
- Liu, H., Cheng, S., Logan, B.E., 2005a. Production of electricity from acetate or butyrate using a single-chamber microbial fuel cell. *Environmental Science & Technology* 39, 658–662.
- Liu, H., Cheng, S., Logan, B.E., 2005b. Power generation in fed-batch microbial fuel cells as a function of ionic strength, temperature, and reactor configuration. *Environmental Science & Technology* 39, 5488–5493.
- Liu, H., Grot, S., Logan, B.E., 2005. Electrochemically assisted microbial production of hydrogen from acetate. *Environmental Science & Technology* 39, 4317–4320.
- Liu, H., Hu, H., Chignell, J., YanZhen, F., Fan, Y., 2010. Microbial electrolysis: novel technology for hydrogen production from biomass. *Biofuels* 1, 129–142.
- Liu, H., Wang, G., 2012. Hydrogen production of a salt tolerant strain *Bacillus* sp. B2 from marine intertidal sludge. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 28, 31–7.

- Liu, W., Huang, S., Zhou, A., Zhou, G., Ren, N., Wang, A., Zhuang, G., 2012. Hydrogen generation in microbial electrolysis cell feeding with fermentation liquid of waste activated sludge. *International Journal of Hydrogen Energy* 37, 13859–13864.
- Liu, W., Wang, A., Sun, D., Ren, N., Zhang, Y., Zhou, J., 2012. Characterization of microbial communities during anode biofilm reformation in a two-chambered microbial electrolysis cell (MEC). *Journal of Biotechnology* 157, 628–632.
- Logan, B., 2009. Exoelectrogenic bacteria that power microbial fuel cells. *Nature Reviews Microbiology* 7, 375–381.
- Logan, B.E., 2010. Scaling up microbial fuel cells and other bioelectrochemical systems. *Applied Microbiology and Biotechnology* 85, 1665–1671.
- Logan, B.E., 2012. Essential data and techniques for conducting microbial fuel cell and other types of bioelectrochemical system experiments. *ChemSusChem* 5, 988–994.
- Logan, B.E., Call, D., Cheng, S., Hamelers, H.V.M.H., Sleutels, T.H.J. a. T., Jeremiasse, A.A.W., Rozendal, R. a. R., 2008. Microbial electrolysis cells for high yield hydrogen gas production from organic matter. *Environmental Science & Technology* 42, 8630–8640.
- Logan, B.E., Regan, J.M., 2006. Electricity-producing bacterial communities in microbial fuel cells. *Trends in Microbiology* 14, 512–518.
- Lovley, D., 2006a. Bug juice: harvesting electricity with microorganisms. *Nature Reviews Microbiology* 4, 497–508.
- Lovley, D., 2008. The microbe electric: conversion of organic matter to electricity. *Current Opinion in Biotechnology* 19, 564–571.
- Lovley, D.D.R., 2006b. Bug juice: harvesting electricity with microorganisms. *Nature Reviews Microbiology* 4, 497–508.
- Lovley, D.R., 1993. Dissimilatory metal reduction. *Annual Review of Microbiology* 47, 263–290.
- Lovley, D.R., 2011. Live wires: direct extracellular electron exchange for bioenergy and the bioremediation of energy-related contamination. *Energy & Environmental Science* 4, 4896.
- Lovley, D.R., 2012. Electromicrobiology. *Annual Review of Microbiology* 66, 391–409.
- Lovley, D.R., Phillips, E.J., 1986. Organic matter mineralization with reduction of ferric iron in anaerobic sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 51, 683–689.
- Lower, B.H., Hochella, M.F., Lower, S.K., 2005. Putative mineral-specific proteins synthesized by metal reducing bacterium. *American Journal of Science* 305, 687–710.
- Lu, L., Ren, N., Xing, D., Logan, B., 2009. Hydrogen production with effluent from an ethanol-H<sub>2</sub>-coproducing fermentation reactor using a single-chamber microbial electrolysis cell. *Biosensors and Bioelectronics* 24, 3055–3060.

- Lu, L., Xing, D., Ren, N., 2012. Pyrosequencing reveals highly diverse microbial communities in microbial electrolysis cells involved in enhanced H<sub>2</sub> production from waste activated sludge. *Water research* 46, 2425–34.
- Malki, M., Gonza, E., Go, F., Amils, R., 2006. The isolation and study of acidophilic microorganisms. *Methods in Microbiology* 35, 35020–35023.
- Mariani, C., Oulahal, N., Chamba, J.-F., Dubois-Brissonnet, F., Notz, E., Briandet, R., 2011. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by resident biofilms present on wooden shelves used for cheese ripening. *Food Control* 22, 1357–1362.
- Marshall, C., May, H., 2009. Electrochemical evidence of direct electrode reduction by a thermophilic Gram-positive bacterium, *Thermincola ferriacetica*. *Energy & Environmental Science* 2, 699–705.
- Marsili, E., Rollefson, J.B., Baron, D.B., Hozalski, R.M., Bond, D.R., 2008. Microbial biofilm voltammetry: direct electrochemical characterization of catalytic electrode-attached biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 7329–7337.
- Marsili, E., Sun, J., Bond, D.R., 2010. Voltammetry and growth physiology of *Geobacter sulfurreducens* biofilms as a function of growth stage and imposed electrode potential. *Electroanalysis* 22, 865–874.
- Maukonen, J., Mättö, J., Wirtanen, G., Raaska, L., Mattila-Sandholm, T., Saarela, M., 2003. Methodologies for the characterization of microbes in industrial environments: a review. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 30, 327–356.
- Miceli, J.F., Parameswaran, P., Kang, D.-W., Krajmalnik-Brown, R., Torres, C.I., 2012. Enrichment and analysis of anode-respiring bacteria from diverse anaerobic inocula. *Environmental Science & Technology* 46, 10349–10355.
- Michelland, R.J., Dejean, S., Combes, S., Fortun-Lamothe, L., Cauquil, L., 2009. StatFingerprints: a friendly graphical interface program for processing and analysis of microbial fingerprint profiles. *Molecular Ecology Resources* 9, 1359–1363.
- Millet, P., 2008. Le réacteur électrochimique. *Techniques de l'ingénieur*.
- Milliken, C., May, H., 2007. Sustained generation of electricity by the spore-forming, Gram-positive, *Desulfitobacterium hafniense* strain DCB2. *Applied Microbial and Cell Physiology* 73, 1180–1189.
- Min, B., Logan, B.E., 2004. Continuous electricity generation from domestic wastewater and organic substrates in a flat plate microbial fuel cell. *Environmental Science & Technology* 38, 5809–5814.
- Monlau, F., Barakat, A., Steyer, J.P., Carrere, H., 2012. Comparison of seven types of thermochemical pretreatment on the structural features and anaerobic digestion of sunflower stalks. *Bioresource Technology* 120, 241–247.
- Monlau, F., Barakat, A., Trably, E., Dumas, C., Steyer, J.-P., Carrère, H., 2013. Lignocellulosic materials into biohydrogen and biomethane: impact of structural features and pretreatment. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 43, 260–322.

Mosquera-Corral, A., Sanchez, M., 2001. Simultaneous methanogenesis and denitrification of pretreated effluents from a fish canning industry. *Water Research* 35, 411–418.

Nealson, K.H., Saffarini, D., 1994. Iron and manganese in anaerobic respiration: environmental significance physiology and regulation. *Annual Review of Microbiology* 48, 311–343.

Nercessian, O., Parot, S., Délia, M.-L., Bergel, A., Achouak, W., 2012. Harvesting Electricity with *Geobacter bremensis* isolated from compost. *PLoS One* 7.

Nevin, K., Kim, B., Glaven, R., Johnson, J., Woodard, T., Methe, B., DiDonato, R., Covalla, S., Franks, A., Liu, A., Lovley, D., 2009. Anode biofilm transcriptomics reveals outer surface components essential for high density current production in *Geobacter sulfurreducens*. *Fuel Cells. PloS one* 4.

Nevin, K.P., Richter, H., Covalla, S.F., Johnson, J.P., Woodard, T.L., Orloff, a L., Jia, H., Zhang, M., Lovley, D.R., 2008. Power output and columbic efficiencies from biofilms of *Geobacter sulfurreducens* comparable to mixed community microbial fuel cells. *Environmental Microbiology* 10, 2505–2514.

Niessen, J., Schroder, U., Scholz, F., 2004. Exploiting complex carbohydrates for microbial electricity generation ? A bacterial fuel cell operating on starch. *Electrochemistry Communications* 6, 955–958.

Noike, T., Takabatake, H., Mizuno, O., Ohba, M., 2002. Inhibition of hydrogen fermentation of organic wastes by lactic acid bacteria. *International Journal of Hydrogen Energy* 27, 1367–1371.

Ntaikou, I., Antonopoulou, G., Lyberatos, G., 2010. Biohydrogen production from biomass and wastes via dark fermentation: A Review. *Waste and Biomass Valorization* 1, 21–39.

Oh, Y.-K., Park, M.S., Seol, E.-H., Lee, S.-J., Park, S., 2003. Isolation of hydrogen-producing bacteria from granular sludge of an upflow anaerobic sludge blanket reactor. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 8, 54–57.

Ohkawara, T., Hirose, J.U.N., Hayashi, S.A.T., 1995. of Hydrogen production by aciduric *Enterobacter aerogenes* Strain HO-39. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 80, 571–574.

Oksanen, J., Blanchet, F.G., Kindt, R., Legendre, P., O'Hara, R.B., Simpson, G.L., Solymos, P., Stevens, M.H.H., Wagner, H., 2010. Vegan : community ecology package.

Oren, A., 2001. The bioenergetic basis for the decrease in metabolic diversity at increasing salt concentrations: implications for the functioning of salt lake ecosystems. *Hydrobiologia* 466, 61–72.

O'Toole, G. a, Kolter, R., 1998. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular microbiology* 30, 295–304.

Pant, D., Singh, A., Van Bogaert, G., Irving Olsen, S., Singh Nigam, P., Diels, L., Vanbroekhoven, K., 2012. Bioelectrochemical systems (BES) for sustainable energy production and product recovery from organic wastes and industrial wastewaters. *RSC Advances* 2, 1248–1263.

Parameswaran, P., Bry, T., Popat, S., Lusk, B.G., Rittmann, B.E., Torres, C.I., 2013. Kinetic, electrochemical, and microscopic characterization of the thermophilic, anode-respiring bacterium *Thermincola ferriacetica*. *Environmental Science & Technology*.

Parameswaran, P., Torres, C.I., Lee, H.-S., Krajmalnik-Brown, R., Rittmann, B.E., 2009. Syntrophic interactions among anode respiring bacteria (ARB) and non-ARB in a biofilm anode: Electron balances. *Biotechnology and Bioengineering* 103, 513–523.

Parameswaran, P., Zhang, H., Torres, C.I., Rittmann, B.E., Krajmalnik-Brown, R., 2010. Microbial community structure in a biofilm anode fed with a fermentable substrate: the significance of hydrogen scavengers. *Biotechnology and Bioengineering* 105, 69–78.

Park, H.S., Kim, B.H., Kim, H.S., Kim, H.J., Kim, G.T., Kim, M., Chang, I.S., Park, Y.K., Chang, H.I., 2001. A novel electrochemically active and Fe(III)-reducing bacterium phylogenetically related to *Clostridium butyricum* isolated from a microbial fuel cell. *Anaerobe* 7, 297–306.

Patil, S. a., Hägerhäll, C., Gorton, L., 2012. Electron transfer mechanisms between microorganisms and electrodes in bioelectrochemical systems. *Bioanalytical Reviews* 4, 159–192.

Patil, S. a, Harnisch, F., Koch, C., Hübschmann, T., Fetzer, I., Carmona-Martínez, A. a, Müller, S., Schröder, U., 2011. Electroactive mixed culture derived biofilms in microbial bioelectrochemical systems: the role of pH on biofilm formation, performance and composition. *Bioresource Technology* 102, 9683–9690.

Pfennig, N., Biebl, H., 1976. *Desulfuromonas acetoxidans* gen. nov. and sp. nov., a new anaerobic, sulfur-reducing, acetate-oxidizing bacterium. *Archives of Microbiology* 110, 3–12.

Pham, C.A.C., Jung, S.J.S., Phung, N.T.N., Lee, J., Chang, I.S.I., Kim, B.B.H., Yi, H., Chun, J., 2003. A novel electrochemically active and Fe(III)-reducing bacterium phylogenetically related to *Aeromonas hydrophila*, isolated from a microbial fuel cell. *FEMS Microbiology Letters* 223, 129–134.

Pierra, M., Trably, E., Bonnafous, A., Godon, J.-J., Bernet, N., 2012. High selection and identification of electricigen bacteria from graphite anode biofilm under a controlled potential: *Geokalkibacter subterraneus* as a new electricigen., in: *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*. p. 77.

Pierra, M., Trably, E., Godon, J.-J., Bernet, N., 2013. Fermentative hydrogen production under moderate halophilic conditions. *International Journal of Hydrogen Energy*. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2013.08.035

Puig, S., Serra, M., Coma, M., Cabré, M., Balaguer, M.D., Colprim, J., 2010. Effect of pH on nutrient dynamics and electricity production using microbial fuel cells. *Bioresource Technology* 101, 9594–9599.

Qu, Y., Feng, Y., Wang, X., Logan, B.E., 2012. Using a co-culture to enable current production by *Geobacter sulfurreducens*. *Applied and Environmental Microbiology* 78, 3484–3487.

Quéméneur, M., Hamelin, J., Barakat, A., Steyer, J.-P., Carrère, H., Trably, E., 2012. Inhibition of fermentative hydrogen production by lignocellulose-derived compounds in mixed cultures. *International Journal of Hydrogen Energy* 37, 3150–3159.

Quéméneur, M., Hamelin, J., Benomar, S., Guidici-Ortoni, M.-T., Latrille, E., Steyer, J.-P., Trably, E., 2011. Changes in hydrogenase genetic diversity and proteomic patterns in mixed-

culture dark fermentation of mono-, di- and tri-saccharides. *International Journal of Hydrogen Energy* 36, 11654–11665.

Quéméneur, M., Hamelin, J., Latrille, E., Steyer, J.-P., Trably, E., 2010. Development and application of a functional CE-SSCP fingerprinting method based on [Fe–Fe]-hydrogenase genes for monitoring hydrogen-producing *Clostridium* in mixed cultures. *International Journal of Hydrogen Energy* 35, 13158–13167.

Quéméneur, M., Hamelin, J., Latrille, E., Steyer, J.-P., Trably, E., Benomar, S., Giudici-Ortoni, M.-T., 2011. Functional versus phylogenetic fingerprint analyses for monitoring hydrogen-producing bacterial populations in dark fermentation cultures. *International Journal of Hydrogen Energy* 36, 3870–3879.

R. Development Core Team, 2010. R: a language and environment for statistical computing.

Rabaey, K., Angenent, L.T., Schroder, U., Keller, J., 2010. Electrochemical techniques for the analysis of bioelectrochemical systems, in: *Bioelectrochemical Systems: From Extracellular Electron Transfer to Biotechnological Application*. pp. 135–184.

Rabaey, K., Boon, N., Siciliano, S., Verhaege, M., Verstraete, W., 2004. Biofuel cells select for microbial consortia that self-mediate electron transfer. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 5373–5382.

Rabaey, K., Verstraete, W., 2005. Microbial fuel cells: novel biotechnology for energy generation. *Trends in Biotechnology* 23, 291–298.

Rafrafi, Y., 2010. Impact des facteurs biotiques sur le réseau métabolique des écosystèmes producteurs d'hydrogène par voie fermentaire en culture mixte. Thèse de l'Université de Montpellier 2.

Rafrafi, Y., Trably, E., Hamelin, J., Latrille, E., Meynial-Salles, I., Benomar, S., Giudici-Ortoni, M.-T., Steyer, J.-P., 2013. Sub-dominant bacteria as keystone species in microbial communities producing bio-hydrogen. *International Journal of Hydrogen Energy* 38, 4975–4985.

Raghavulu, S.V., Sarma, P.N., Mohan, S.V., 2011. Comparative bioelectrochemical analysis of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* with anaerobic consortia as anodic biocatalyst for biofuel cell application. *Journal of Applied Microbiology* 110, 666–674.

Reguera, G., McCarthy, K.D., Mehta, T., Nicoll, J.S., Tuominen, M.T., Lovley, D.R., 2005. Extracellular electron transfer via microbial nanowires. *Nature* 435, 1098–1101.

Reguera, G., Nevin, K.P., Nicoll, J.S., Covalla, S.F., Woodard, T.L., Lovley, D.R., 2006. Biofilm and nanowire production leads to increased current in *Geobacter sulfurreducens* fuel cells. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 7345–7348.

Rezaei, F., Xing, D., Wagner, R., Regan, J.M., Richard, T.L., Logan, B.E., 2009. Simultaneous cellulose degradation and electricity production by *Enterobacter cloacae* in a microbial fuel cell. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 3673–3678.

Richter, H., Lanthier, M., Nevin, K.P., Lovley, D.R., 2007. Lack of electricity production by *Pelobacter carbinolicus* indicates that the capacity for Fe(III) oxide reduction does not necessarily

confer electron transfer ability to fuel cell anodes. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 5347–5353.

Rittmann, B.E., 2008. Opportunities for renewable bioenergy using microorganisms. *Biotechnology and Bioengineering* 100, 203–212.

Roden, E.E., Lovley, D.R., 1993. Dissimilatory Fe(III) reduction by the marine microorganism *Desulfuromonas acetoxidans*. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 734–742.

Rodríguez, J., Kleerebezem, R., Lema, J.M., van Loosdrecht, M.C.M., 2006. Modeling product formation in anaerobic mixed culture fermentations. *Biotechnology and Bioengineering* 93, 592–606.

Roling, W., Prasetyo, A., Stouthamer, A., Van Verseveld, 1999. Note: Physiological aspects of the growth of the lactic acid bacterium *Tetragenococcus halophila* during Indonesian soy sauce (kecap) production. *Journal of Applied Microbiology* 06, 348–352.

Rosenbaum, M., He, Z., Angenent, L.T., 2010. Light energy to bioelectricity: photosynthetic microbial fuel cells. *Current Opinion in Biotechnology* 21, 259–264.

Rousseau, R., Dominguez-Benetton, X., Délia, M.-L., Bergel, A., 2013. Microbial bioanodes with high salinity tolerance for microbial fuel cells and microbial electrolysis cells. *Electrochemistry Communications* 33, 1–4.

Rozendal, R., Hamelers, H.V.M.H., Molenkmp, R., Buisman, J.N., Rozendal, A., Molenkamp, R.J., 2007. Performance of single chamber biocatalyzed electrolysis with different types of ion exchange membranes. *Water Research* 41, 1984–1994.

Rozendal, R., Jeremiasse, A., Hamelers, H., Buisman, C., 2008. Hydrogen production with a microbial biocathode. *Environmental Science & Technology* 42, 629–634.

Rozendal, R.R.A., Hamelers, H.V.M.H., Euverink, G.J.W.G., Metz, S.S.J., Buisman, C.J.N.C., 2006. Principle and perspectives of hydrogen production through biocatalyzed electrolysis. *International Journal of Hydrogen Energy* 31, 1632–1640.

Saratale, G.D., Chen, S., Lo, Y., Saratale, R.G., Chang, J., 2008. Outlook of biohydrogen production from lignocellulosic feedstock using dark fermentation – a review 67, 962–979.

Schröder, U., Nießen, J., Scholz, F., Niessen, J., 2003. A generation of microbial fuel cells with current outputs boosted by more than one order of magnitude. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 42, 2880–2883.

Selemba, P. a. P., Perez, J.J.M., Lloyd, W. a., Logan, B.B.E., 2009. High hydrogen production from glycerol or glucose by electrohydrogenesis using microbial electrolysis cells. *International Journal of Hydrogen Energy*. 34, 5373–5381.

Sen, B., Hamelin, J., Bru-Adan, V., Godon, J.-J., Chandra, T.S., 2008. Structural divergence of bacterial communities from functionally similar laboratory-scale vermicomposts assessed by PCR-CE-SSCP. *Journal of Applied Microbiology* 105, 2123–2132.

Shukla, A.K., Suresh, P., Berchmans, S., Rajendran, A., 2004. Biological fuel cells and their applications. *Current Science* 87, 455–468.

Simankova, M., Chernych, N., Osipov, G., Zavarzin, G., 1993. *Halocella cellulolytica* gen. nov., sp. nov., a New Obligately Anaerobic, Halophilic, Cellulolytic bacterium. *Systematic and Applied Microbiology* 16, 385–389.

Simpson, E.H., 1949. Measurement of diversity. *Nature* 163, 688.

Sleutels, T.H.J. a, Darus, L., Hamelers, H.V.M., Buisman, C.J.N., 2011. Effect of operational parameters on Coulombic efficiency in bioelectrochemical systems. *Bioresource Technology* 102, 11172–11176.

Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G., Costerton, J.W., 2002. Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Review of Microbiology* 56, 187–209.

Temudo, M.F., Muyzer, G., Kleerebezem, R., van Loosdrecht, M.C.M., 2008. Diversity of microbial communities in open mixed culture fermentations: impact of the pH and carbon source. *Applied Microbiology and Biotechnology* 80, 1121–1130.

Tender, L.M., Reimers, C.E., Stecher, H. a, Holmes, D.E., Bond, D.R., Lowy, D. a, Pilobello, K., Fertig, S.J., Lovley, D.R., 2002. Harnessing microbially generated power on the seafloor. *Nature Biotechnology* 20, 821–825.

Tommasi, T., Ruggeri, B., Sanfilippo, S., 2012. Energy valorisation of residues of dark anaerobic production of Hydrogen. *Journal of Cleaner Production* 34, 91–97.

Torres, C.I., Krajmalnik-Brown, R., Parameswaran, P., Marcus, A.K., Wanger, G., Gorby, Y. a, Rittmann, B.E., 2009. Selecting anode-respiring bacteria based on anode potential: phylogenetic, electrochemical, and microscopic characterization. *Environmental Science & Technology* 43, 9519–9524.

Torres, C.I., Marcus, A.K., Rittmann, B.E., 2007. Kinetics of consumption of fermentation products by anode-respiring bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* 77, 689–697.

Tuna, E., Kargi, F., Argun, H., 2009. Hydrogen gas production by electrohydrolysis of volatile fatty acid (VFA) containing dark fermentation effluent. *International Journal of Hydrogen Energy* 34, 262–269.

Turcot, J., Bisailon, A., Hallenbeck, P., 2008. Hydrogen production by continuous cultures of *Escherchia coli* under different nutrient regimes. *International Journal of Hydrogen Energy* 33, 1465–1470.

Valdez-vazquez, I., Poggi-varaldo, M., 2009. Hydrogen production by fermentative consortia. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 13, 1000–1013.

Vallero, M.V.G., Hulshoff Pol, L.W., Lettinga, G., Lens, P.N.L., 2003. Effect of NaCl on thermophilic (55 degrees C) methanol degradation in sulfate reducing granular sludge reactors. *Water Research* 37, 2269–2280.

Van Niel, E.W.J., Claassen, P. a M., Stams, A.J.M., 2003. Substrate and product inhibition of hydrogen production by the extreme thermophile, *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. *Biotechnology and Bioengineering* 81, 255–262.

- Vandieken, V., Mussmann, M., Niemann, H., Jørgensen, B.B., 2006. *Desulfuromonas svalbardensis* sp. nov. and *Desulfuromusa ferrireducens* sp. nov., psychrophilic, Fe(III)-reducing bacteria isolated from Arctic sediments, Svalbard. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56, 1133–9.
- Venkata Mohan, S., Prathima Devi, M., 2012. Fatty acid rich effluent from acidogenic biohydrogen reactor as substrate for lipid accumulation in heterotrophic microalgae with simultaneous treatment., *Bioresource Technology*, 123, 627-635
- Wang, A., Sun, D., Cao, G., Wang, H., Ren, N., Wu, W.-M., Logan, B.E., 2011. Integrated hydrogen production process from cellulose by combining dark fermentation, microbial fuel cells, and a microbial electrolysis cell. *Bioresource Technology* 102, 4137–43.
- Wang, A., Sun, D., Ren, N., Liu, C., Liu, W., Logan, B.E., Wu, W.-M., 2010. A rapid selection strategy for an anodophilic consortium for microbial fuel cells. *Bioresource Technology* 101, 5733–5735.
- Wang, J., Wan, W., 2009a. Factors influencing fermentative hydrogen production: A review. *International Journal of Hydrogen Energy* 34, 799–811.
- Wang, J., Wan, W., 2009b. Experimental design methods for fermentative hydrogen production: A review. *International Journal of Hydrogen Energy* 34, 235–244.
- Wang, J., Wan, W., 2009c. Kinetic models for fermentative hydrogen production: A review. *International Journal of Hydrogen Energy* 34, 3313–3323.
- Wang, X., Feng, Y., Wang, H., Qu, Y., Yu, Y., Ren, N., Li, N., Wang, E., Lee, H., Logan, B.E., 2009. Bioaugmentation for electricity generation from corn stover biomass using microbial fuel cells. *Environmental Science & Technology* 43, 6088–93.
- Weber, K. a, Achenbach, L. a, Coates, J.D., 2006. Microorganisms pumping iron: anaerobic microbial iron oxidation and reduction. *Nature Reviews Microbiology* 4, 752–64.
- Wei, J., Liang, P., Cao, X., Huang, X., 2010. A new insight into potential regulation on growth and power generation of *Geobacter sulfurreducens* in microbial fuel cells based on energy viewpoint. *Environmental Science & Technology* 44, 3187–91.
- White, H.K., Reimers, C.E., Cordes, E.E., Dilly, G.F., Girguis, P.R., 2009. Quantitative population dynamics of microbial communities in plankton-fed microbial fuel cells. *The ISME journal* 3, 635–46.
- Wéry, N., Bru-Adan, V., Minervini, C., Delgènes, J.-P., Garrelly, L., Godon, J.-J., 2008. Dynamics of *Legionella* spp. and bacterial populations during the proliferation of *L. pneumophila* in a cooling tower facility. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 3030–3037.
- Xia, X., Cao, X., Liang, P., Huang, X., Yang, S., Zhao, G., 2010. Electricity generation from glucose by a *Klebsiella* sp. in microbial fuel cells. *Applied Microbiology and Biotechnology* 87, 383–90.
- Xiao, Y., Roberts, D.J., 2010. A review of anaerobic treatment of saline wastewater. *Environmental Technology* 31, 1025–1043.

Xing, D., Cheng, S., Logan, B.E., Regan, J.M., 2010. Isolation of the exoelectrogenic denitrifying bacterium *Comamonas denitrificans* based on dilution to extinction. *Applied Microbiology and Biotechnology* 85, 1575–87.

Xing, D., Cheng, S., Regan, J.M., Logan, B.E., 2009. Change in microbial communities in acetate- and glucose-fed microbial fuel cells in the presence of light. *Biosensors & Bioelectronics* 25, 105–111.

Xing, D., Zuo, Y., Cheng, S.S., Regan, J.J.M., Logan, B., 2008. Electricity generation by *Rhodospseudomonas palustris* DX-1. *Environmental Science & Technology* 42, 4146–4151.

Yang, Y., Xu, M., Guo, J., Sun, G., 2012. Bacterial extracellular electron transfer in bioelectrochemical systems. *Process Biochemistry* 47, 1707–1714.

Yoon, J.-H., 2003. *Psychrobacter jeotgali* sp. nov., isolated from jeotgal, a traditional Korean fermented seafood. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53, 449–454.

Yoon, J.-H., Lee, C.-H., Kang, S.-J., Oh, T.-K., 2005. *Psychrobacter celer* sp. nov., isolated from sea water of the South Sea in Korea. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 55, 1885–1890.

Yoon, J.-H., Lee, C.-H., Yeo, S.-H., Oh, T.-K., 2005. *Psychrobacter aquimaris* sp. nov. and *Psychrobacter namhaensis* sp. nov., isolated from sea water of the South Sea in Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55, 1007–1013.

Yuan, W., Ágoston, R., Lee, D., Lee, S.-C., Yuk, H.-G., 2012. Influence of lactate and acetate salt adaptation on *Salmonella Typhimurium* acid and heat resistance. *Food microbiology* 30, 448–452.

Yuan, Y., Zhao, B., Zhou, S., Zhong, S., Zhuang, L., 2011. Electrocatalytic activity of anodic biofilm responses to pH changes in microbial fuel cells. *Bioresource Technology* 102, 6887–6891.

Zhang, C., Lv, F.-X., Xing, X.-H., 2011. Bioengineering of the *Enterobacter aerogenes* strain for biohydrogen production. *Bioresource Technology* 102, 8344–8349.

Zhang, L., Zhou, S., Zhuang, L., Li, W., Zhang, J., Lu, N., Deng, L., 2008. Microbial fuel cell based on *Klebsiella pneumoniae* biofilm. *Electrochemistry Communications* 10, 1641–1643.

Zhang, T., Cui, C., Chen, S., Ai, X., Yang, H., Shen, P., Peng, Z., 2006. A novel mediatorless microbial fuel cell based on direct biocatalysis of *Escherichia coli*. *Chemical Communications* 2257–2259.

Zhao, Y., Watanabe, K., Nakamura, R., Mori, S., Liu, H., Ishii, K., Hashimoto, K., 2010. Three-dimensional conductive nanowire networks for maximizing anode performance in microbial fuel cells. *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* 16, 4982–4985.

Zheng, X.J., Zheng, Y.M., Yu, H.Q., 2005. Influence of NaCl on hydrogen production from glucose by anaerobic cultures. *Environmental Technology* 26, 1073–1080.

Zobell, C.E., 1943. The effect of solid surfaces upon bacterial activity. *Journal of Bacteriology* 39–56.

Zuo, Y., Maness, P., Logan, B.E., 2006. Electricity production from steam-exploded corn stover biomass. *Energy & Fuels* 20, 1716–1721.

Zuo, Y., Xing, D., Regan, J., Logan, B., 2008. Isolation of the exoelectrogenic bacterium *Ochrobactrum anthropi* YZ-1 by using a U-tube microbial fuel cell. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 3130–3137.



---

## ANNEXES

---

## ANNEXE 1

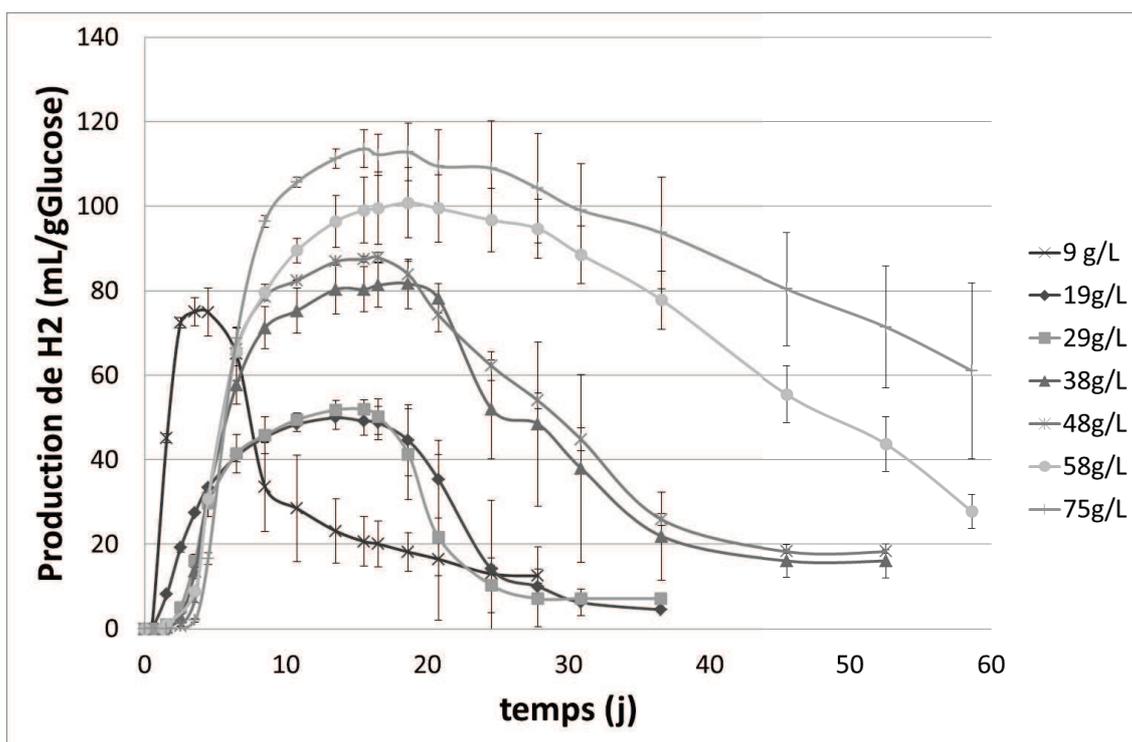


Figure Annexe-7 : Production d'hydrogène en  $\text{mL}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{Glucose}}$  en fonction du temps dans les essais à pH 8 pour les différentes salinités testées

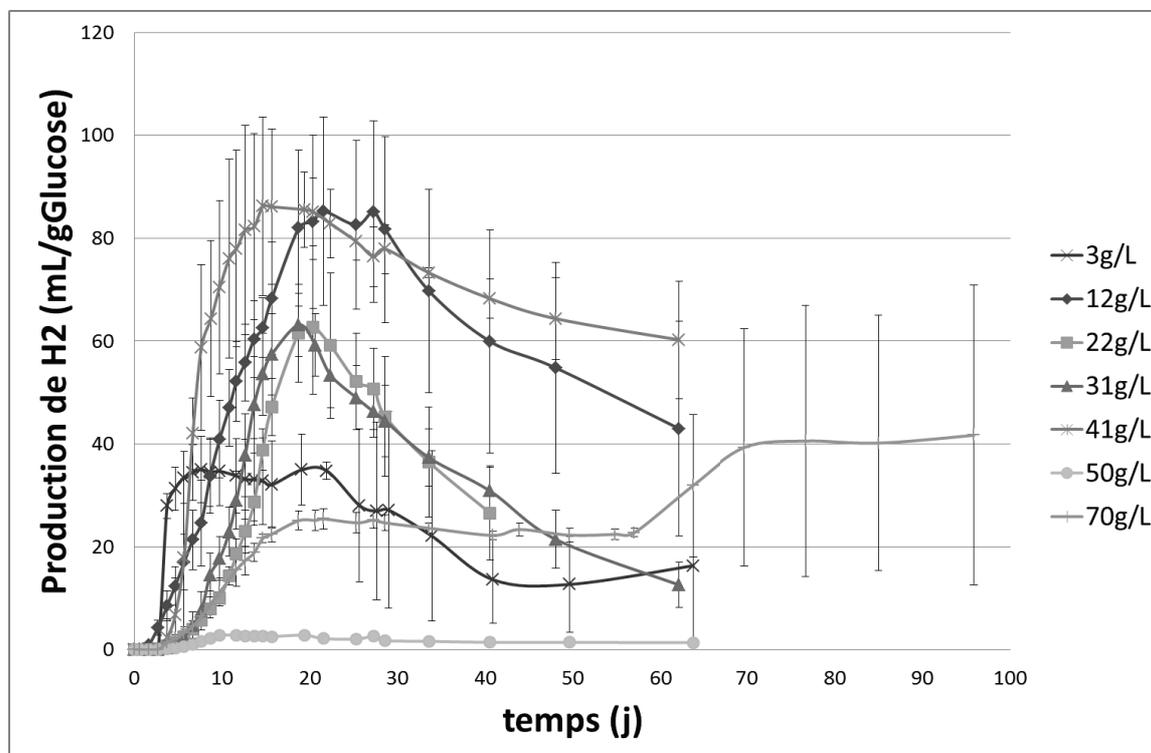


Figure Annexe-8 : Production d'hydrogène en  $\text{mL}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{Glucose}}$  en fonction du temps dans les essais à pH 6 pour les différentes salinités testées.

## ANNEXE 2

---

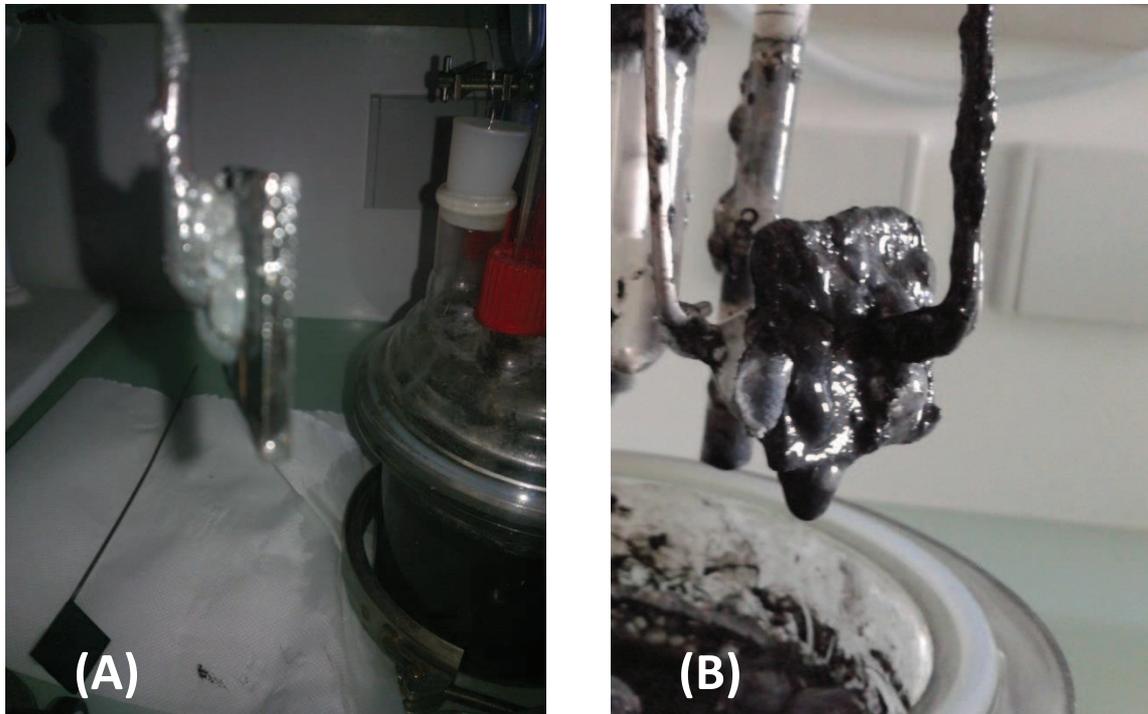


Figure Annexe-9 : Images des biofilms électroactifs lors de l'expérience réalisée sur la contamination d'espèces exogènes sur le biofilm.

(A) Biofilm RB8-1 prélevé en fin de premier cycle, juste avant l'ajout d'espèces exogènes dans le réacteur RB8, (B) Biofilm RB6-4 prélevé en fin de troisième cycle, après l'ajout d'espèces exogènes dans le réacteur RB6. Les trois réacteurs RB6, RB7 et RB8 ont présenté une augmentation de l'épaisseur du biofilm. Le réacteur contrôle RBC n'ayant pas reçu d'espèces exogènes, quant à lui, a présenté une épaisseur constante du biofilm au cours des 3 cycles batch. La formation de bulles de gaz en surface de RB6-4 (B) correspondrait à la production de méthane détectée dans le ciel gazeux.

---

**COUPLAGE DE LA FERMENTATION SOMBRE ET DE L'ELECTROLYSE  
MICROBIENNE POUR LA PRODUCTION D'HYDROGENE : FORMATION ET  
MAINTENANCE DU BIOFILM ELECTRO-ACTIF.**

---

Le rendement de production de biohydrogène par voie fermentaire est limité par la production concomitante d'acides organiques. Ces sous-produits constituent de bons substrats pour des biofilms électroactifs en vue d'une conversion complète de la matière organique en CO<sub>2</sub> et en H<sub>2</sub> dans un électrolyseur microbien. L'objectif de cette thèse est d'analyser, dans le cadre du couplage de ces deux procédés et pour chacun d'eux, les liens entre la structure des communautés microbiennes et les fonctions macroscopiques qui leur sont associées. L'originalité de cette étude a été de travailler en milieu salin, favorable au transport de charges en électrolyse microbienne mais peu étudié en fermentation. Les résultats montrent une forte sélection des micro-organismes dans les deux procédés, dont certains peu caractérisés jusqu'alors, associés à de bonnes performances de production d'hydrogène. Une méthode d'enrichissement en bactéries électroactives est également proposée. Enfin, en situation de couplage, l'introduction de biomasse issue de la fermentation pourrait entraîner une baisse de l'activité du biofilm.

---

**MOTS CLEF :**

Biohydrogène, fermentation, électrolyse microbienne, biofilms électroactifs, bio-électrochimie, cultures mixtes, empreinte moléculaire, CE-SSCP

---

**COUPLING DARK FERMENTATION AND MICROBIAL ELECTROLYSIS FOR  
HYDROGEN PRODUCTION : PROCESS AND MECANISMS OCCURING DURING  
FORMATION AND CONSERVATION OF ELECTROACTIVE BIOFILM.**

---

Biohydrogen production from dark fermentation is limited because of the associated production of organic acids. These by-products can be used as substrates in a microbial electrolysis cell (MEC), since electroactive biofilms can completely convert organic matter into hydrogen and carbon dioxide. This work aims at analyzing, in the context of the coupling of those two processes and for each one, the relationship between microbial community structures and the associated macroscopic functions. The originality of this study is to work in saline conditions (30-35 g<sub>NaCl</sub>/L), which favors the charges transfer in the MEC electrolyte but is poorly studied in dark fermentation. Results showed a high selection of microorganisms in both processes associated to good hydrogen production performances. Some of whom are poorly characterized until now. An iron-enrichment method to enrich electroactive bacteria is also proposed. Finally in coupling situation, the introduction of biomass originated from dark fermentation could result to a decrease of biofilm activity.

---

**KEY WORDS:**

Biohydrogen, dark fermentation, microbial electrolysis, electroactive biofilms, bio-electrochemistry, mixed cultures, fingerprinting, CE-SSCP

---

**DISCIPLINE : Biotechnologie, microbiologie**

---

---

**INRA, UR050, Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement, Avenue des Etangs, 11100 Narbonne**

---