



HAL
open science

Développement et étude des bio-cathodes dénitrifiantes dans le contexte de la dépollution des zones humides

Timothé Philippon

► **To cite this version:**

Timothé Philippon. Développement et étude des bio-cathodes dénitrifiantes dans le contexte de la dépollution des zones humides. Chimie-Physique [physics.chem-ph]. Université Rennes 1, 2021. Français. NNT : 2021REN1S084 . tel-03609511

HAL Id: tel-03609511

<https://theses.hal.science/tel-03609511v1>

Submitted on 15 Mar 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE RENNES 1

ECOLE DOCTORALE N° 596

Matière, Molécules, Matériaux

Spécialité : « *Chimie Physique, Chimie Théorique* »

Par

« **Timothé PHILIPPON** »

« **Développement et étude des bio-cathodes dénitrifiantes dans le contexte de la dépollution des zones humides** »

Thèse présentée et soutenue à Rennes, le 15/12/2021

Unité de recherche : **UMR 6226**

Thèse N° :

Rapporteurs avant soutenance :

Nicolas Bernet Directeur de Recherche, INRAe

Pascal Mailley Directeur de Recherche, CEA

Composition du Jury :

Président :

Examineurs : Florence Geneste

Gwennola Ermel

Mathieu Etienne

Théodore Bouchez

Dir. de thèse : Frédéric Barrière

Directeur de Recherche, CNRS

Professeur d'Université, Université Rennes 1

Directeur de Recherche, CNRS

Directeur de Recherche, INRAe

Maître de conférences, Université Rennes 1



Thèse / Université de Rennes 1

Pour le Grade de :

Docteur de l'Université de Rennes 1

Mention : Chimie

Ecole doctorale : Matière, Molécules et Matériaux (3M)

Soutenu par :

Timothé Philippon

Préparée à l'Unité Mixte de Recherche 6226

Au sein de l'équipe : Matière Condensée et Systèmes Electroactifs

Développement et étude des bio-cathodes dénitrifiantes dans le contexte de la dépollution des zones humides

Thèse soutenue à Rennes le 15 Décembre devant le jury composé de :

- **Nicolas Bernet**, Directeur de Recherche INRAe / Rapporteur
- **Pascal Mailley**, Directeur de Recherche CEA / Rapporteur
- **Florence Geneste**, Directeur de Recherche CNRS / Examineur
- **Gwennola Ermel**, Professeur d'Université / Examineur
- **Mathieu Etienne**, Directeur de Recherche CNRS / Examineur
- **Théodore Bouchez**, Directeur de Recherche INRAe / Examineur
- **Frédéric Barrière**, Maître de Conférences / Directeur de Thèse

Table des matières :

- Introduction Générale.....p.6
- Chapitre I : Introduction.....p.9
- Chapitre II : Premiers développements de bio-cathodes bactériennes par polarisation d'une électrode dans un milieu naturelp.65
- Chapitre III : Etude de la relation entre oxygène et dénitrificationp.109
- Chapitre IV – Développement de bio-cathodes à nitrates sous polarisation constante.....p.141
- Chapitre V : Etude de l'effet de la polarisation sur l'évolution des métabolismes bactériens exo-électrogènes.....p.169
- Conclusion Générale et Perspectives.....p.228

Introduction Générale

Ces travaux de thèse se concentrent sur le développement ainsi que l'optimisation de bio-cathodes dénitrifiantes, une technologie dérivée des bio-piles microbiennes décrites pour la première fois par Michael Cressé Potter en 1911 [1]. Les bio-piles microbiennes exploitent la capacité de certaines bactéries à transférer des électrons à une surface solide telle qu'une électrode notamment.

Les deux principales utilisations de cette technologie sont respectivement la production de courant électrique ainsi que la catalyse de réactions chimiques, notamment dans un objectif de dépollution, chacune de ces deux utilisations étant directement liées aux métabolismes des micro-organismes localisés sur les électrodes de la bio-pile.

La première utilisation, axée sur la production de courant électrique, s'est révélée relativement limitée car la quantité de courant produit est relativement basse, avec une échelle dépassant rarement les dizaines d'A.m⁻² pour les systèmes les mieux optimisés. De fait, l'exploitation de la bio-pile comme générateur d'électricité reste assez peu crédible à l'échelle industrielle.

En revanche, l'utilisation de ces bio-piles comme catalyseur est une opportunité et un espoir dans des domaines aussi différents que la récupération de matières premières importantes telles que des métaux [2,3], la production d'hydrogène [4] mais également la dépollution des milieux naturels de composés comme les perchlorates [5] ou les nitrates.

C'est sur ce dernier point que cette thèse se concentre. Via l'agriculture, la pollution des eaux naturelles en nitrate a graduellement augmentée en France et dans le reste du monde. Cette pollution représente un risque sanitaire débattu mais un risque environnemental avéré via l'eutrophisation des milieux.

Le projet lié à cette thèse est le projet ANR LowNitrate qui vise à développer un système bio-électrochimique passif (sans apport extérieur de courant ni application extérieure de potentiel) permettant l'augmentation de l'efficacité de la dénitrification au sein d'une zone humide artificielle recueillant les eaux de ruissellement issues de l'agriculture.

Le type de système bio-électrochimique envisagé pour ce projet est le « Snorkel » ou « Tuba » électrochimique, une technologie impliquant à la fois un pôle anodique où est oxydée la matière organique et un autre où est réduit le nitrate et/ou l'oxygène, le tout catalysé par des biofilms bactériens distincts [6].

Cette thèse se concentrera principalement sur la partie cathodique où a lieu le processus de réduction.

Dans un premier temps, une introduction générale détaillera les grands concepts d'électrochimie, de bio-électrochimie, de microbiologie ainsi que d'écologie. Seront ensuite approfondis la problématique des bio-cathodes et en particulier les bio-cathodes à nitrate et à oxygène. Afin de bien saisir les enjeux de la pollution en nitrate des eaux naturelles, un état des lieux sera dressé avant d'exposer les grandes lignes du projet LowNitrate et comment les travaux de cette thèse s'y inscrivent.

Le deuxième chapitre mettra en lumière le développement de bio-cathodes à oxygène via polarisation externe ainsi que les liens entre développement de ces bio-cathodes réduisant l'oxygène et l'augmentation de l'efficacité du processus de dénitrification.

Le troisième chapitre se concentrera sur la relation entre la présence d'oxygène et l'efficacité de la dénitrification au sein de pilotes contenant des inocula biologiques provenant d'une zone humide artificielle.

Via le quatrième chapitre, nous arriverons ensuite dans le cœur du sujet avec une partie portant sur le développement de bio-cathodes à nitrate dans un environnement sédimentaire sur une période courte d'un mois.

Le quatrième chapitre fera suite aux résultats du précédent avec pour objectif de décrire comment ces bio-cathodes dénitrifiantes ont été développées à nouveau mais avec comme axe d'étude principal l'effet de la polarisation externe d'une électrode sur les communautés bactériennes et les sur réactions bio-électrochimiques qui en découlent.

Références

- [1] M.C. Potter, Electrical effects accompanying the decomposition of organic compounds, *Proc. R. Soc. London. Ser. B, Contain. Pap. a Biol. Character.* 84 (1911) 260–276. <https://doi.org/10.1098/rspb.1911.0073>.
- [2] C. Choi, Y. Cui, Recovery of silver from wastewater coupled with power generation using a microbial fuel cell, *Bioresour. Technol.* 107 (2012) 522–525. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.12.058>.
- [3] A. Ter Heijne, F. Liu, R. van der Weijden, J. Weijma, C.J.N. Buisman, H.V.M. Hamelers, Copper Recovery Combined with Electricity Production in a Microbial Fuel Cell, *Environ. Sci. Technol.* 44 (2010) 4376–4381. <https://doi.org/10.1021/es100526g>.
- [4] B. Tartakovsky, M. Manuel, H. Wang, S. Guiot, High rate membrane-less microbial electrolysis cell for continuous hydrogen production, *Int. J. Hydrogen Energy.* 34 (2009) 672–677. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.11.003>.
- [5] C.S. Butler, P. Clauwaert, S.J. Green, W. Verstraete, R. Nerenberg, Bioelectrochemical Perchlorate Reduction in a Microbial Fuel Cell, *Environ. Sci. Technol.* 44 (2010) 4685–4691. <https://doi.org/10.1021/es901758z>.
- [6] M. Hoareau, B. Erable, A. Bergel, Microbial electrochemical snorkels (MESs): A budding technology for multiple applications. A mini review, *Electrochem. Commun.* 104 (2019) 106473. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2019.05.022>.

Chapitre I : Introduction

Cette introduction sera consacrée à faire une synthèse des connaissances du domaine de la bio-électrochimie mais également un état de l'art de son application dans la dénitrification des eaux, notamment environnementales.

En premier lieu, afin de pouvoir comprendre les mécanismes du transfert d'électron en électrochimie microbienne, il est nécessaire de faire un tour d'ensemble du métabolisme bactérien en général afin de définir à quels endroits le mécanisme de transfert d'électron extracellulaire (métabolisme exo-électrogène) est impliqué.

La deuxième partie de l'introduction aura pour objectif d'expliquer l'état des connaissances fondamentales sur les mécanismes biochimiques du métabolisme exo-électrogène à différentes échelles allant de l'échelle moléculaire via une explication des métabolismes impliqués à une échelle macroscopique via une description de la pile microbienne.

Cette introduction se concentrera ensuite sur le cas des bio-cathodes à nitrate, sujet principal des travaux de cette thèse et dont un état des lieux actuel est absolument nécessaire. Nous verrons quelles sont les limites et les défis que cette technologie pose à l'heure actuelle.

Ces dernières années, le domaine de la dénitrification via des moyens bio-électrochimiques a connu un essor considérable notamment dans le traitement des eaux environnementales [1]. Cela est principalement lié au fait que la pollution en nitrate est une problématique majeure dans les pays industrialisés possédant une activité agricole intensive. Il est donc nécessaire de décrire le contexte de la pollution en nitrate afin de bien saisir les enjeux des travaux de cette thèse.

Enfin, pour conclure cette introduction, sera décrit le projet ANR LowNitrate auquel est rattachée cette thèse. Les travaux de thèse sont directement impliqués dans la réalisation à long terme du projet, à savoir mettre au point une électrode passive permettant la dénitrification sur le long terme des zones humides sans polarisation externe.

Table des matières

I) Explication détaillée des mécanismes du métabolisme exo-électrogène bactérien	14
1. Description générale des notions d'anabolisme et de catabolisme bactériens.....	14
2. Les différents types trophiques du monde bactérien	15
3. Description générale du catabolisme.....	16
4. La chaîne respiratoire	17
a) L'exemple de la respiration aérobie chez <i>Escherichia coli</i>	18
b) L'exemple de la respiration anaérobie chez <i>Paracoccus denitrificans</i>	19
c) Les différents potentiels standards des accepteurs d'électrons de la respiration.....	22
d) Circulation en sens inverse des électrons dans la chaîne respiratoire	25
5. Le cas du métabolisme exo-électrogène au sein du métabolisme respiratoire	28
a) Le transfert d'électron par contact direct.....	29
b) Le transfert d'électrons par nano-fils conducteurs	31
c) Le transfert d'électrons indirect via des navettes électroniques	34
d) Le métabolisme exo-électrogène anodique	37
II) Le métabolisme exo-électrogène cathodique	38
III) Les systèmes bio-électrochimiques microbiens	40
1. Le problème de la surtension.....	42
IV) Le cas des nitrates, nouveau défi de la bio-électrochimie microbienne	44
1. Les bio-cathodes dénitrifiantes.....	45
2. La pollution en nitrate	49
3. Le projet LowNitrate	53
4. Intégration des travaux de cette thèse au sein du projet et des objectifs du projet LowNitrate.	55
V) Références	56

Le domaine scientifique dans lequel les travaux de cette thèse s'inscrivent est la bio-électrochimie microbienne, un champ de recherche à l'interface entre l'électrochimie traditionnelle et la biologie et plus particulièrement la microbiologie. Ce domaine naquit au début du XX^e siècle par l'intermédiaire de Michael Cressé Potter [2] qui nota que certains micro-organismes (notamment la levure *Saccharomyces cerevisiae*) cultivés dans certaines conditions pouvaient alors générer un courant électrique mais les mécanismes biochimiques impliqués ne furent expliqués que dans la deuxième moitié du XX^e siècle.

Malgré la méconnaissance des mécanismes biochimiques, les premières bio-piles furent construites durant cette période en se servant notamment de compost comme inocula. Au cours des décennies, les montages se sont affinés puis ce fut principalement dans le début des années 2000 que l'intérêt pour le domaine a fait un grand retour avec un grand nombre de publications (Figure 1).

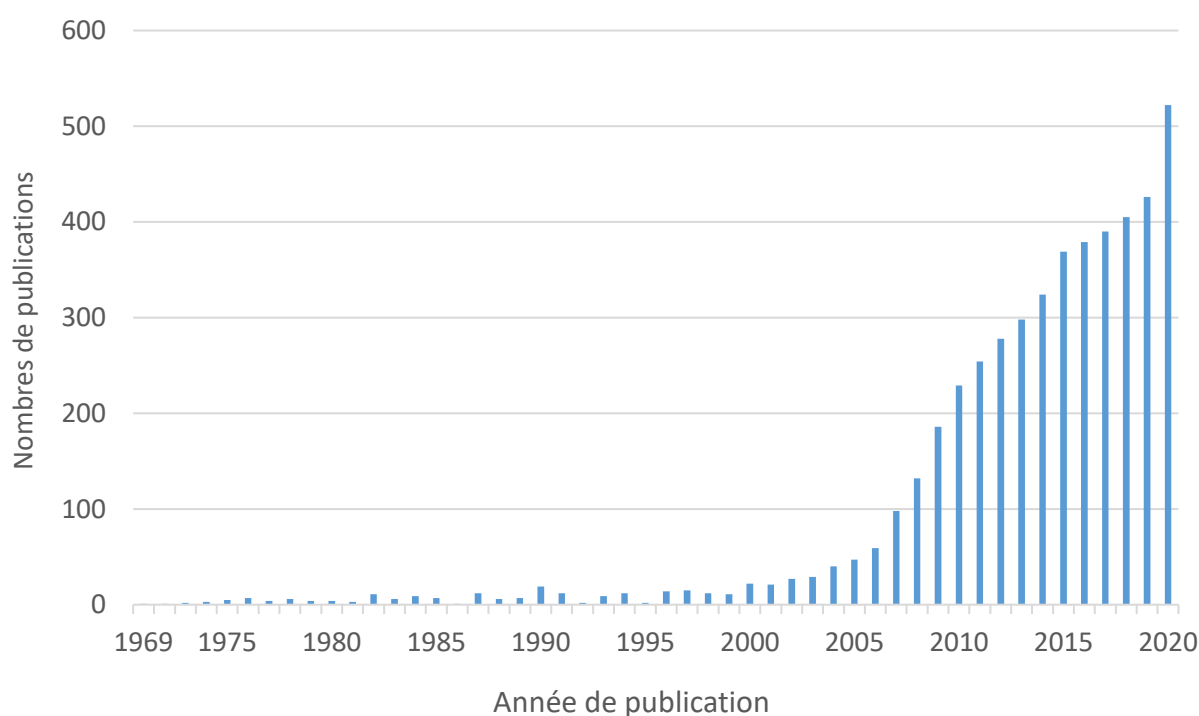


Figure 1 : Nombres de publications contenant le terme « MFC » ou « Microbial Fuel Cell » dans leur titre et/ou Abstract en fonction de leur année de publication. Source : PubMed

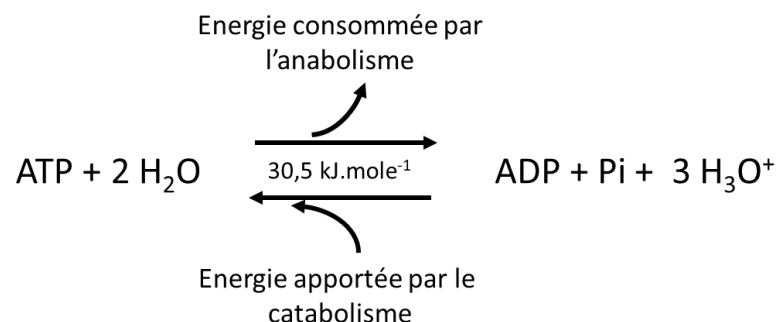
Dans ce chapitre introductif nous commencerons par étudier dans un premier temps les principes généraux de la bio-électrochimie tout en évoquant le métabolisme bactérien en démarrant à l'échelle moléculaire par une description des mécanismes biochimiques impliqués puis à l'échelle de l'électrode pour finir par l'échelle de la pile microbienne elle-même.

1) Explication détaillée des mécanismes du métabolisme exo-électrogène bactérien

1. Description générale des notions d'anabolisme et de catabolisme bactériens

Afin de saisir le fonctionnement des métabolismes propres au transfert d'électrons extracellulaire, il est essentiel de comprendre les grandes lignes du métabolisme du vivant et plus particulièrement du monde bactérien. Au sein de la notion large de métabolisme, on distingue tout d'abord l'anabolisme puis le catabolisme. L'anabolisme est la partie du métabolisme permettant à l'organisme vivant la synthèse de ses composants élémentaires (membranes, ADN, protéines...) qui sont souvent de grosses molécules complexes obtenues à partir de molécules plus simples. La majeure partie des réactions permettant d'obtenir ces molécules complexes sont dites « endergoniques », signifiant qu'elles nécessitent un apport extérieur d'énergie. De fait, afin de permettre la biosynthèse de ces composants, il est nécessaire à l'organisme de disposer de réserves d'énergie sous forme chimique. Cette réserve d'énergie est fournie par le catabolisme, l'autre pan du métabolisme consistant en la biodégradation de molécules afin de fournir de l'énergie [3].

Afin que l'homéostasie (autrement dit la conservation de l'enthalpie locale) soit conservée et surtout permettre la reproduction (ou division dans le cas des bactéries) de l'organisme, l'équilibre entre l'énergie obtenue grâce au catabolisme et celle consommée via la biosynthèse de l'anabolisme doit être positive. Afin de pouvoir utiliser l'énergie obtenue via la dégradation de molécules au moment opportun, les organismes la conserve sous forme chimique, en particulier sous forme d'Adénosine Triphosphate (ou ATP) via la réaction suivante :



La molécule d'ATP permet donc de conserver l'énergie sous forme chimique au sein l'organisme. Une fois cette vision générale du métabolisme décrite, il est important d'étudier

plusieurs éléments respectifs de ces deux pans du métabolisme et qui seront évoqués dans cette thèse en commençant par le type trophique.

2. Les différents types trophiques du monde bactérien

Afin de définir les caractéristiques métaboliques et nutritionnels du monde vivant on classe les organismes de ce dernier selon trois grandes caractéristiques liées à la fois à l'anabolisme et au catabolisme :

- La nature de la source de carbone assimilée par l'organisme via l'anabolisme
- La nature de la source d'énergie utilisée par l'organisme
- La nature de la source d'électrons découlant du catabolisme

Il est possible de catégoriser tous les organismes vivants définis comme tel (exclusion des virus) à partir de ces trois caractéristiques. Cela permet de dresser un tableau général, régulièrement utilisé, notamment dans le champ de la microbiologie appliquée [4].

Source d'énergie	Source d'électrons	Source de carbone	Dénomination
Lumineuse <u>Photo</u>	Composé organique <u>Organo</u>	Carbone organique <u>hétérotrophe</u>	Photoorganoheterotrophe
		Carbone inorganique <u>autotrophe</u>	Photoorganoautotrophe
	Composé inorganique <u>Litho</u>	Carbone organique <u>hétérotrophe</u>	Photolithoheterotrophe
		Carbone inorganique <u>autotrophe</u>	Photolithoautotrophe
Chimique <u>Chimio</u>	Composé organique <u>Organo</u>	Carbone organique <u>hétérotrophe</u>	Chimioorganoheterotrophe
		Carbone inorganique <u>autotrophe</u>	Chimioorganoautotrophe
	Composé inorganique <u>Litho</u>	Carbone organique <u>hétérotrophe</u>	Chimiolithoheterotrophe
		Carbone inorganique <u>autotrophe</u>	Chimiolithoautotrophe

Table 1 : Synthèse des différents types trophiques du monde vivant accompagnée de la dénomination correspondante.

Comme il sera détaillé dans la suite, les voies métaboliques permettant des transferts d'électron vers des matériaux extracellulaires, les milieux d'incubation ainsi que les ajouts pratiques doivent être réfléchis en fonction du type de bactéries dont on désire favoriser le développement via la pression sélective. Une fois ces informations générales sur le métabolisme bactérien et leur type trophique assimilés, il est maintenant nécessaire de s'intéresser aux métabolismes concernés par ces transferts d'électron extracellulaires, notamment l'oxydation des sources d'électrons ainsi que la chaîne du transport de ces électrons au sein de la chaîne respiratoire.

3. Description générale du catabolisme

Afin de bien saisir les métabolismes cathodiques et anodiques de transferts d'électrons, il est important de faire une description générale des voies métaboliques concernées. En premier lieu, un rappel du principe général du catabolisme peut se montrer nécessaire. Afin de pouvoir générer de l'énergie qui sera ensuite stockée (notamment sous forme d'ATP) puis utilisée lors de réactions endergoniques, il est nécessaire dans le cas des organismes chimiotrophes d'oxyder des molécules plus ou moins complexes afin de recueillir l'énergie contenue dans les liaisons covalentes qui les composent. Les deux grands ensembles de processus métaboliques permettant cela sont la respiration (aérobie et anaérobie) et la fermentation (cette dernière ne sera pas détaillée ici).

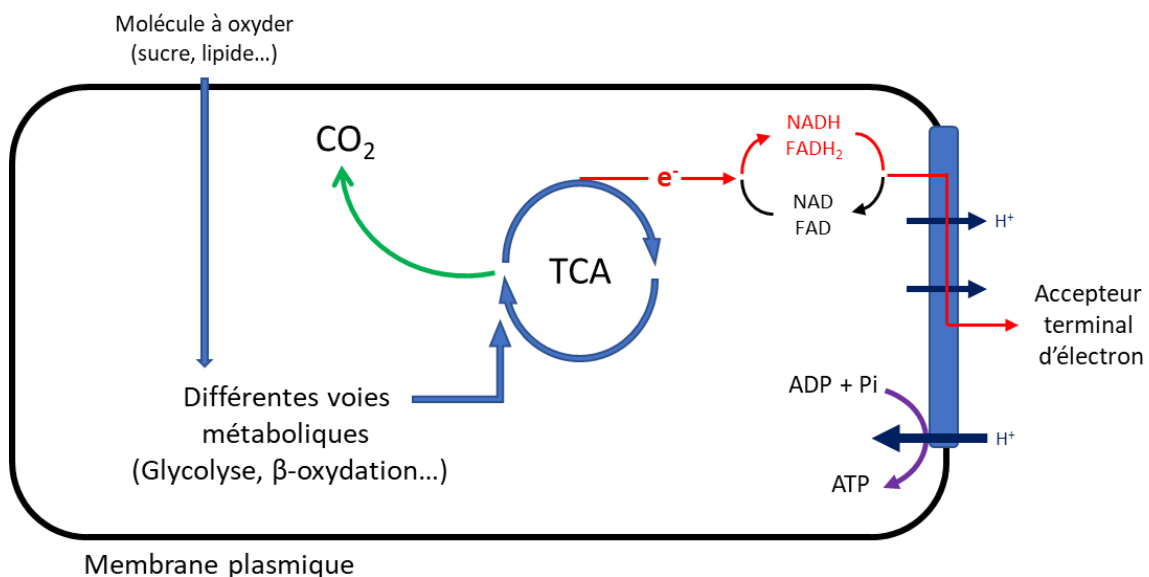


Figure 2 : Schéma simplifié de la voie métabolique catabolique menant à la respiration cellulaire dans le cas d'un organisme chimiotrophe. La molécule à oxyder va suivre différentes voies selon sa nature puis finira par rejoindre le cycle de l'acide citrique (TCA cycle en anglais pour Tricarboxylic Acid Cycle), sous forme de pyruvate, d'acétyl-CoA, etc. pour rentrer dans le métabolisme de la respiration cellulaire.

Comme montré sur la Figure 2, le catabolisme respiratoire consiste en trois grandes étapes :

- La première étape est une dégradation primaire de la molécule à oxyder dont le chemin va varier avec la nature de la molécule (glycolyse pour les sucres, la β -oxydation pour les lipides et diverses voies pour les différents acides aminés des protéines). Cette partie essentielle ne fait pas partie de la respiration cellulaire mais permet de la rejoindre en transformant la molécule d'origine en un des intermédiaires du cycle de l'acide citrique (pyruvate, acétyl-CoA, cétoglutarate).

- La deuxième étape est le cycle de l'acide citrique (communément appelé cycle de Krebs ou TCA cycle), début de la respiration cellulaire, qui consistera en la dégradation progressive de la molécule en CO_2 . De plus, des électrons seront générés via l'oxydation de cette molécule et transmis à la chaîne respiratoire via des navettes électroniques (NADH , FADH_2 ...) sous forme réduite.

- La dernière étape est le transport des électrons via les différents complexes de la chaîne respiratoire permettant le transfert de protons vers le milieu extérieur en les faisant traverser la membrane plasmique. La différence de concentration en protons entre les deux compartiments générera une force motrice qui permettra la synthèse de l'ATP par l'ATP-synthase à partir d'ADP et de P_i (Phosphate inorganique).

Il est extrêmement important de comprendre que chez les bactéries, la respiration cellulaire peut-être aérobie (dioxygène comme accepteur final d'électron) ou anaérobie (autre accepteur terminal). La fermentation est une voie métabolique totalement à part et n'est pas une forme de respiration anaérobie.

La particularité du métabolisme exo-électrogène concerne surtout la dernière étape, à savoir le transfert d'électron au sein de la chaîne respiratoire. Ainsi une étude plus approfondie de cette partie du catabolisme s'impose afin de bien saisir le fonctionnement du métabolisme exo-électrogène bactérien.

4. La chaîne respiratoire

La chaîne respiratoire est une chaîne de transport d'électron dans la membrane plasmique composée d'enzymes ainsi que de protéines « rédox actives » ancrées dans cette dernière. Le rôle de la chaîne respiratoire est l'oxydation des co-enzymes (NADH , FADH_2) réduites lors des étapes précédentes du catabolisme [5]. Il est extrêmement important de noter que les enzymes

ainsi que la structure de la chaîne respiratoire peuvent varier d'un organisme à l'autre en fonction de son habitat, de la nature de l'accepteur terminal d'électrons et autre [6].

Pour bien saisir les nuances du fonctionnement de la chaîne respiratoire notamment dans le cadre de cette thèse portée sur la réduction des nitrates et de la comparer avec la respiration exo-électrogène, il est pertinent de comparer deux cas bien spécifiques : le cas de la chaîne respiratoire d'un organisme pratiquant la respiration aérobie et donc utilisant le dioxygène comme accepteur terminal d'électrons (ici *Escherichia coli* car très étudié) et celui d'un organisme utilisant le nitrate comme accepteur terminal (*Paracoccus denitrificans* choisi comme modèle car sa respiration des nitrates est relativement bien définie). A noter que certains organismes peuvent utiliser plusieurs accepteurs différents selon les conditions physico-chimiques et environnementales dans lesquelles ils se trouvent [7].

a) L'exemple de la respiration aérobie chez *Escherichia coli*

L'espèce *Escherichia coli* est l'une si ce n'est la bactérie la plus étudiée et donc la mieux définie au monde. Sa chaîne respiratoire est donc relativement bien connue et décrite aussi bien dans sa structure que dans la régulation de l'expression des protéines qui la composent [8]. A noter que l'organisation et la régulation de cette chaîne est extrêmement complexe, surtout si l'on y ajoute la respiration des nitrates dont est capable *Escherichia coli* [9]. De fait, la description qui en sera faite reste une simplification et se limitera à celle concernée par l'oxygène comme accepteur terminal :

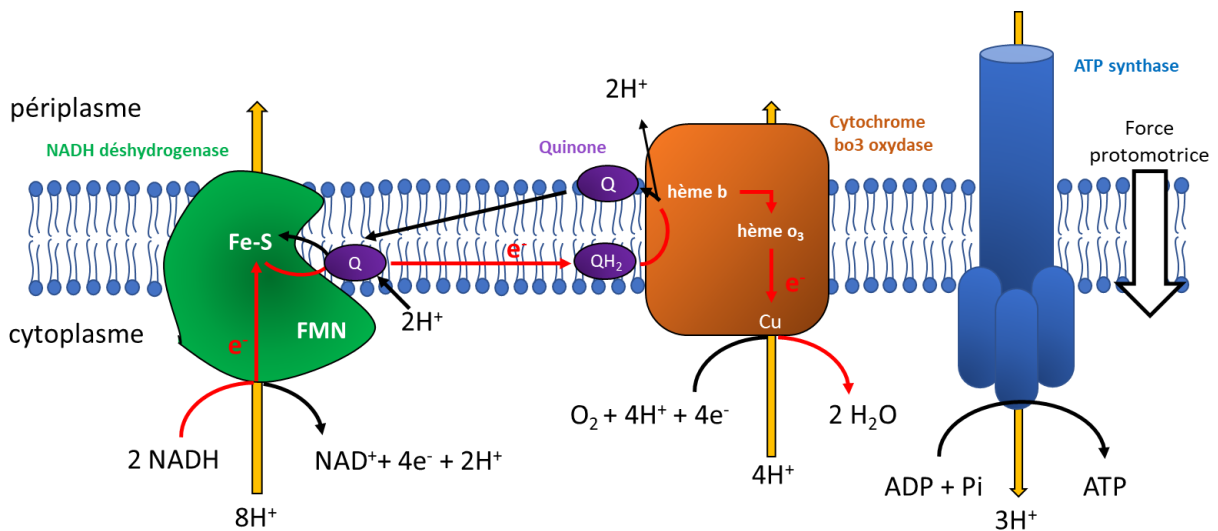


Figure 3 : Schéma simplifié de la chaîne de transfert d'électron impliquée dans la respiration aérobie chez *Escherichia coli*. A noter que si les protéines impliquées sont connues, leur structures internes restent débattues [10] ainsi que la stœchiométrie entre électrons et protons expulsés [11].

Comme montré sur la Figure 3, la chaîne respiratoire est basée sur une chaîne de transfert d'électron. Ces électrons sont transférés à la chaîne respiratoire à partir des composés réduits (notamment le NADH) obtenus lors de l'étape précédente de la respiration, à savoir le cycle de l'acide citrique (voir Figure 2).

Deux de ces NADH réduits seront alors oxydés par la NADH déshydrogénase, ce qui permettra le passage de huit protons du cytoplasme au périplasma de la bactérie. Les quatre électrons seront ensuite transférés à une navette électronique nommée l'ubiquinone-8 (désignée Q sur la Figure 3) qui sera réduite par ces électrons ainsi que par deux protons (le nombre reste débattu) provenant du cytoplasme. Cette navette électronique (Q/QH₂) va ensuite transférer de nouveau ces quatre électrons à la cytochrome bo₃ oxydase. A noter que cette oxydation de la navette électronique se fera à la surface de la membrane plasmique coté périplasma, ce qui aura pour conséquences l'ajout de deux protons à ce compartiment en plus du transfert d'électrons à la cytochrome bo₃ oxydase. Pour finir les électrons seront utilisés afin de réduire l'accepteur terminal, l'oxygène, en eau tout en consommant quatre protons au passage. Cette étape permettra à nouveau le passage de quatre protons du cytoplasme vers le périplasma.

C'est précisément le passage de ces 14 protons (pour le cas de la respiration aérobie pour *E. Coli*, le nombre de protons est à prendre avec prudence) qui va générer une force protomotrice liée à une différence de concentration en H⁺ (différence de pH) entre les deux compartiments que sont le cytoplasme et le périplasma. Cette force protomotrice va alors être exploitée afin de permettre la synthèse d'ATP à partir d'ADP et de phosphate inorganique.

Ce phénomène est rendu possible grâce à une structure protéique nommée ATP synthase. Ce complexe protéique à la structure complexe [12] va permettre le passage des protons du périplasma vers le cytoplasme et ainsi rétablir l'équilibre des concentrations en protons entre les deux compartiments. Lors du passage des protons, une rotation d'une partie de l'ATP synthase va avoir lieu et permettre la phosphorylation de l'ADP en ATP et donc d'y conserver de l'énergie qui pourra ensuite être utilisée lors de réactions endergoniques cellulaires.

b) L'exemple de la respiration anaérobie chez *Paracoccus denitrificans*

Le cas de la chaîne respiratoire anaérobie repose sur un système similaire de transfert d'électrons d'une protéine à l'autre avec passage de protons du cytoplasme au périplasma mais avec quelques variations notables. Au vu du sujet de cette thèse, le cas de la respiration des nitrates est la plus pertinente à étudier. Il est important de noter que, contrairement aux

organismes animaux, la structure et les protéines impliquées dans la chaîne respiratoire peuvent beaucoup varier d'un organisme à l'autre, et ce même si l'accepteur terminal d'électron est le même. L'une des espèces bactériennes respirant les nitrates dont la chaîne de transfert d'électrons est étudiée et connue est la bactérie *Paracoccus denitrificans*, une bactérie Gram négative (possédant deux membranes plasmiques séparées par un périplasma) chimiolithoautotrophe extrémophile connue pour sa capacité à se développer à des pressions très élevées (400 fois celle de la surface terrestre) [13].

La respiration des nitrates par *Paracoccus denitrificans*, rentre dans un type de métabolisme appelé la dénitrification, un type de métabolisme qui désigne la capacité à utiliser tous les intermédiaires entre le nitrate et le diazote comme accepteurs terminal d'électrons. Ainsi toutes les étapes de réductions allant du NO_3^- jusqu'à la réduction du N_2O en N_2 peuvent être catalysées. Ce n'est pas le cas de toutes les bactéries respirant le nitrate (de nombreuses bactéries sont capables de respirer le nitrate mais le laissent sous forme de nitrite sans pratiquer le reste des étapes de la dénitrification).

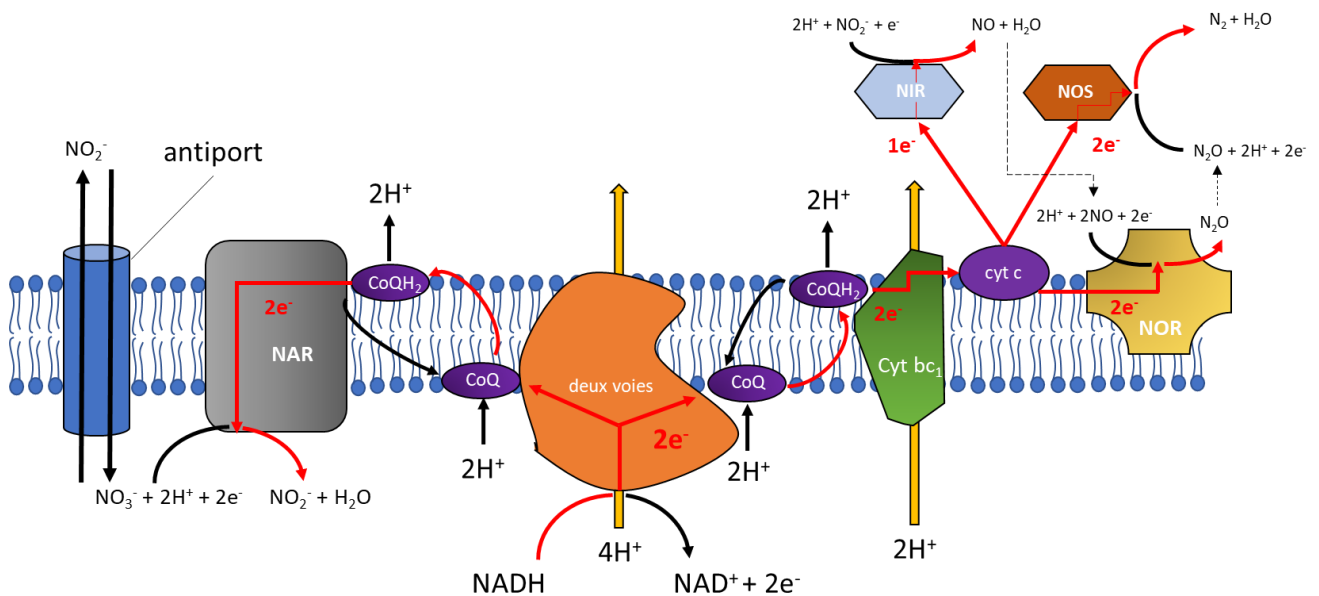


Figure 4 : Représentation schématique simplifiée de la chaîne respiratoire de la dénitrification chez *Paracoccus denitrificans* [14].

Comme le montre la Figure 4, le métabolisme de la respiration dénitrifiante (allant de la réduction du nitrate jusqu'à la réduction du protoxyde d'azote en diazote atmosphérique) est relativement complexe. Comme dans le cas de la respiration aérobie, le NADH réduit lors du cycle de Krebs sera oxydé par la NADH déshydrogénase permettant le passage de 4 protons du cytoplasme vers le périplasma. Cette oxydation génèrera 2 électrons par molécule de NADH

oxydée. Ces deux électrons pourront alors être exploités dans deux voies : celle de la réduction des nitrates et celle concernant le reste des étapes de réduction de la dénitrification (réduction du nitrite jusqu'au diazote). Dans les deux cas, les électrons seront transférés à une ubiquinone (CoQ) qui servira de navette électronique vers les protéines NAR et cyt bc1 initiant ces deux voies. Dans le cas de la réduction des nitrates, ces deux électrons seront transmis à un ion NO_3^- qui sera réduit en NO_2^- en plus d'une molécule d'eau. Afin d'acheminer le nitrate dans le cytoplasme (où a lieu sa réduction) et d'expulser les nitrites nouvellement formés dans le périplasma (où ont lieu les autres étapes de la dénitrification) on peut noter la présence d'un antiport protéique ancré dans la membrane plasmique séparant les deux compartiments.

Dans la seconde voie les électrons sont transférés au cytochrome bc_1 permettant à nouveau le transfert de deux protons dans le périplasma. Ces électrons vont ensuite pouvoir être distribués à diverses protéines permettant la réduction des différentes molécules intermédiaires entre le nitrite et le diazote. La régulation de la voie suivie par les électrons reste peu connue mais est très vraisemblablement liée à la concentration de ces molécules intermédiaires entre le nitrate et le diazote au sein du périplasma et du cytoplasme [15].

Le principe de la production d'ATP chez ces deux types de respiration (aérobie et anaérobie) sont les mêmes à savoir l'exploitation de la force protonmotrice via l'ATP synthase. Néanmoins, on peut noter ici que le nombre de protons transférés d'un compartiment à l'autre entre ces deux types de respiration diffère : 14 protons pour la respiration aérobie chez *E. Coli* et 6 à 8 protons pour la respiration anaérobie de *Paracoccus denitrificans* (selon la voie choisie) pour l'oxydation de deux molécules de NADH réduites via le cycle de l'acide citrique. Ce constat est très important car il implique que ces deux modes de respiration ne sont pas aussi rentables d'un point de vue énergétique, l'une permettant la synthèse d'un nombre plus important d'ATP à partir d'une molécule de NADH et donc plus globalement davantage d'ATP à partir d'une même molécule organique oxydée (une molécule de glucose par exemple) rentrant dans le catabolisme.

Il faut néanmoins rester très prudent sur ce sujet, car le nombre de protons transférés d'un compartiment à l'autre et la rentabilité en termes de production d'ATP sont très difficiles à évaluer expérimentalement. A cela s'ajoute le fait que pour une même molécule organique et un même accepteur terminal d'électrons, cette rentabilité va pouvoir varier d'une bactérie à l'autre selon les conditions physico-chimiques et autre. De fait, la stœchiométrie exacte entre nombre de protons transférés par nombre d'électrons entrant et sortant de la chaîne respiratoire est encore très largement mal comprise.

Cela n'empêche pas qu'il est très communément admis qu'une respiration avec comme accepteur terminal d'électrons l'oxygène générera d'avantage d'ATP qu'une respiration basée sur la réduction du nitrate. La raison à cela n'est pas fondamentalement métabolique mais avant tout thermodynamique. Pour bien comprendre cela, il faut se pencher sur les potentiels standards des couples redox des différents accepteurs d'électrons présents dans le monde vivant.

c) Les différents potentiels standards des accepteurs d'électrons de la respiration

Le catabolisme se base sur deux types de réactions chimiques : l'oxydation d'une molécule donneuse d'électron couplée à la réduction d'un accepteur terminal d'électron avec entre ces deux étapes, de nombreuses étapes intermédiaires permettant l'obtention d'une force motrice. Ainsi, pour que cela soit possible, il est absolument nécessaire que le couplage des deux réactions soit thermodynamiquement favorable signifiant que le potentiel standard de l'espèce oxydante soit supérieur à celui de l'espèce réductrice.

De plus, dans l'optique de maximiser le nombre de protons transloqués d'un compartiment à l'autre il est important que la différence entre ces deux potentiels soit véritablement significative et la plus importante possible. Si les potentiels d'oxydation des molécules organiques dégradées (glucose, acétate...) lors du catabolisme sont relativement proches (notamment dû au fait qu'elles rejoignent presque toutes le cycle de l'acide citrique sous des formes similaires, notamment l'acétyl-CoA), la nature de l'accepteur terminal d'électrons aura une grande importance dans l'efficacité de la respiration comme montré sur la Figure 5.

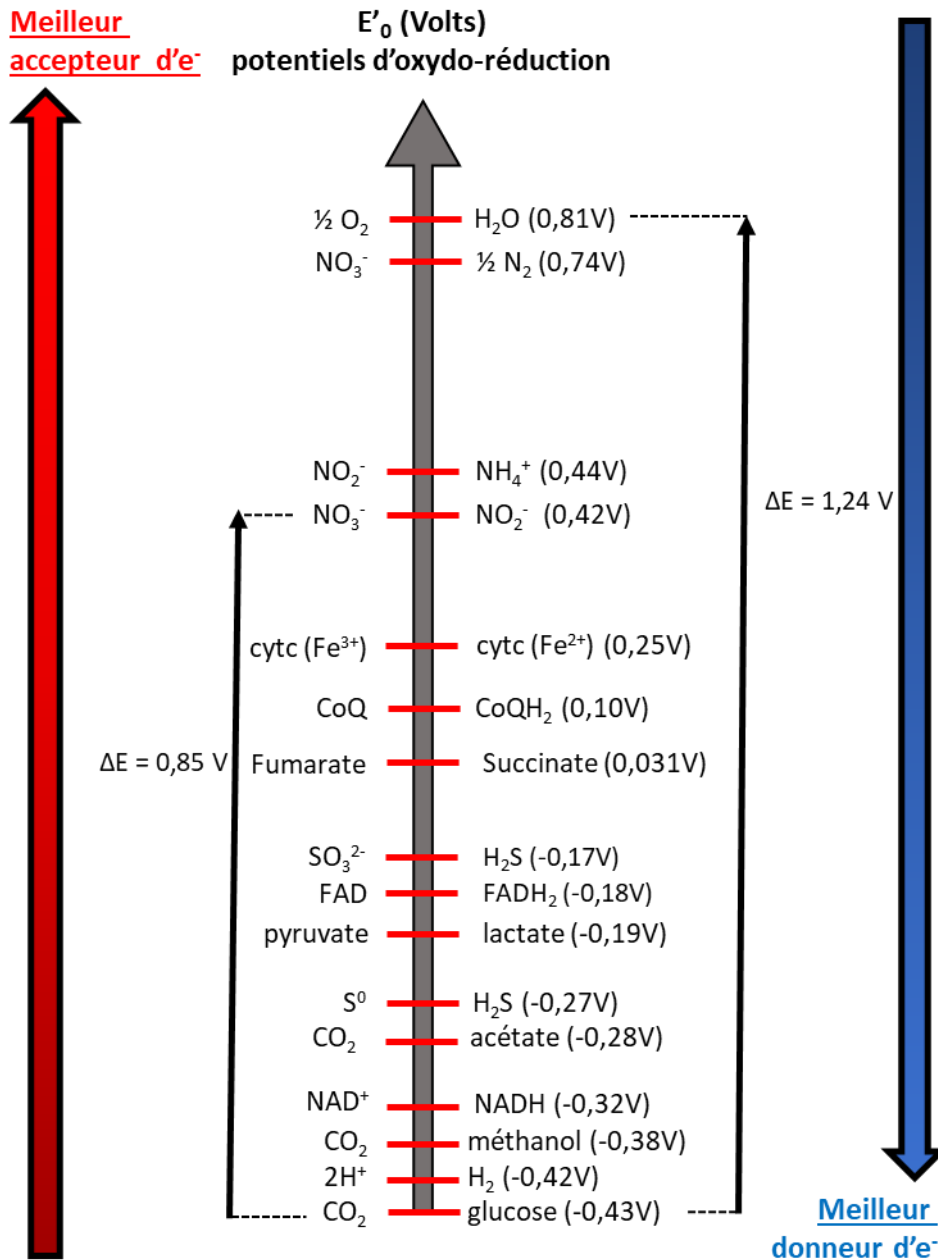


Figure 5 : Liste de certains potentiels d'équilibre thermodynamiques d'oxydo-réduction à pH = 7 en Volts contre le potentiel thermodynamique standard d'oxydo-réduction de l'hydrogène en protons ($2\text{H}^+/\text{H}_2$ à $\text{pH} = 0$, ou versus NHE pour Normal Hydrogen Electrode).

De fait, il est clair en regardant la Figure 5 que le nitrate comme accepteur terminal d'électrons est moins efficace car pour une même molécule oxydée (typiquement le glucose), la différence de potentiel sera moins importante dans le cas du nitrate comme accepteur d'électrons (environ 0,85 V à pH 7) comparé à l'utilisation de l'oxygène (1,24 V à pH 7), ce qui est la principale raison de la différence du nombre de protons transférés. En effet, plus la différence de potentiel est importante, plus le nombre de réactions d'oxydo-réduction couplées à des transferts de protons d'un compartiment à l'autre est important. Cela aura pour conséquence un meilleur

rendement en termes de production d'ATP (bien que d'autres raisons biologiques, environnementales et autres jouent également sur ce rendement).

Ainsi, on peut simplifier la chaîne respiratoire comme un enchainement de réactions d'oxydo-réduction allant d'un potentiel très négatif (oxydation du NADH) vers un potentiel très positif (réduction de l'accepteur terminal d'électrons) avec durant certaines étapes une translocation de protons d'un compartiment à l'autre.

Les subtilités électrochimiques des différentes chaînes respiratoires du monde vivant restent encore très mal connues et toujours très étudiées, en particulier parce que les complexes formant la chaîne respiratoire sont majoritairement composés de sous-unités protéiques incluant eux-mêmes plusieurs clusters Fe-S ou hèmes ayant des potentiels redox différents [16]. Si on ajoute à cela la grande diversité du monde bactérien, il reste difficile de donner une vision d'ensemble des différents potentiels des complexes des chaînes respiratoires bactériennes. On peut néanmoins prendre comme exemple illustratif le cas de la chaîne respiratoire des organismes eucaryotes mieux connue d'un point de vue électrochimique.

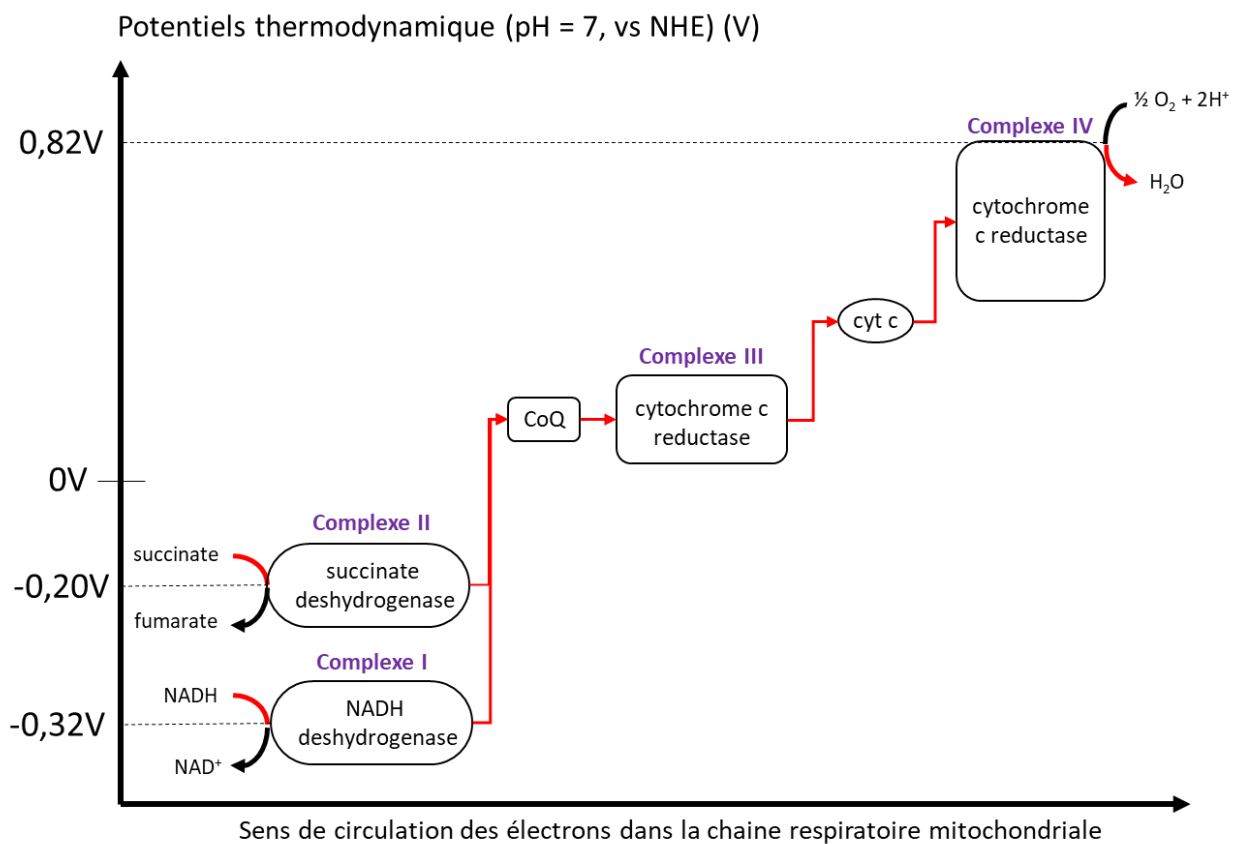


Figure 6 : Représentation des différents potentiels redox de la chaîne respiratoire eucaryotes (complexes et navettes intermédiaires) en fonction du sens de circulation des électrons [17].

Ainsi comme montré sur la Figure 6, les potentiels redox des premiers complexes sont proches des différents potentiels d'oxydation des molécules qui composent la matière organique (sucres, lipides...) puis ces électrons vont être transférés d'un complexe à l'autre via des réactions d'oxydoréduction des complexes en question. On peut alors observer que les potentiels de ces réactions vont peu à peu augmenter dans les valeurs positives pour finalement arriver au potentiel de réduction de l'accepteur terminal d'électrons.

Néanmoins, de récentes découvertes semblent indiquer qu'il est possible pour la chaîne respiratoire de fonctionner de manière inverse, bien que les mécanismes restent là encore mal compris. Ce point est également essentiel, notamment pour la compréhension des mécanismes des cathodes microbiennes expliqués plus loin et sur lesquels cette thèse se concentre.

d) Circulation en sens inverse des électrons dans la chaîne respiratoire

En effet, il est possible, dans certains cas, que les électrons circulent en sens inverse, c'est-à-dire que le donneur d'électrons sera oxydé à un potentiel plus positif que le potentiel auquel l'accepteur terminal sera réduit. Dans les faits, ce processus permet notamment de réduire et donc de « régénérer » des molécules de NAD^+ en NADH (le pouvoir réducteur de la cellule), voire de resynthétiser de la matière organique à partir de carbone inorganique (typiquement le CO_2) à la manière de la photosynthèse. Néanmoins, la grande différence avec la photosynthèse est que l'énergie nécessaire à cette biosynthèse de matière organique n'est pas de nature lumineuse (phototrophe) mais de nature chimique (chimio-organo-autotrophe ou chimio-litho-autotrophe). De fait, afin de pouvoir néo-synthétiser de la matière organique à partir de carbone inorganique, l'organisme va consommer de l'ATP.

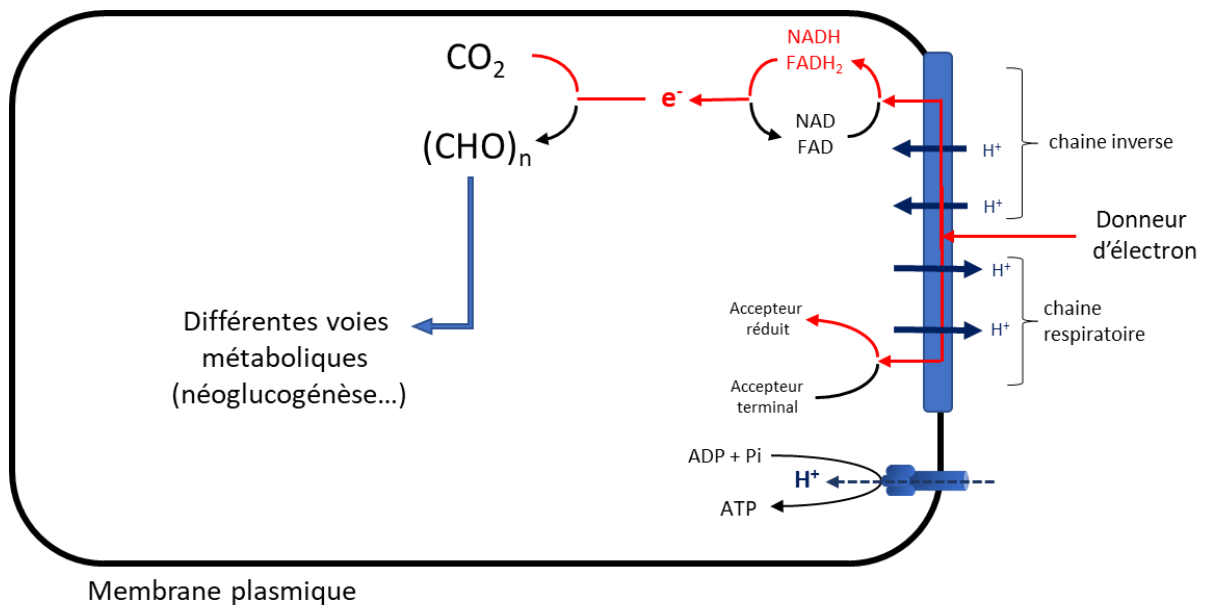


Figure 7 : Représentation schématique de la chaîne respiratoire inversée. A noter que les voies métaboliques permettant la synthèse de molécules organiques complexes à partir de molécules simples (typiquement la néoglucogénèse) sont également consommatrices d'ATP par hydrolyse (énergie) ainsi que de NADH (pouvoir réducteur).

D'un point de vue électrochimique, on se trouve cette fois-ci dans le cas d'une succession de réactions d'oxydation et de réduction permettant le transfert d'électrons d'un complexe à un autre mais avec cette fois une diminution successive des potentiels dans le négatif, signifiant qu'il s'agit d'une succession de réactions d'oxydo-réduction n'étant pas thermodynamiquement favorables et donc nécessitant l'apport d'énergie externe. Cette énergie sera apportée par la force motrice du compartiment extérieur vers l'intérieur (soit l'inverse de la chaîne classique) à la manière de l'ATP synthase. De fait, les électrons circulant dans cette chaîne inverse ne permettent pas de synthétiser de l'ATP car ils consomment une partie de la force motrice plutôt que de la générer.

Les détails ainsi que les structures protéiques impliquées dans cette chaîne inverse sont encore peu décrits mais on peut malgré tout distinguer deux cas particuliers qu'il est intéressant de discuter.

Le premier cas est lorsque cette circulation inverse se fait directement au sein de la chaîne respiratoire (cette dernière permet donc le transfert d'électrons dans un sens comme dans l'autre ainsi que la translocation des protons dans les deux compartiments). C'est par exemple le cas de la chaîne respiratoire mitochondriale. En effet, il a été prouvé dès les années 1960, dans des

conditions *in vitro*, que la chaîne respiratoire mitochondriale permet la réduction du NAD^+ en NADH [18] mais ce constat fut considéré comme une simple curiosité lié aux conditions de culture *in vitro*. Néanmoins de récentes études semblent indiquer que ce transfert inverse est bel et bien pratiqué par la cellule mais que cela reste une fonction très régulée de par la surproduction d'espèces réactives de l'oxygène (ou ROS) dangereuses pour l'organisme [19][20].

A l'inverse certaines bactéries possèdent une chaîne de transfert d'électrons spécifiquement destinée à une circulation en sens inverse (vers une réduction du NAD^+ en NADH). On peut par exemple citer parmi les bactéries possédant ce genre de chaîne alternative la bactérie *Acidithiobacillus ferrooxidans* capable d'oxyder des ions Fe^{2+} en Fe^{3+} et de se servir des électrons obtenus pour réduire le NAD^+ , le tout en se servant de la force protomotrice [21].

Néanmoins l'une des bactéries ayant sa chaîne inverse de transport d'électrons la plus connue reste sûrement *Nitrobacter*, un genre bactérien connu pour pratiquer la nitrification de son milieu de développement grâce sa capacité à oxyder le nitrite en nitrate dans l'optique de régénérer le NAD^+ en NADH [22].

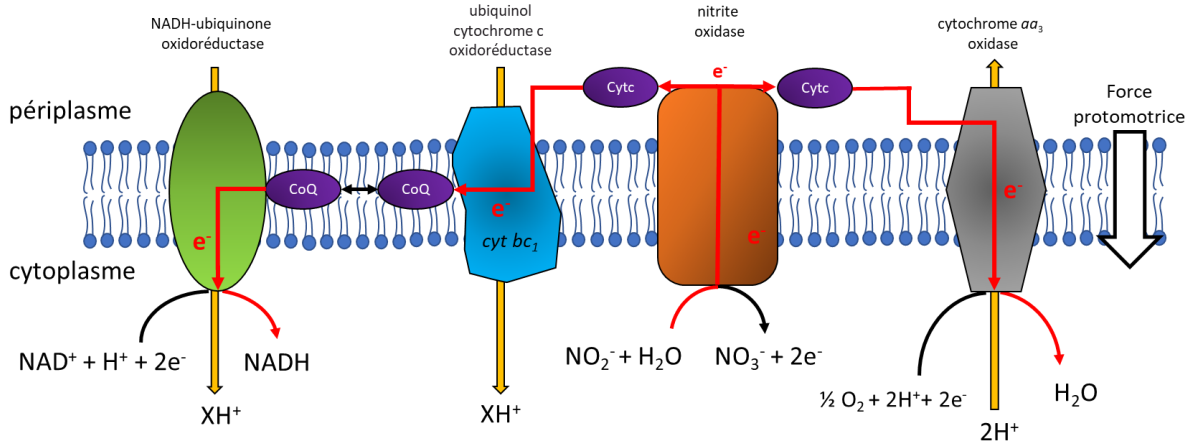


Figure 8 : Schéma représentant les deux voies possibles de transfert des électrons obtenus à partir de l'oxydation du nitrite en nitrate chez les bactéries appartenant au genre *Nitrobacter*.

Comme montré sur la Figure 8, l'oxydation du nitrite en nitrate va permettre d'acheminer les électrons vers deux voies de transfert : une chaîne respiratoire classique permettant de générer une force protomotrice avec comme accepteur terminal l'oxygène (thermodynamiquement favorable) et une chaîne respiratoire inverse qui va permettre la régénération du NAD^+ . Comme cette dernière voie est thermodynamiquement défavorable (potentiel d'oxydation du nitrite supérieur à celui de la réduction du NAD^+), la force protomotrice est ici consommée par la translocation des protons vers le cytoplasme.

Maintenant qu'une vue d'ensemble du catabolisme bactérien et notamment la respiration a été dressée, il est désormais temps de s'intéresser plus spécifiquement au cas du métabolisme exo-électrogène et comment ce dernier se traduit d'un point de vue métabolique par rapport à la respiration classique.

5. Le cas du métabolisme exo-électrogène au sein du métabolisme respiratoire

Comme expliqué dans la partie précédente, la respiration et notamment la chaîne respiratoire peut, en somme, se résumer à une succession de réactions d'oxydation et de réduction avec comme première réaction l'oxydation d'une molécule organique et comme réaction finale la réduction d'un composé qui servira d'accepteur terminal d'électrons. Afin que la réaction soit thermodynamiquement favorable, le potentiel de la première réaction d'oxydation doit être inférieur à celui de la réduction finale.

La notion de métabolisme exo-électrogène désigne la capacité de certaines bactéries (et potentiellement archaea [23]) à échanger des électrons avec une surface solide et extracellulaire. Ce métabolisme fut constaté à une échelle macroscopique dès début du XX^e siècle via l'observation d'une production de courant dans une pile utilisant de la matière organique en décomposition [2].

Ce n'est que bien plus tard qu'une description à l'échelle moléculaire a pu être détaillée et le domaine comporte encore de nos jours beaucoup d'éléments encore mal compris et la recherche reste très active. Les origines évolutives de ce type de métabolisme sont aujourd'hui débattues et certaines hypothèses vont jusqu'à affirmer que cette capacité à capter ou transférer des électrons avec des solides extracellulaires aurait été centrale lors des premiers proto-métabolismes apparus sur terre il y a entre 3,77 et 4,28 milliards d'années [24]. Cette théorie stipule que dans un milieu dépourvu d'oxygène (avant la grande oxydation durant laquelle des cyanobactéries ont enrichi l'atmosphère en oxygène), les métaux pouvaient représenter à la fois la principale source d'électrons mais étaient aussi le principal accepteur final à cause des concentrations importantes en métaux, aussi bien solides que solubilisés, notamment au sein des systèmes hydrothermaux des océans primitifs [25].

A l'heure actuelle, près d'une centaine d'espèces bactériennes ont été décrites comme étant capables d'échanger des électrons avec un solide extra-cellulaire [26]. Bien que le métabolisme exo-électrogène soit une capacité métabolique identifiable chez une très grande variété de micro-organismes allant jusqu'aux archaea [23] et capables de se développer dans diverses

niches écologiques [26], on peut néanmoins relever qu'une majorité des organismes électro-actifs connus sont des bactéries de types Gram – et appartenant au phylum des Proteobacteria [27].

Afin de pouvoir transférer ou capter les électrons à ces surfaces, énormément de chemins métaboliques ont été mis en place au cours de l'évolution. La plupart du temps on sépare le type de transfert d'électrons en trois catégories : le transfert par contact direct, le transfert par contact indirect et le transfert par l'intermédiaire d'un pili.

a) Le transfert d'électron par contact direct

Le cas le plus évident est celui du transfert direct d'électrons. Ce type de transfert est possible car ces bactéries possèdent toutes une voie de transfert d'électrons différente de celle décrite pour la chaîne respiratoire permettant le transport des électrons depuis la membrane interne (là où est localisée la chaîne respiratoire chez les Gram -) vers la membrane externe, celle-ci exhibant à sa surface des cytochromes pouvant être réduits (donc capter les électrons issus de l'oxydation de la respiration cellulaire) et pouvant s'oxyder au contact d'une surface afin de lui transmettre ces électrons. Parmi les espèces bactériennes connues pour leur métabolisme exo-électrogène anodique, les plus connues et étudiées sont *Geobacter sulfurreducens* et *Shewanella oneidensis* dont les voies de transfert d'électron extra-cellulaire sont parmi celles les mieux décrites dans la littérature et qui serviront donc d'exemples ici pour décrire les mécanismes de transferts directs d'électrons à une surface solide. En effet, ces deux espèces bactériennes sont à la fois les plus connues parmi les bactéries électro-actives et furent parmi les premières pour lesquelles des chemins métaboliques de transfert d'électrons directs furent proposés [28][29][6][30]. A noter que ces hypothèses ont évoluées avec le temps, notamment au fur et à mesure que de nouvelles protéines furent identifiées, ce qui reste le cas aujourd'hui. Les chemins métaboliques décrits ici restent donc hypothétiques.

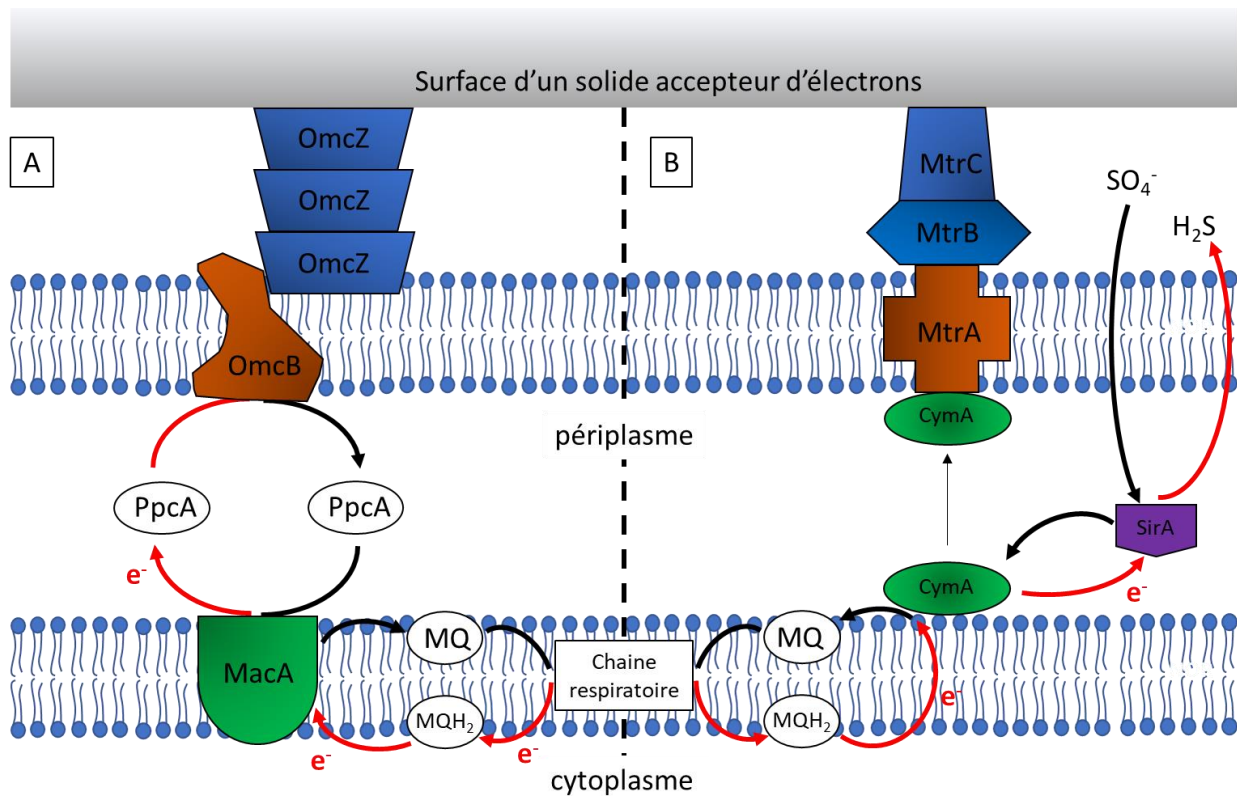


Figure 9 : Représentation schématique des chemins de transfert d'électrons extra-cellulaires par contact direct dans le cas de (A) *Geobacter sulfurreducens* et de (B) *Shewanella oneidensis*.

La Figure 9 montre une version simplifiée du chemin suivi par les électrons entre la chaîne respiratoire cellulaire classique (décrite dans la partie 4) et la transmission à la surface solide par contact direct chez *Geobacter sulfurreducens* et *Shewanella oneidensis*

Dans le cas de *Geobacter sulfurreducens*, la menaquinol (MQ) transmettra les électrons dans un premier temps à la protéine MacA, une protéine à la structure de type cytochrome-c [31]. Cette protéine sera alors oxydée par une autre protéine de type cytochrome-c, PpcA [32], dont le rôle principal est de faire traverser le périplasm aux électrons (*Geobacter sulfurreducens* étant une Gram -) afin d'atteindre les protéines de la famille Omc pour « Outer Membrane Cytochrome », un type de protéines connu pour son rôle de relai d'électrons. Dans le cas décrit, les protéines Omc sont présentes dans la membrane externe de la bactérie. Les électrons seront alors transmis d'une protéine Omc à l'autre, ces dernières étant empilées au niveau de la membrane externe jusqu'à la surface solide, l'accepteur terminal. Il faut néanmoins conserver à l'esprit que ce chemin n'est probablement pas le seul à être présent chez *Geobacter sulfurreducens*, cette dernière possédant jusqu'à 111 gènes codant pour des protéines identifiées comme appartenant à la famille des cytochrome-c, ces dernières ayant un rôle central dans le

métabolisme exo-électrogène. Il donc vraisemblable que d'autres voies de transfert d'électrons encore inconnues existent chez cette espèce.

Pour ce qui est de *Shewanella oneidensis*, la première étape est la même, à ceci près que c'est la protéine CymA qui recevra les électrons de la menaquinol. Cette protéine est importante car elle représente un carrefour pour les électrons, ces derniers pouvant à la fois être acheminés vers la voie du métabolisme exo-électrogène mais également vers bien d'autres voies comme la réduction de SO_4^- (la seule représentée sur la Figure 9), des nitrites et autres [33][34].

Tout comme PpcA chez *Geobacter*, CymA permettra aux électrons de traverser le périplasme afin d'atteindre les protéines Mtr présentes dans la membrane externe. A la manière des Omc de *Geobacter* les électrons seront alors transmis d'une Mtr à l'autre jusqu'à la surface du solide qui servira d'accepteur terminal d'électron.

Néanmoins, ces voies de transfert direct d'électrons nécessitent un contact entre les protéines externes de la membrane plasmique de la bactérie et la surface solide. Or, dans le cas du développement d'un biofilm, le transfert d'électrons par contact direct n'est pas toujours la méthode la plus optimale car elle n'est possible que sur une échelle nanométrique. Ainsi, les bactéries électro-actives ont développé des méthodes alternatives notamment via un contact indirect en se servant de « navettes électroniques » ou « médiateurs redox » mais également via l'utilisation de structures spécifiques permettant d'acheminer les électrons sur de grandes distances (à l'échelle du micromètre) nommés nano-fils.

b) Le transfert d'électrons par nano-fils conducteurs

Les pili conducteurs ou « nano-fils » bactériens (bacterial nanowires en anglais) n'ont été identifiés que très récemment, en 2005, chez l'espèce *Geobacter sulfurreducens*, via la microscopie à force atomique conductrice (C-AFM) permettant de visualiser le passage de courant électrique dans ces structures [35]. Bien que de nombreuses espèces aient été décrites comme capables de produire des nano-fils dont on peut citer par exemple *Pelotomaculum thermopropionicum* ou encore la cyanobactérie *Synechocystis PCC6803* [36], ce sont encore une fois les deux espèces références de la bio-électrochimie microbienne à savoir *Geobacter sulfurreducens* et *Shewanella oneidensis* dont les nanowires sont les mieux décrits et étudiés. Or, il s'avère que l'évolution a mis en place des stratégies très différentes dans le développement de leurs nano-fils respectifs.

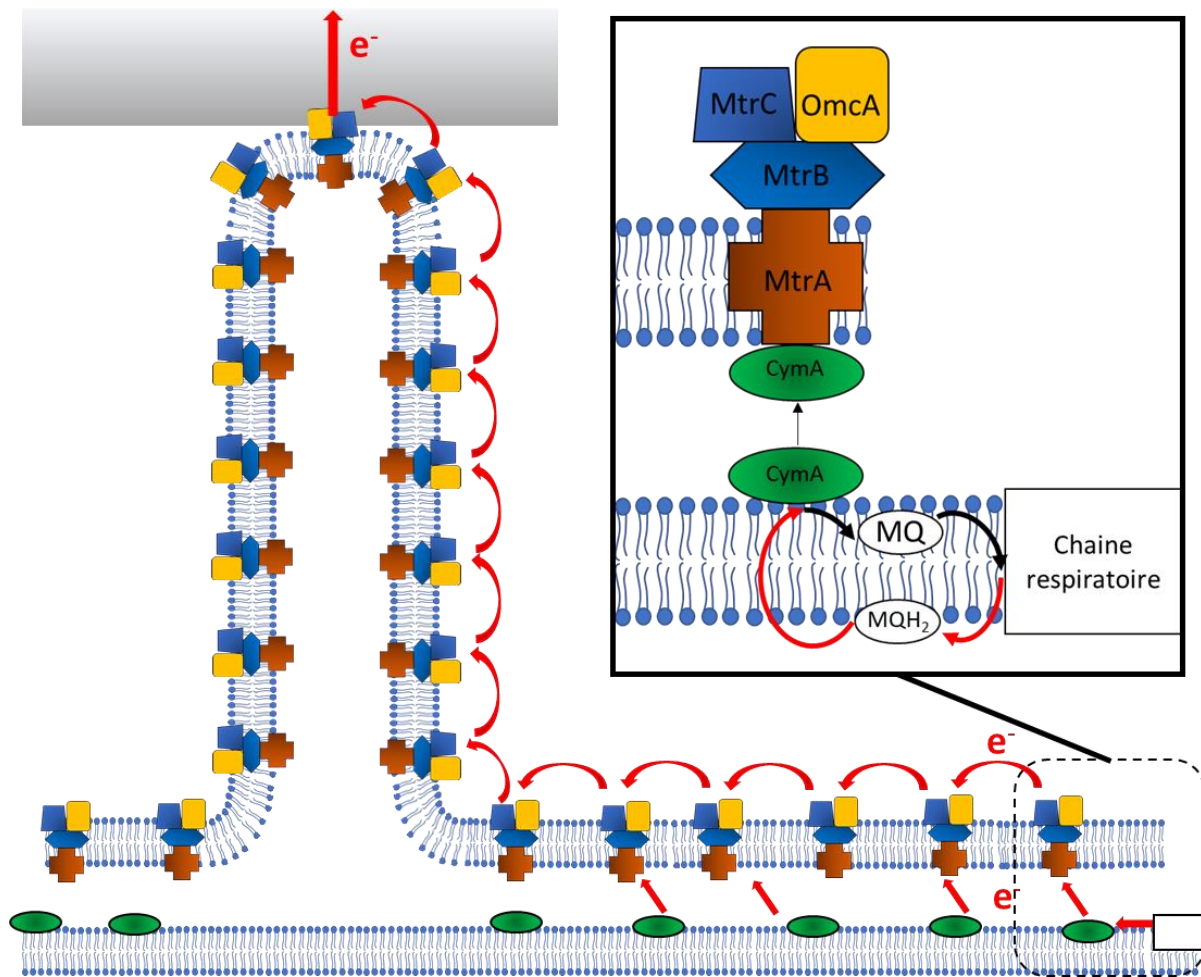


Figure 10 : Représentation schématique du nano-fils conducteur chez *Shewanella oneidensis* permettant le transfert extra-cellulaire d'électrons.

Comme représenté sur la Figure 10, le nano-fils de l'espèce *Shewanella oneidensis* s'apparente davantage à une invagination de sa membrane externe à la manière de pseudopodes, ce qui lui permettra d'atteindre alors la surface accepteuse d'électrons. A la surface de la membrane externe sont ainsi exposés des complexes protéiques similaires à ceux décrits dans la partie traitant du transfert par contact direct contenant notamment les protéines Mtr. Néanmoins, on peut noter cette fois-ci la présence d'un cytochrome de type Omc qui, selon les hypothèses actuelles, permettrait le transfert des électrons d'un complexe à l'autre afin que ceux-ci puissent remonter le long du nano-fils jusqu'à la surface de l'électrode ou les électrons seront transférés.

Cette méthode peut donc grossièrement se résumer à une multiplication des complexes déjà évoqués dans le cas du contact direct disséminés le long d'une invagination de la membrane externe de la bactérie afin de permettre à celle-ci d'atteindre des accepteurs d'électrons plus éloignés [36][37][38][30].

Assez étonnamment, l'autre espèce bactérienne très connue pour son métabolisme exo-électrogène, *Geobacter sulfurreducens*, a également développé des structures de type nano-fils permettant d'acheminer ses électrons à des surfaces acceptant les électrons mais de façon complètement différente via des structures protéiques plus proches de celle d'un pili traditionnel que de celle d'un pseudopode, en l'occurrence une structure protéique extra-cellulaire.

En effet, lorsque les premiers nano-fils chez *Geobacter sulfurreducens* furent remarqués, ils furent d'abord identifiés comme des versions dérivées d'un pili de type IV, un type de pili bactérien retrouvé dans toute une gamme d'espèces et possédant une structure protéique spécifique [39]. Les nano-fils de *Geobacter sulfurreducens* furent assimilés à ce type de pili de par l'observation de ces filaments conducteurs d'une part, et les similarités de séquences en acides aminés chez certains gènes identifiés chez cette espèce avec ceux codant pour le pili de type IV chez d'autres espèces d'autre part [35][40]. Pourtant, des études ont prouvé par la suite que certains de ces nano-fils n'étaient pas véritablement des dérivés du pili de type IV mais bien une structure unique basée sur une succession de protéines de type cytochromes (OmcS) empilées les unes sur les autres permettant la conduction des électrons sur de grandes distances (passage d'une distance en nanomètres à une distance de plusieurs micromètres) [41][42]. Ces nano-fils sont aujourd'hui désignés sous le terme de « filaments OmcS ».

En parallèle, de récentes études semblent indiquer que ces structures d'empilement de protéines OmcS ne seraient potentiellement pas le seul type de nano-fils présents chez *Geobacter sulfurreducens* mais qu'il pourrait également exister une ou plusieurs structures protéiques conductrices structurellement proches du pili de type IV, comme stipulée à l'origine, aujourd'hui surnommées e-pili [43][44].

Les structures précises de ces e-pilis sont mal connues, encore très largement débattues et étudiées aujourd'hui bien que le monomère protéique PilA semble avoir une importance centrale.

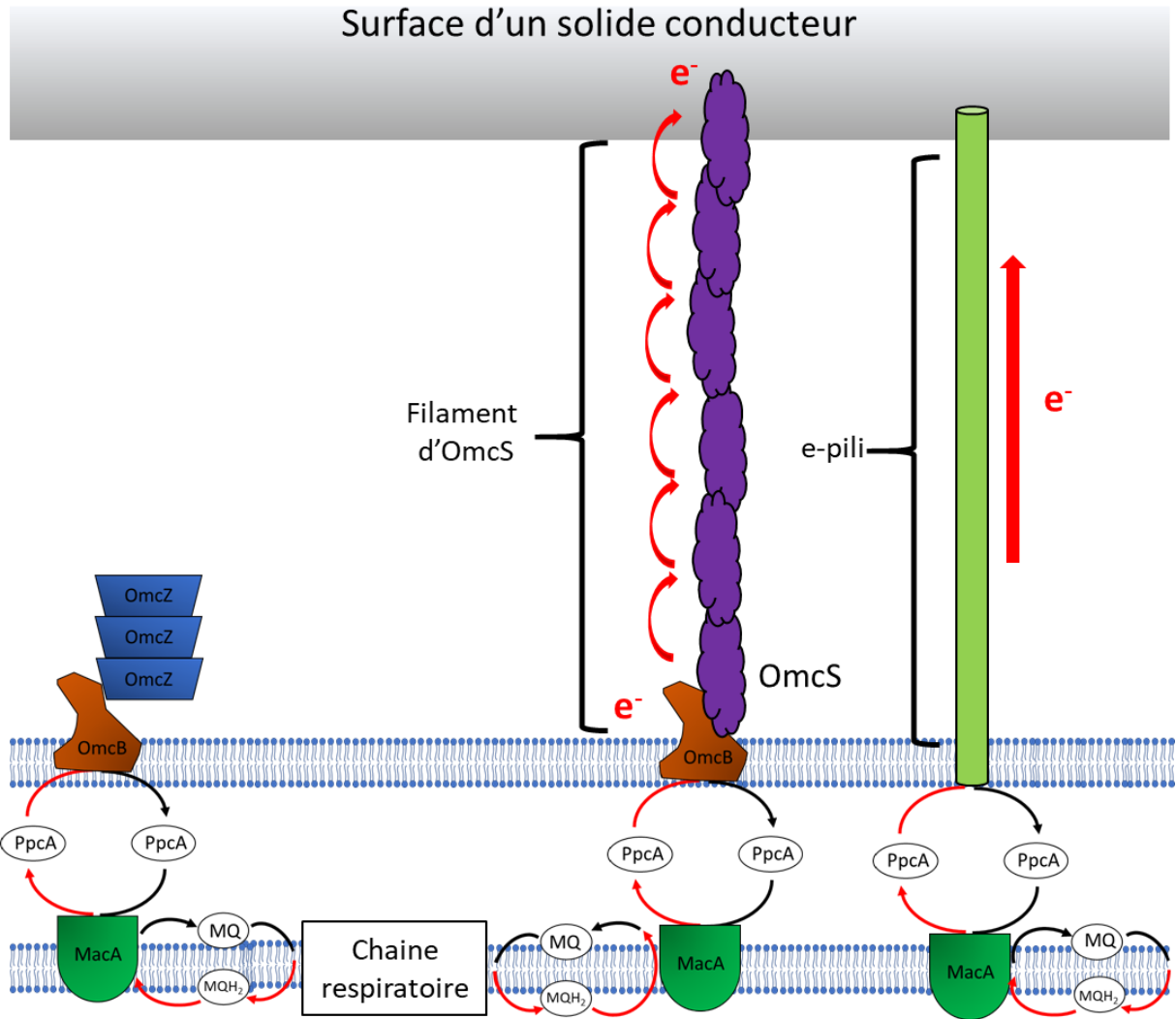


Figure 11 : Comparaison entre les chemins hypothétiques de transfert d'électrons de manière directe (gauche) et via un nano-fils conducteur (droite) chez le genre *Geobacter*.

Comme déjà signalé auparavant, il est très important de rester conscient que la découverte de ces nano-fils est très récente (15 ans seulement) et que les structures décrites restent encore largement mal connues dans le détail.

La dernière méthode permettant aux organismes électro-actifs de transmettre leurs électrons à des solides sur des distances encore plus importantes est l'utilisation de navettes électroniques.

c) Le transfert d'électrons indirect via des navettes électroniques

La dernière solution que les organismes électro-actifs ont à leur disposition pour augmenter la portée de leur transfert d'électrons à un solide est la synthèse et l'utilisation de navettes électroniques intermédiaires entre la cellule et le solide.

Ces navettes électroniques seront, dans un premier temps, réduites par la bactérie qui va lui donner les électrons issus de son catabolisme (et donc de l'oxydation d'un substrat). La navette électronique sera alors larguée dans le milieu jusqu'à arriver au niveau de l'accepteur terminal, à savoir le solide où elle s'oxydera afin de lui transmettre ses électrons.

Il peut également exister des cas où plusieurs réactions d'oxydo-réduction intermédiaires ont lieu, avec la transmission d'électrons d'un composé chimique à un autre jusqu'à l'accepteur terminal. On peut noter que ces navettes électroniques peuvent se diviser en deux catégories, celles synthétisée directement par les organismes (comme les flavines et les phénazines) mais également des composés naturellement présents dans le milieu (comme par exemple des ions métalliques).

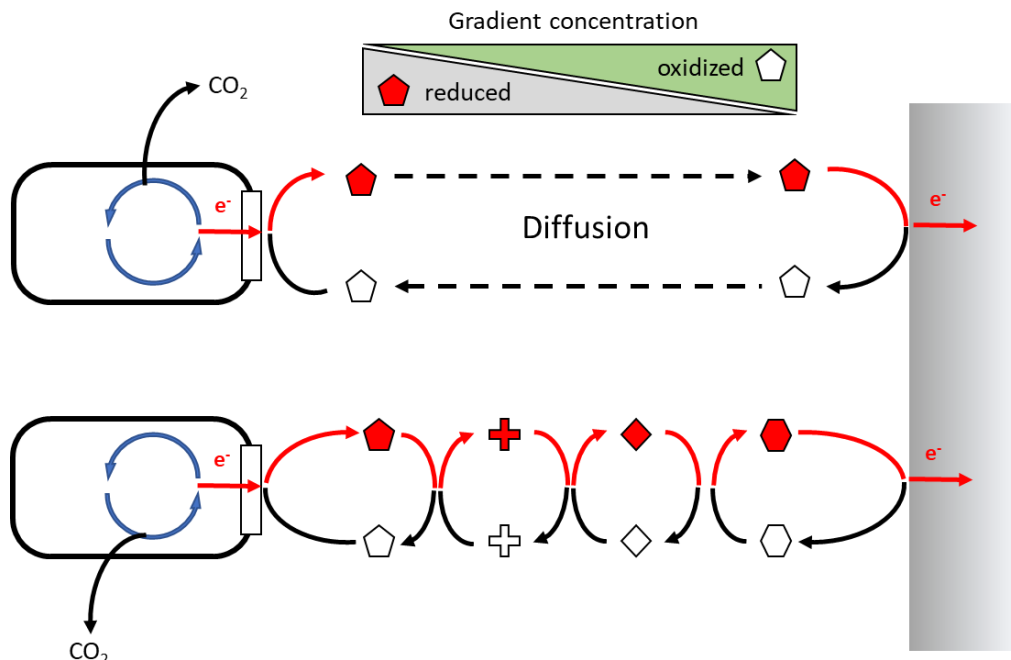


Figure 12 : Représentation schématique du transfert d'électrons à une surface solide via l'utilisation de navettes électroniques.

Par bien des aspects, les navettes électroniques extra-cellulaires synthétisées par la cellule peuvent être assimilées à des versions modifiées des navettes électroniques intra-cellulaires comme le NAD^+/NADH par exemple. Néanmoins on peut noter qu'à la différence de leurs homologues intra-cellulaires, ces navettes auront moins tendance à subir des adénylations et davantage d'ajout de groupes fonctionnels (amines, acides carboxyliques ou autres) qui auront pour effet d'altérer des caractéristiques physico-chimiques importantes de ces molécules, notamment la solubilité et le potentiel d'oxydo-réduction [45].

De nos jours le domaine du transfert d'électrons via des navettes est extrêmement complexe, notamment car plusieurs milliers de molécules excrétées ayant des caractéristiques assimilées aux quinones et aux flavines sont décrites, allant des vitamines (vitamines K par exemple [46]) à certaines hormones (comme les œstrogènes [47]). Ainsi il est très difficile de donner une liste exhaustive de caractéristiques physico-chimiques directement liées aux navettes électroniques extra-cellulaires. De plus, de récentes analyses génétiques ont permis d'émettre l'hypothèse que ce procédé de transfert extracellulaire d'électron est très présent chez de très nombreuses espèces [48].

On peut malgré tout citer quelques exemples de navettes électroniques extra-cellulaires avérées et étudiées comme par exemple le 2,6-di-tert-butyl-p-benzoquinone, une navette à électrons extracellulaire dérivé de la quinone et synthétisé par la bactérie électro-active *Klebsiella pneumoniae* [49]. Parmi les autres navettes extra-cellulaires identifiées, on peut citer l'exemple de la flavine nucléotidique synthétisée par *Shewanella oneidensis* afin de pouvoir transmettre ses électrons à un accepteur d'électrons sur une longue portée [50].

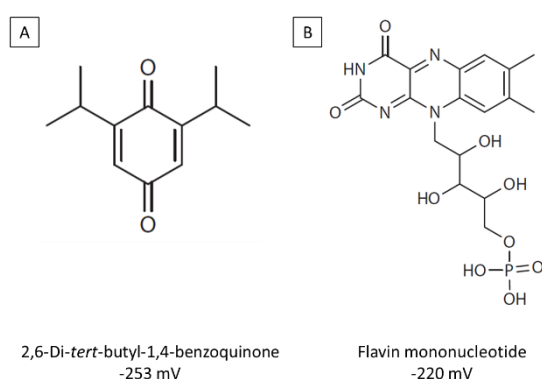


Figure 13 : Structure des navettes électroniques synthétisées par A) *Klebsiella pneumoniae* et B) *Shewanella oneidensis*, avec leur potentiel d'oxydo-réduction versus ENH à pH = 7

Ces trois méthodes de transfert extra-cellulaire d'électrons que sont le transfert direct, par pili et par l'intermédiaire de navettes ont toutes été majoritairement décrites et étudiées dans le cas de micro-organisme anodiques, autrement dit d'organismes dont le métabolisme électro-actif va consister à transmettre des électrons issus du catabolisme à une surface solide mais peuvent également être utilisées afin, non pas de donner des électrons à un solide mais d'en capter, soit dans le cas de l'électro-activité cathodique.

En effet, lorsque les mécanismes du métabolisme de l'électro-activité bactérienne sont évoqués, il est nécessaire de diviser ce métabolisme en deux sous-types : l'électro-activité anodique (le plus connu et le mieux défini), basé sur la capacité de certains micro-organismes à donner des

électrons à une surface solide et l'électro-activité cathodique (dont les structure et les voies métaboliques restent encore mal connues) qui consiste en la capacité à capter des électrons depuis ce même genre de surface.

d) Le métabolisme exo-électrogène anodique

Comme expliqué dans la partie portant sur le catabolisme en général (4. C), la respiration cellulaire se base sur l'oxydation d'un composé ce qui va générer des électrons qui seront alors utilisés pour réduire l'accepteur terminal. Dans le cas des bactéries électro-actives de type anodique, cet accepteur terminal (à l'échelle de la cellule et intermédiaire à l'échelle de la pile microbienne) pourra être une surface solide, comme une particule solide mais également une électrode si l'on se place dans l'optique de la pile microbienne.

La grande majorité des espèces bactériennes étudiées sont connues pour cette capacité à exploiter ce type de surface comme accepteur terminal d'électrons. On peut par exemple citer les deux espèces les plus connues discutées plus haut, à savoir *Geobacter sulfurreducens* et *Shewanella oneidensis* qui ont été découvertes et majoritairement étudiées pour leur électro-activité anodique.

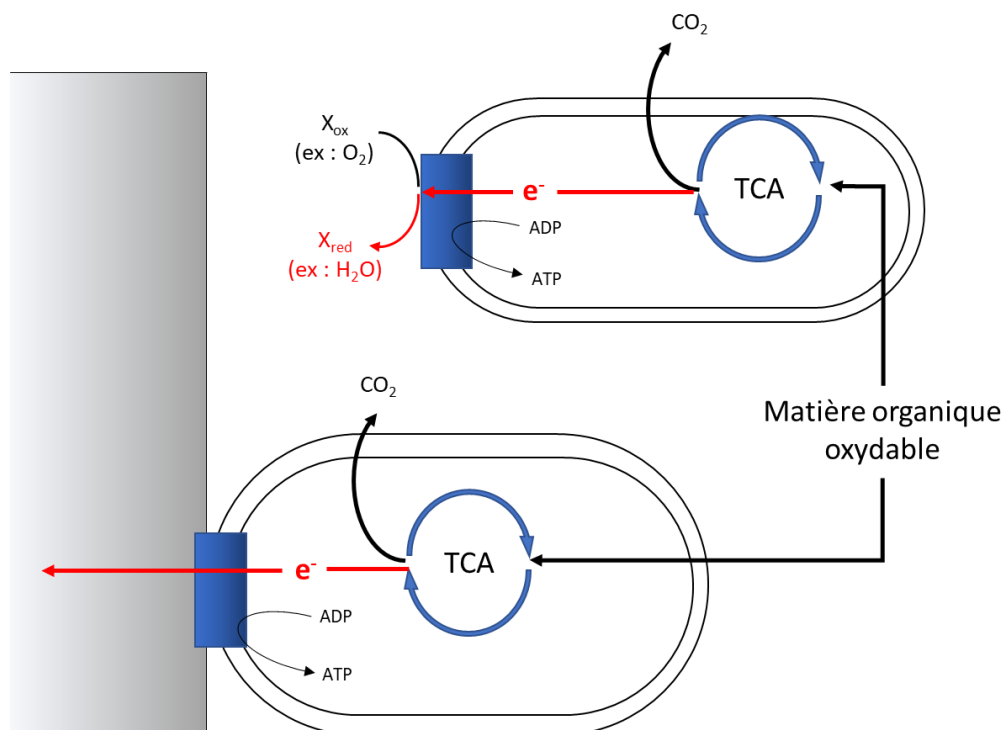


Figure 14 : Représentation schématique de la différence entre le métabolisme de la respiration cellulaire classique et une respiration électro-actives anodique où l'accepteur terminal d'électrons est une surface solide.

Néanmoins il existe un autre type de métabolisme électro-actif qui reste à ce jour encore très mal connu et dans lequel ces travaux de thèse s'inscrivent : l'électro-activité cathodique.

2) Le métabolisme exo-électrogène cathodique

Ce type de métabolisme exo-électrogène est extrêmement important à décrire car le sujet de cette thèse, à savoir la réduction bio-électrochimique des nitrates dans les eaux lagunaires, est directement lié à ce métabolisme exo-électrogène.

Le métabolisme exo-électrogène cathodique se distingue de sa version anodique par le fait qu'il consiste pour un organisme à capter des électrons depuis une surface solide plutôt que de s'en servir comme accepteur terminal. Ce type de métabolisme exo-électrogène est encore relativement mal connu mais plusieurs points en lien avec les éléments décrits précédemment méritent d'être détaillés.

En premier lieu, on peut supposer que les trois mécanismes de transmission d'électrons décrites auparavant peuvent être exploitées par les organismes afin de capter des électrons depuis une surface solide. En effet, les trois mécanismes décrits (contact direct, par nano-fils et par navettes électroniques) sont tous présents chez les espèces *Geobacter sulfurreducens* et *Shewanella oneidensis*, or ces espèces ont été décrites dans la littérature comme possédant un métabolisme électro-actif cathodique [51][52][53] en plus d'anodique.

Une des grandes interrogations concernant ce type de métabolisme exo-électrogène est le chemin métabolique suivi par les électrons captés depuis cette surface solide. Si des hypothèses existent selon les espèces étudiées [54][53][55], il n'existe pas encore de consensus clairement admis du chemin emprunté par les électrons pour une espèce définie, et ce même pour les deux espèces les plus étudiées que sont *Geobacter sulfurreducens* et *Shewanella oneidensis*.

Néanmoins, il est possible d'émettre quelques suppositions sur le rôle que peut jouer ce type de métabolismes pour la bactérie. On peut considérer raisonnablement qu'il y existe deux raisons pour un organisme de capter des électrons depuis une surface solide : la synthèse d'ATP à partir d'ADP ainsi que la néosynthèse de matière organique à partir de carbone inorganique.

La première raison, la synthèse d'ATP, est envisageable en fonction des caractéristiques thermodynamique du donneur d'électron. En effet, lorsque la surface solide est oxydée, elle l'est à un potentiel précis. Selon la valeur de ce potentiel ainsi que la nature de l'accepteur terminal d'électrons et de son propre potentiel de réduction (voir 4. a.), la différence entre les

deux peut éventuellement permettre la translocation de protons du cytoplasme vers le périplasma (dans le cas des Gram -) comme dans le cas de la respiration classique déjà décrite (4. a.). Ces protons pourront alors repasser dans le cytoplasme via l'ATP synthase et ainsi permettre la synthèse d'ATP via la force protomotrice (4. a.). Par certains aspects, l'utilisation des électrons captés par l'électro-activité cathodique pour cette synthèse d'ATP peut s'apparenter à une forme de lithotrophie, autrement dit l'utilisation d'une source d'électron de type inorganique, ici la cathode [55].

La deuxième raison pourrait cette fois-ci être d'utiliser ces électrons afin de synthétiser de la matière organique à partir de matière carbonée inorganique (CO_2 , $\text{HCO}_3^- \dots$). Cette méthode d'utilisation d'électrons s'apparente finalement à l'anabolisme des organisme chimio-autotrophes qui utilisent leur chaîne inverse d'électrons (4.d). Bien que ce métabolisme ait clairement été observé dans la littérature, les chemins métaboliques exacts restent à ce jour peu définis [56].

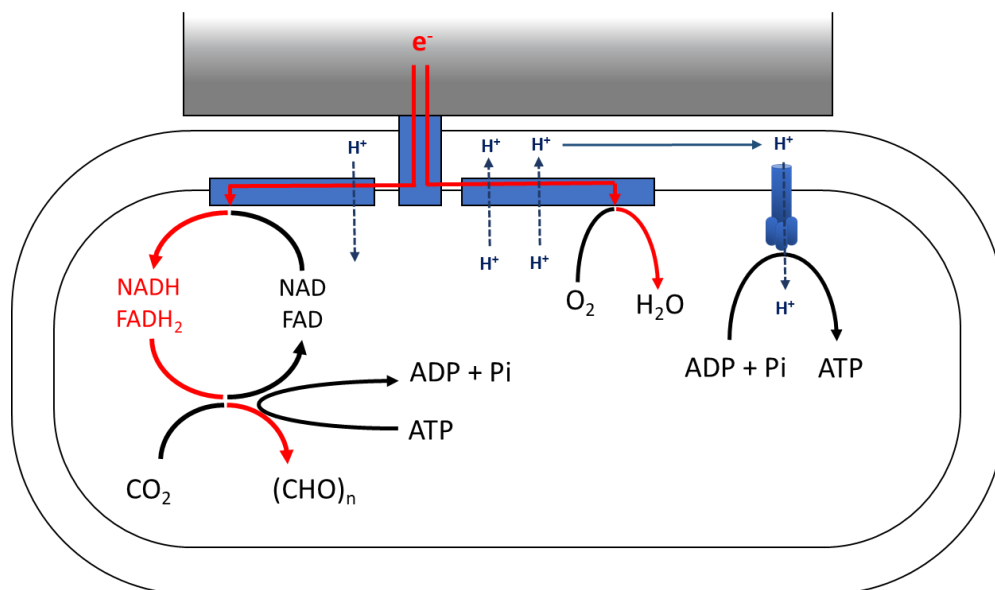


Figure 15 : Représentation du métabolisme exo-électrogène cathodique avec les deux chemins hypothétiques suivis par les électrons après captation depuis une surface solide conductrice. L'un va mener à la chaîne respiratoire classique permettant la création d'un gradient de protons afin de synthétiser de l'ATP et l'autre va mener à une chaîne respiratoire inversée permettant la régénération du NADH et du FADH_2 puis la synthèse de matière organique via des voies métaboliques spécifiques (néoglucogénèse par exemple).

Lorsque les électrons arrivant à la cathode sont captés par les micro-organismes et s'ils proviennent eux-mêmes d'une anode colonisée par des micro-organismes électro-actifs utilisant

cette dernière comme accepteur d'électrons, on désigne alors le montage sous le terme de système bio-électrochimique microbien.

3) Les systèmes bio-électrochimiques microbiens

Si la définition du terme de système bio-électrochimique microbien peut varier selon les auteurs et les sources, dans cette thèse nous concentrerons sur la définition suivante : un montage à anode et cathode où les électrons générés à l'anode le sont par le transfert d'électrons de micro-organismes électro-actifs à cette dernière et dont la réduction à la cathode est catalysée par des micro-organismes également électro-actifs.

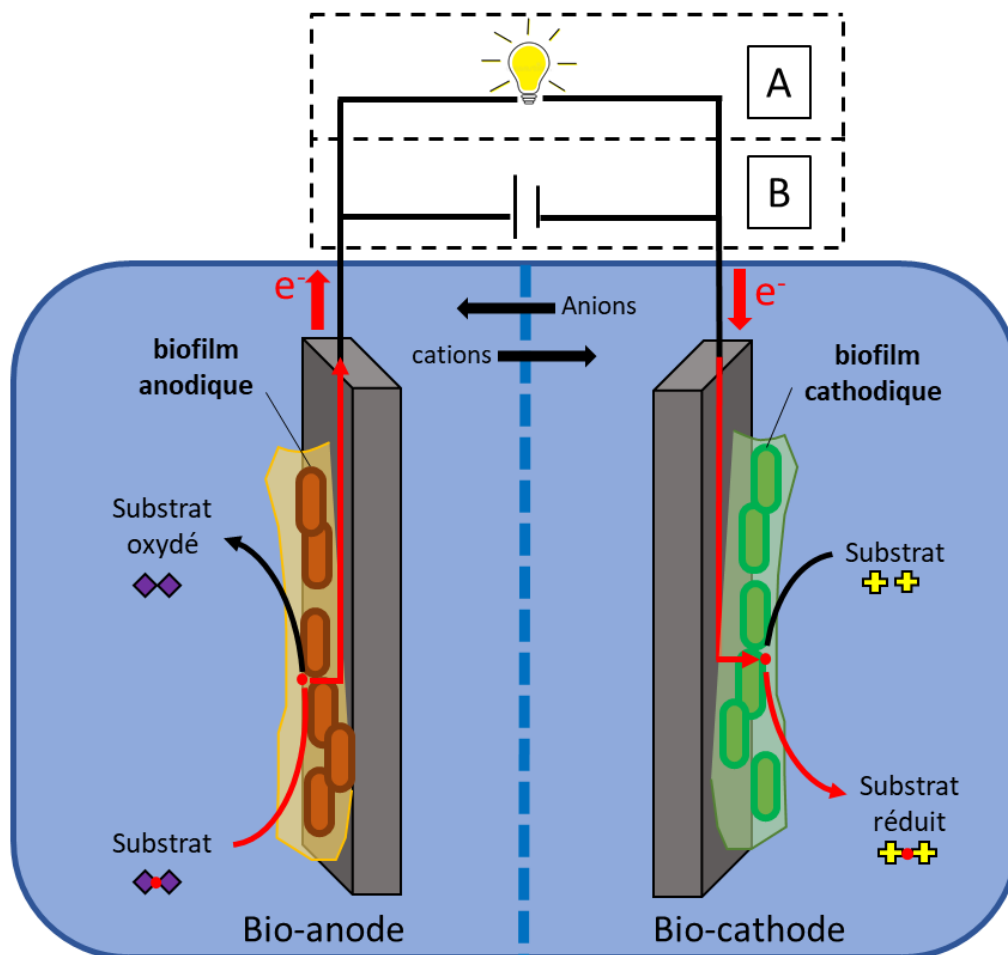


Figure 16 : Représentation schématique du principe de système bio-électrochimique microbien avec d'un côté la bio-anode où le substrat est oxydé et de l'autre la cathode où un autre substrat est réduit. Dans les deux cas les réactions sont catalysées par des biofilms bactériens ayant colonisé les électrodes. Les électrons obtenus par oxydation à l'anode seront utilisés pour la réduction à la cathode. Les systèmes bio-électrochimiques microbiens peuvent être divisés en deux types : ceux permettant de générer un courant électrique utilisable (A, pile) et ceux au contraire nécessitant l'application d'une alimentation électrique externe au montage afin que les réactions puissent avoir lieu (B, électrolyseur).

Les systèmes bio-électrochimiques microbiens ont globalement deux grands rôles : celui de générer un courant électrique et permettre la catalyse de réactions d'oxydation et/ou de réduction utiles (récupération de métaux solubilisés, dépollution).

Si l'objectif du montage est la génération de courant électrique, il est alors nécessaire que le système bio-électrochimique microbien soit une pile à combustible microbienne (PEM, Fig 16 partie A). En revanche, si la catalyse d'oxydations ou de réductions de composés spécifiques est l'unique but (comme la réduction des nitrates par exemple) on peut alors se positionner sur un montage d'électrolyse microbienne (MEC pour Microbial Electrolysis Cell) où un courant extérieur est appliqué au montage [57].

Pour savoir si une source de courant externe doit être appliquée, il faut se pencher sur la thermodynamique des réactions d'oxydation à l'anode et de réduction à la cathode.

Afin que le système bio-électrochimique microbien soit générateur de courant, il est nécessaire que le potentiel d'oxydation à l'anode soit inférieur au potentiel de réduction ayant lieu à la cathode. Ce principe est donc le même que celui de la respiration expliqué auparavant (II. 3. C.) avec un donneur d'électron oxydé à un potentiel inférieur à celui de la réduction de l'accepteur terminal.

En effet, par bien des aspects, le principe de la pile à combustible microbienne peut se voir comme une forme de respiration coopérative entre plusieurs bactéries à l'échelle d'un montage à deux électrodes colonisées par des biofilms où l'oxydation et la réduction sont accomplies par des biofilms bactériens différents localisés sur des électrodes différentes mais connectées.

A l'inverse, si le potentiel d'oxydation à l'anode est plus haut que celui de réduction à la cathode, on se retrouve dans le cas de réactions thermodynamiquement défavorables et il est nécessaire d'apporter une source de courant externe pour que le montage fonctionne. Une chose importante à noter est qu'un couple de réactions d'oxydo-réduction en théorie favorable thermodynamiquement peut parfois se révéler malgré tout défavorable cinétiquement dû à un phénomène très important en électro-chimie : la surtension.

1. Le problème de la surtension

En effet, le potentiel réel d'oxydo-réduction d'un composé (auquel on obtient un courant considéré comme significatif en fonction des objectifs) peut être influencé par de nombreuses variables, notamment la nature du catalyseur (comme par exemple une électrode ou encore une bactérie) [58], ce qui peut rendre un couple de réactions d'oxydo-réduction thermodynamiquement favorable impossible à réaliser sans apport extérieur de courant dans la pratique.

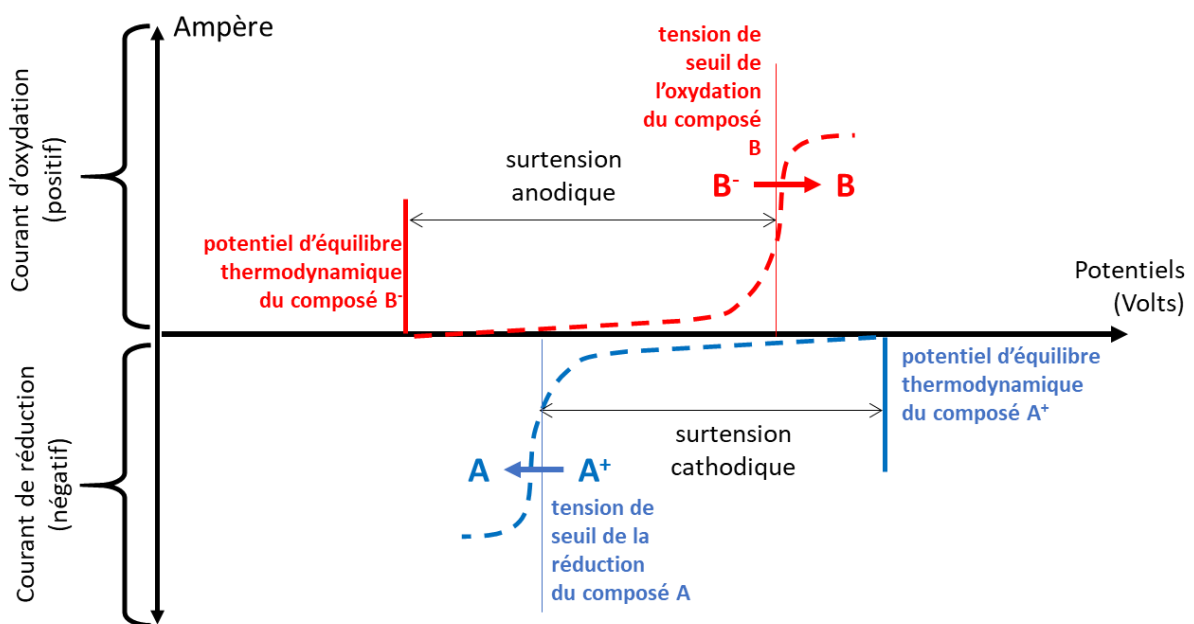


Figure 17 : Exemple d'un cas où les cinétiques d'oxydation et de réduction des deux composés A⁺ et B⁻ sont influencés par une surtension importante. Afin d'obtenir un courant d'oxydation ou de réduction considéré comme significatif, il est nécessaire d'aller jusqu'au potentiel ou tension de seuil des deux réactions. Ainsi, alors que les deux réactions sont thermodynamiquement favorables, les niveaux de surtension présents pour chacune d'elles empêcheront le passage d'un nombre significatif d'électrons (et donc du courant) du composé B⁻ au composé A⁺.

La Figure 17 donne un exemple de deux réactions d'oxydation et de réduction dont les potentiels d'équilibre thermodynamiques devraient permettre le transfert d'électrons de l'un à l'autre de manière favorable (sans apport d'énergie). Sauf que ces réactions sont soumises à des surtensions importantes, obligeant à aller jusqu'à des tensions de seuil qui rendent le transfert d'électrons du composé B au composé A défavorable et donc nécessitant un apport extérieur de courant pour qu'il ait lieu.

La valeur de cette tension de seuil dans le cas de réactions uniquement électrochimiques va dépendre notamment des électrodes sur lesquelles les composés vont s'oxyder ou se réduire. Néanmoins, dans le cas de l'oxydation de la matière organique au niveau des électrodes microbiennes (colonisées par un biofilm) utilisées au sein des systèmes bio-électrochimiques microbiens, cette surtension est surtout liée à l'énergie utilisée par la bactérie elle-même afin de transloquer des protons du cytoplasme vers le périplasma (pour les Gram -) avant de transférer les électrons à l'électrode.

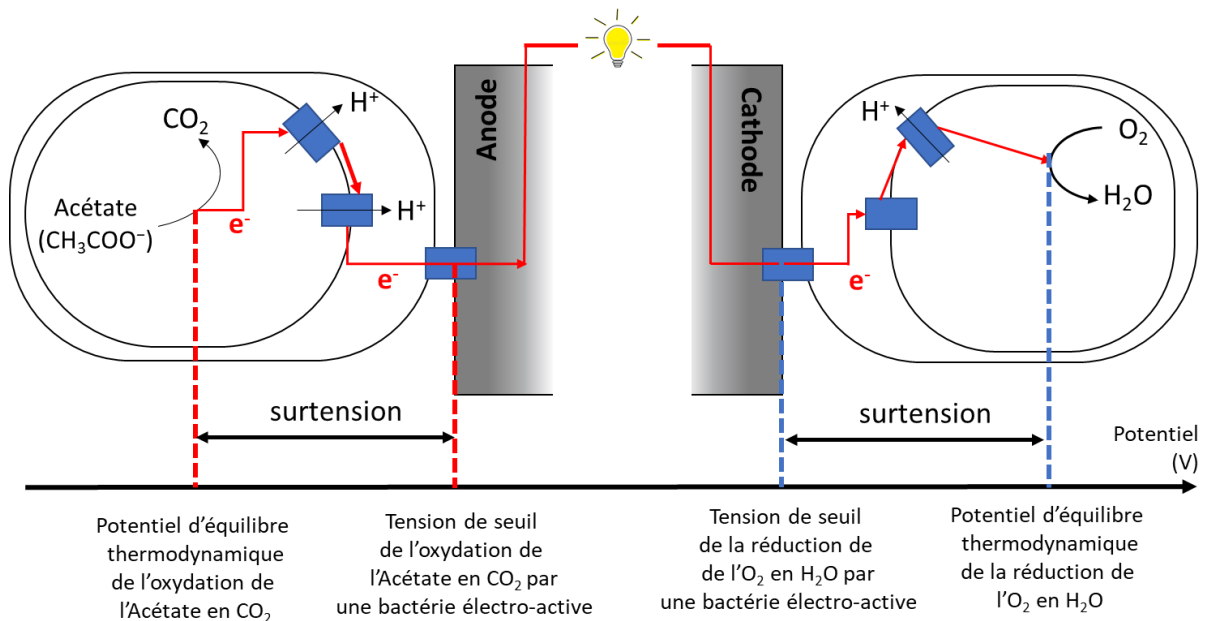


Figure 18 : Schéma expliquant le phénomène de la surtension dans le cas particulier des électrodes microbiennes. Dans cet exemple, l'oxydation de l'acétate présente à l'anode et la réduction de l'oxygène à la cathode forment un couple de réactions thermodynamiquement favorables malgré la surtension liée entre autres aux métabolismes bactériens pour les deux réactions. A noter que le potentiel d'équilibre de l'oxydation de l'acétate en CO_2 a été calculé [5] ($E^0 = -0,28 \text{ V}$ à $\text{pH} = 7$) mais que cette réaction possède énormément de réactions intermédiaires (notamment via le cycle de Krebs ou TCA).

L'autre point important à noter au sujet des piles microbiennes est la question cinétique (soit la quantité de courant et donc d'électrons circulant de l'anode vers la cathode). Comme montré sur les Figures 16 et 18, les électrons pouvant être captés à la surface de la cathode par le biofilm électro-actif proviennent directement des réactions d'oxydation ayant lieu à l'anode. De fait, dans une pile microbienne, l'une des deux électrodes est toujours limitante à partir d'une résistance externe (entre l'anode et la cathode). S'il s'agit de la cathode, c'est l'incapacité des bactéries à capter d'avantage d'électrons pour réduire un substrat qui limitera la puissance du montage. A l'inverse s'il s'agit de l'anode, c'est l'impossibilité des bactéries à oxyder

davantage de composés et de transmettre leurs électrons à l'anode qui limitera la puissance de la pile.

En effet, si la réaction désirée est une réduction cathodique (réduction des nitrates ou des perchlorates pour dépolluer ou encore réduction et donc précipitation des métaux précieux), il est essentiel d'optimiser la cinétique (le courant) des réactions d'oxydation à l'anode (augmentation de la quantité de courant et donc d'électrons générés). A l'heure actuelle les piles microbiennes (bio-anodes + bio-cathodes) fonctionnelles sont majoritairement basée sur l'oxydation de l'acétate couplée à une réduction de l'oxygène (l'accepteur terminal le plus efficace et abondant pour les bactéries) afin de générer de l'énergie. Néanmoins d'autre pistes sont étudiées, notamment l'utilisation de piles microbiennes permettant la dépollution via les bio-cathodes. C'est notamment le cas des bio-cathodes réductrices des nitrates, sujet principal de cette thèse.

4) Le cas des nitrates, nouveau défi de la bio-électrochimie microbienne

Le nitrate (NO_3^-) est un anion constitutif du cycle bio-géo-chimique de l'azote.

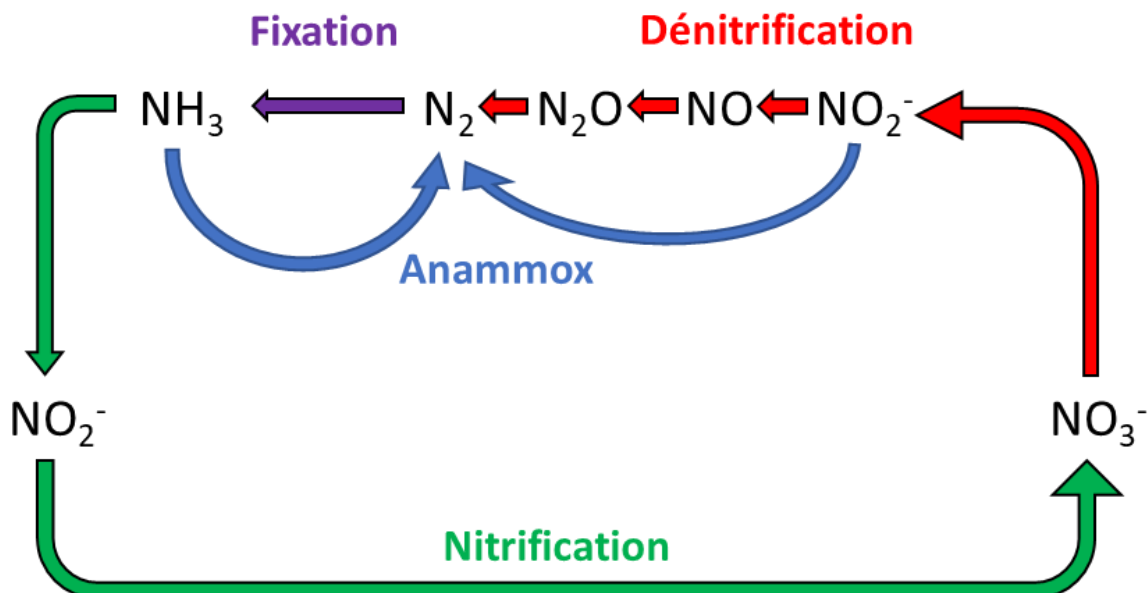


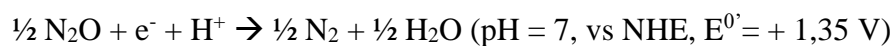
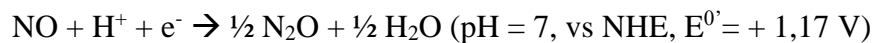
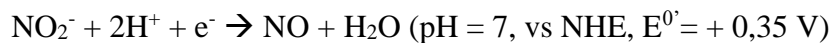
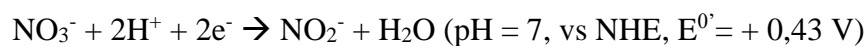
Figure 19 : Simplification du cycle bio-géo-chimique de l'azote. En rouge, l'étape de la dénitrification est celle qui concerne les travaux de cette thèse. L'objectif direct des bio-cathodes dénitrifiantes étudiées dans cette thèse est d'accroître l'efficacité de cette étape via la bio-électrochimie.

L'étape de dénitrification (en rouge, Figure 19) inclue en réalité toute une série de réactions intermédiaires entre le nitrate et le diazote. Afin de bien préciser le contexte de ces travaux de thèse, une synthèse de l'état de l'art des bio-cathodes à nitrate doit être faite avant afin de décrire le contexte environnemental et l'objectif général du projet ANR LowNitrate dans lequel thèse s'inscrit.

1. Les bio-cathodes dénitrifiantes

Comme expliqué auparavant, une bio-cathode est une électrode colonisée par un biofilm microbien capable de capter des électrons depuis la surface de cette électrode afin de réduire un composé présent dans son milieu. Ainsi, dans le cas de bio-cathodes dénitrifiantes, le composé en question s'avèrera être le nitrate (NO_3^-) qui sera alors réduit en nitrite (NO_2^-).

La découverte des bio-cathodes dénitrifiantes est extrêmement récente puisqu'elle date de 2007 avec la publication de Clauwaert et al. [59]. A partir de cette publication, de nombreuses études furent menées. En premier lieu, les potentiels standards à pH 7 de la réduction du nitrate en nitrite puis des autres réactions de réduction jusqu'au N_2 sont les suivantes [60] :



Comme montré via ces équations, le potentiel d'équilibre thermodynamique de la réduction du nitrate en nitrite est relativement élevé avec 0,42 V vs ENH à pH = 7 (on peut noter que celui de l'oxygène en eau, meilleur accepteur terminal pour les bactéries, est de 0,81 V à pH = 7 et contre ENH). Néanmoins, de nombreuses études ont mis en évidence une surtension importante lors du développement de bio-cathodes donnant une tension de seuil autour de -0,250 V vs ENH pour une incubation à pH = 7 [54][61][62][52].

D'un point de vue microbiologique, on peut noter que parmi les genres bactériens les plus souvent cités dans la recherche sur les bio-cathodes dénitrifiantes on trouve notamment les genres *Thiobacillus* [54][62], *Thauera* [63][64][65] ou encore *Pseudomonas* [66][67].

Il est également à noter qu'à ce jour, les études démontrant l'efficacité de bio-cathodes dénitrifiantes colonisées par des biofilms n'incluant qu'un seul organisme sont rares (souvent

via une culture pure comme inoculum, le tout dans un environnement contrôlé et stérile), incluant notamment les genres *Thiobacillus* [54] ou encore *Geobacter* [68] et que la majorité se base sur des biofilms mixtes (plusieurs espèces différentes) colonisant l'électrode et comportant quelques espèces dominantes [61][69][70][71][72].

En termes de performances de dénitrification pure (quantité de NO_3^- éliminée par unité de temps et de volume de milieu), il est extrêmement difficile d'apporter une estimation de l'échelle et ce pour plusieurs raisons :

- Il faut relativiser ces valeurs en fonction de la surface de l'électrode jouant le rôle de cathode (et donc de surface disponible sur laquelle les bactéries peuvent capter des électrons)
- Il est délicat de différencier la dénitrification de nature électro-chimique (à partir d'électrons captés depuis une électrode) de la dénitrification classique (via des électrons provenant de l'oxydation de matière organique par la même bactérie qui va réduire le nitrate).
- L'efficacité de la dénitrification va dépendre de la concentration initiale en nitrate. Un même pilote contenant la même communauté bactérienne aura une vitesse de dénitrification différente selon la quantité de nitrate présents dans son milieu, mais également en fonction du pH, de l'agitation, de la présence d'oxygène ou autre...

Pour cette raison, il est difficile de comparer le taux de dénitrification d'une expérience à l'autre si le montage global des expériences décrites diffère.

En ce qui concerne le type de montage lui-même (matériau utilisée pour la ou les électrodes, en flux continu ou en batch...) ils sont extrêmement variés ainsi que les types de milieux d'incubation allant du lisier [73] aux milieux synthétiques [74] en passant par différents types de sédiments [75][76]. L'une des grandes questions liées aux bio cathodes à nitrates est la présence ou l'absence des réactions des différentes étapes de ce processus. En effet, comme montré dans la Figure 4 (page 18) et dans les équations, le processus allant du nitrate au diazote atmosphérique comporte de nombreuses étapes intermédiaires.

Or, la très grande majorité des études se concentrent sur l'identification et la caractérisation (thermodynamique, cinétique et microbiologique) de la première étape de réduction du nitrate en nitrite via des électrons captés sur une électrode par un organisme électro-actif. S'il existe des résultats prouvant que la deuxième étape de la réduction des nitrites (NO_2^-) en monoxyde d'azote (NO) [70] est possible à la surface d'une électrode, on peut noter que dans certains cas, l'augmentation de l'efficacité de la réduction du nitrate par l'électro-chimie peut conduire à une

accumulation du nitrite dans le milieu [77] démontrant que les réactions suivant celle de la réduction du nitrate sont soit moins efficaces soit absentes.

Cela peut poser problème car, comme cela sera évoqué par la suite, certaines molécules intermédiaires comme le nitrite sont également considérées comme des polluants. Idéalement, une bio-cathode dénitrifiante permettrait de catalyser toutes les réactions entre le NO_3^- et le N_2 sans accumulation des composés intermédiaires.

L'autre grand enjeu des bio cathodes dénitrifiantes est le type de système bio-électrochimique dans lequel elles sont incluses : soit sous forme de d'électrolyseur microbien (avec apport extérieur d'énergie électrique) ou bien sous forme de pile microbienne à combustible où aucun apport d'énergie électrique extérieur n'est nécessaire.

Afin de pouvoir étudier la cathode de façon indépendante sans avoir à se soucier de l'anode, il est possible, en utilisant un potentiostat de passer par un montage à trois électrodes. Dans ce type de montages, la cathode est utilisée comme électrode de travail et il est possible de lui imposer un potentiel spécifique par rapport à une électrode de référence. La troisième électrode, elle, sert de contre électrode et le potentiostat va alors appliquer un potentiel à un temps t en fonction des réactions de réduction (ou d'oxydation) ayant lieu à la cathode. Par exemple, si une réduction est possible à la cathode au potentiel choisi qui lui est appliqué, alors sur la contre-électrode sera alors automatiquement appliqué un potentiel permettant l'oxydation d'un composé présent dans son milieu (par exemple l'oxydation de H_2O) permettant de fournir les électrons nécessaires à la réduction à la surface de la cathode. Ce type de montage permet surtout de se concentrer sur l'étude d'une seule électrode de travail en lui appliquant un potentiel spécifique sans avoir à se soucier de la contre-électrode.

A ce jour, les montages incluant des bio-cathodes à nitrate prennent souvent cette forme [78][74][62][54][61][79]. Cette méthode permet notamment de pouvoir à la fois fixer le potentiel de la bio-cathode à une valeur choisie en fonction de la thermodynamique de la réaction (Figure 17) tout en s'assurant que les électrons provenant de l'anode vers la cathode ne soient jamais limitants. Cette approche, ayant avant tout une utilité dans le domaine de la recherche fondamentale, reste plus limitée pour une potentielle utilisation appliquée à la dénitrification. Il existe néanmoins quelques études dans lesquelles le système bio-électrochimique possède une bio-cathode à nitrate et n'ayant pas besoin d'apport extérieur en énergie [72][73] mais cette approche reste encore minoritaire et relativement récente.

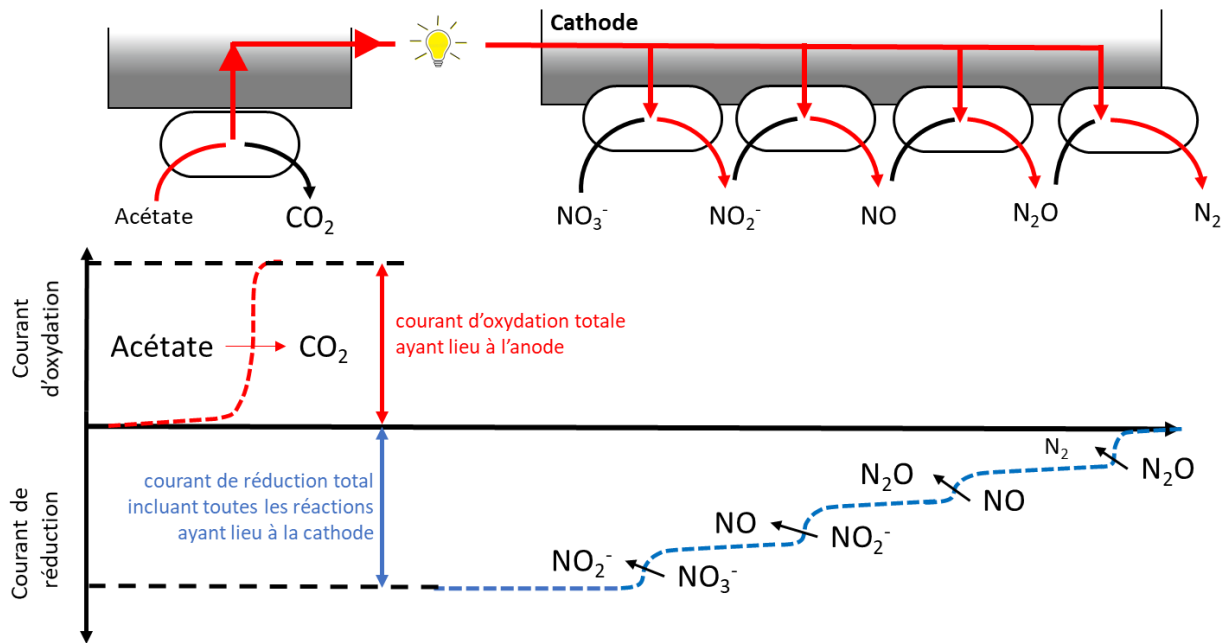


Figure 20 : Représentation schématique d'une pile à combustible microbienne dénitrifiante considérée comme idéale. Les courants d'oxydation et de réduction montrés sur la figure sont obtenus via des études sur l'anode et la cathode de façon séparée, couplée à une contre-électrode. Ce montage est considéré comme idéal aussi bien d'un point de vue thermodynamique avec un potentiel d'oxydation inférieur aux potentiels de réduction (surtension comprise) que cinétique avec un possible courant d'oxydation à l'anode supérieur à celui de réduction à la cathode, autrement dit plus d'électrons pouvant être potentiellement fournis par les bactéries à l'anode que d'électrons consommés à la cathode pour les étapes de réduction de la dénitrification.

L'approche de la dénitrification via un montage sous forme de pile à combustible (Figure 20) est la plus exploitable en termes d'application car celui-ci est théoriquement autonome, ne nécessite pas d'apport d'énergie électrique. Cette question des systèmes bio-électrochimiques appliqués à la dénitrification est aujourd'hui un point montant de la recherche avec de plus en plus d'études ayant des domaines d'application toujours plus spécifiques comme par exemple la dénitrification des milieux d'aquaculture [80], des nappes phréatiques [81] ou encore l'utilisation de différents combustibles ou milieux au sein de ces montages [73][79].

De fait, les nitrates et les composés azotés en général représentent un problème, notamment d'un point de vue environnemental et c'est dans ce contexte que s'inscrit cette thèse.

2. La pollution en nitrate

La pollution en nitrate est l'un des grands enjeux environnementaux de notre époque. De fait lors du traitement des eaux usées, l'élimination de ces composés est fondamentale car l'azote, notamment sous la forme de nitrate (NO_3^-) et de nitrite (NO_2^-) peut causer de nombreux dérèglements écologiques, notamment la prolifération d'algues vertes [82] mais peut également se montrer très toxique pour certains organismes vivant dans ces écosystèmes pollués [83], et ce à des concentrations très faibles (dès $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$ pour certains organismes, soit 20 fois moins que la limite autorisée pour l'eau potable en Europe).

A cela s'ajoute la problématique sanitaire de la pollution en nitrate. Ce point reste très largement débattu au sein de la communauté médicale et souvent les études publiées sont contradictoires. Certaines d'entre elles affirment néanmoins que la consommation par l'homme d'eau très concentrée en nitrate peut causer de graves problèmes de santé (notamment au niveau de la thyroïde [84][85]).

Dans le cas des eaux domestiques et industrielles, l'élimination des composés azotés se fait dans les stations d'épuration avant que ces eaux ne soient relarguées dans l'environnement (Figure 21). La dépollution en azote dans les stations d'épuration est un phénomène bien maîtrisé et basé sur des processus microbiologiques permettant la transformation de l'azote arrivant surtout sous forme organique (notamment sous forme de bases azotées et d'acides aminés) en composés inorganiques (comme le nitrate et le nitrite) jusqu'au diazote (N_2) qui sera libéré dans l'atmosphère.

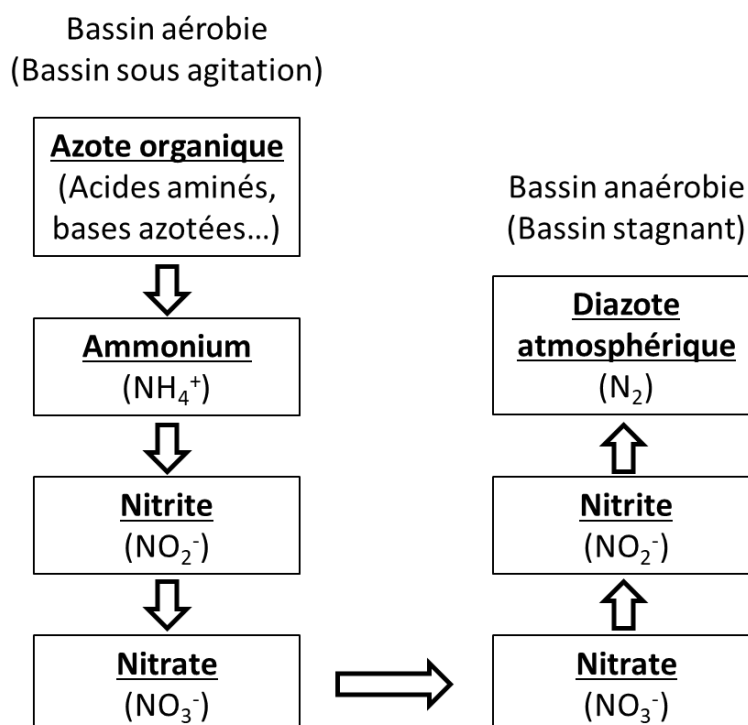


Figure 21 : Schéma simplifié du fonctionnement de la dépollution en composés azotés des eaux usées dans les bassins des stations d'épuration. Chacune des réactions sont catalysées via les métabolismes de différentes bactéries présentes dans les bassins de rétentions.

Néanmoins, ce problème de pollution n'est pas uniquement lié au traitement des eaux usées dans les stations d'épuration. En effet, face à une agriculture intensive de plus en plus présente dans les pays développés, l'utilisation des fertilisants azotés est devenu un outil incontournable dans tous les types d'agriculture intensive, incluant l'agriculture biologique (tous les fertilisants azotés ne sont pas classés comme des pesticides). Cette augmentation de l'utilisation de fertilisants azotés est liée à l'invention et l'industrialisation durant le XX^e siècle du procédé Haber permettant la synthèse d'ammoniac (NH₃) à partir de diazote atmosphérique (N₂) et de dihydrogène synthétique (H₂). Ce procédé a permis, via cet ammoniac, la production massive d'engrais synthétiques azotés ayant mené notamment à un phénomène de transformation de l'agriculture à l'échelle mondiale surnommée « la révolution verte ». Malheureusement, l'utilisation massive de ces engrais a eu pour effet une pollution des eaux naturelles par des composés azotés provenant de ces méthodes agricoles intensives.

Pour certains pays, la pollution des eaux naturelles (lacs et rivières) ainsi que souterraines en composés azotés est une problématique centrale [86]. L'un des gros défis de ce type de pollution est de pouvoir dépolluer ces eaux avant qu'elles ne s'accumulent dans la nature. En effet, contrairement aux eaux domestiques qui passent par les stations d'épuration, il est souvent

impossible de capter les eaux polluées d'origine agricole avant qu'elles ne retournent dans l'environnement.

Lors des processus d'épandage agricole, les eaux chargés en composés chimiques, qu'il s'agisse de composés azotés, phosphatés ou de pesticides vont ruisseler vers les lacs, ruisseaux, rivières ou l'océan dans le cas des exploitations côtières. Ainsi la seule méthode possible pour éliminer ces composés chimiques est de se placer directement au sein des environnements naturels où ces eaux lagunaires s'accumulent. Cela pose un certain nombre de problématiques car contrairement à une station d'épuration, l'environnement physico-chimique ainsi que biologique n'est absolument pas contrôlé. A cela s'ajoute le fait que les moyens à disposition sont plus limités car la préservation de l'environnement naturel où aura lieu cette dépollution est une condition à respecter. Actuellement les concentrations autorisées sont de l'ordre plusieurs dizaines de mg.L^{-1} pour l'eau potable (10 mg.L^{-1} pour les Etats-Unis et 50 mg.L^{-1} en Europe).

Le cas particulier sur lequel cette thèse se concentre est la dépollution des eaux lagunaires chargées en composés azotés s'accumulant dans les bassins de rétention (localisés près d'exploitations agricoles) avant de se diriger vers les aquifères. Ces zones sont composées de sols poreux permettant la descente des eaux vers les nappes souterraines dont certaines représentent la principale source d'eau potable domestique (Figure 22).

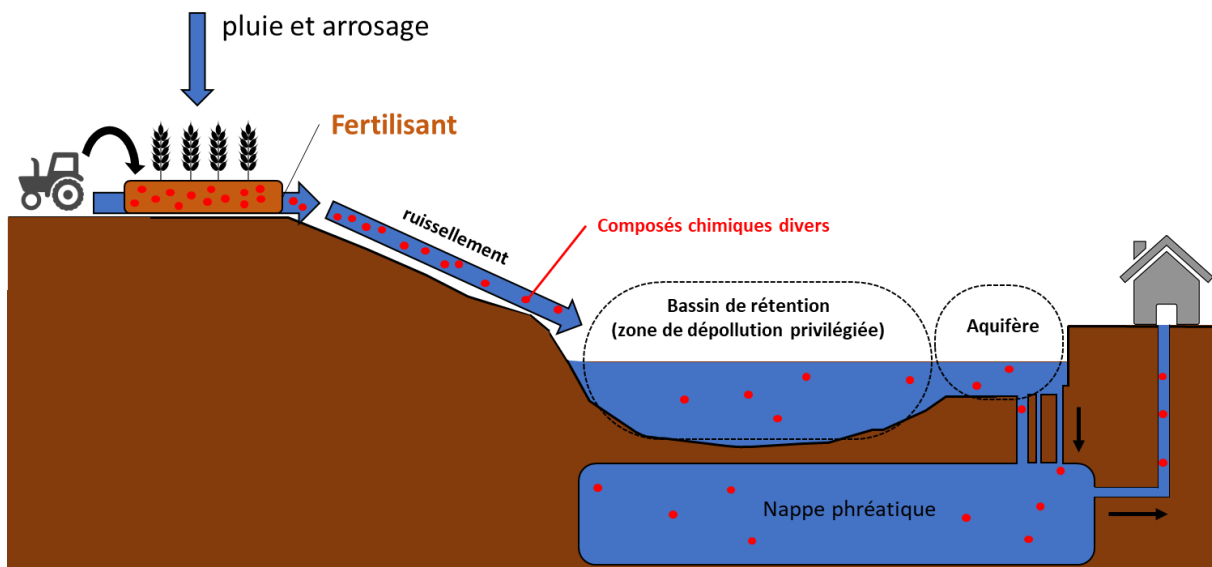


Figure 22 : Schéma du contexte environnemental dans lequel cette thèse s'inscrit. Le but est la dénitrification des eaux naturelles au niveau des bassins de rétention via des systèmes bio-électrochimiques avant leur passage dans les nappes phréatiques.

Afin de permettre cette dénitrification améliorée via la bio-électrochimie, les bio-cathodes à nitrate sont une technologie prometteuse pour plusieurs raisons :

- Si l'on parvient à développer un système bio-électrochimique dénitrifiant de type pile à combustible avec à l'anode l'oxydation de la matière organique naturellement présente dans les sédiments des bassins de rétention, le système est alors autonome et ne nécessite pas d'apport en énergie.
- Comme la catalyse de la dénitrification est pratiquée par les bactéries présentes dans le milieu avec pour seul ajout des électrodes, l'environnement est préservé.
- Les capacités d'adaptation des bactéries offre une bonne résilience du système face aux changements environnementaux (fortes chaleurs en été, changement de pH, force de cisaillement) par rapport à d'autres méthodes.

Dans le contexte de la dépollution en nitrate de ces eaux de rétentions, le plus grand avantage des systèmes bio-électrochimiques est probablement leur capacité à délocaliser l'endroit où a lieu l'oxydation de la matière organique et celui où a lieu la réduction des nitrates. Dans ces bassins de rétention, la dénitrification classique a majoritairement lieu au niveau de l'interface entre l'eau (où sont localisés les nitrates à réduire) et les sédiments (où se trouve la matière organique oxydable).

En effet, il s'avère que les nitrates pénètrent difficilement les sédiments, et que passé une certaine profondeur (de l'ordre du cm), les concentrations en nitrate s'effondrent pour arriver à une valeur quasiment nulle [87][88][89][90]. Or, dans le cas de la dénitrification « classique » (de nature non électro-chimique), la bactérie qui va oxyder la matière organique va généralement également être celle qui va utiliser le nitrate comme accepteur terminal d'électrons. Ainsi, si l'on prend en compte la matière organique totale, seule celle se trouvant à l'interface avec l'eau peut servir comme donneur d'électrons pour la réduction du nitrate, celle localisée plus en profondeur est consommée via d'autres métabolismes (comme par exemple la méthanogenèse).

Les systèmes bio-électrochimiques, via une séparation de l'étape d'oxydation de la matière organique et celle de la réduction du nitrate par deux bactéries différentes pourrait potentiellement permettre d'exploiter la matière organique profonde et donc non utilisée via la dénitrification « classique », objectif du projet LowNitrate.

3. Le projet LowNitrate

Cette thèse s'inscrit dans un projet plus global nommé LowNitrate et financé par l'Agence National de la Recherche. Impliquant plusieurs équipes de recherche (à Rennes, Nancy, Paris et Toulouse) ce projet cherche à exploiter un système spécifique surnommé « Snorkel » ou « Tuba » bioélectrochimique. Mis au point en 2011 [91] par une équipe du LGC (Laboratoire de Génie Chimique) de Toulouse (également impliquée dans le projet LowNitrate), le snorkel est un système qui se caractérise par la présence d'une unique électrode jouant à la fois le rôle de l'anode à un pôle en court-circuit avec celui de la cathode à l'autre pôle. L'un des avantages est que ces deux pôles peuvent se trouver dans des environnements physico-chimiques différents favorisant tel ou tel type de réactions de la part des bactéries électro-actives colonisant localement l'électrode.

Anecdote intéressante, bien que le « snorkel » n'est pas été bâti par biomimétisme à l'origine, son principe se rapproche beaucoup d'un type de bactérie surnommée « cable bacteria » découverte presque en même temps que l'invention du « snorkel » [92].

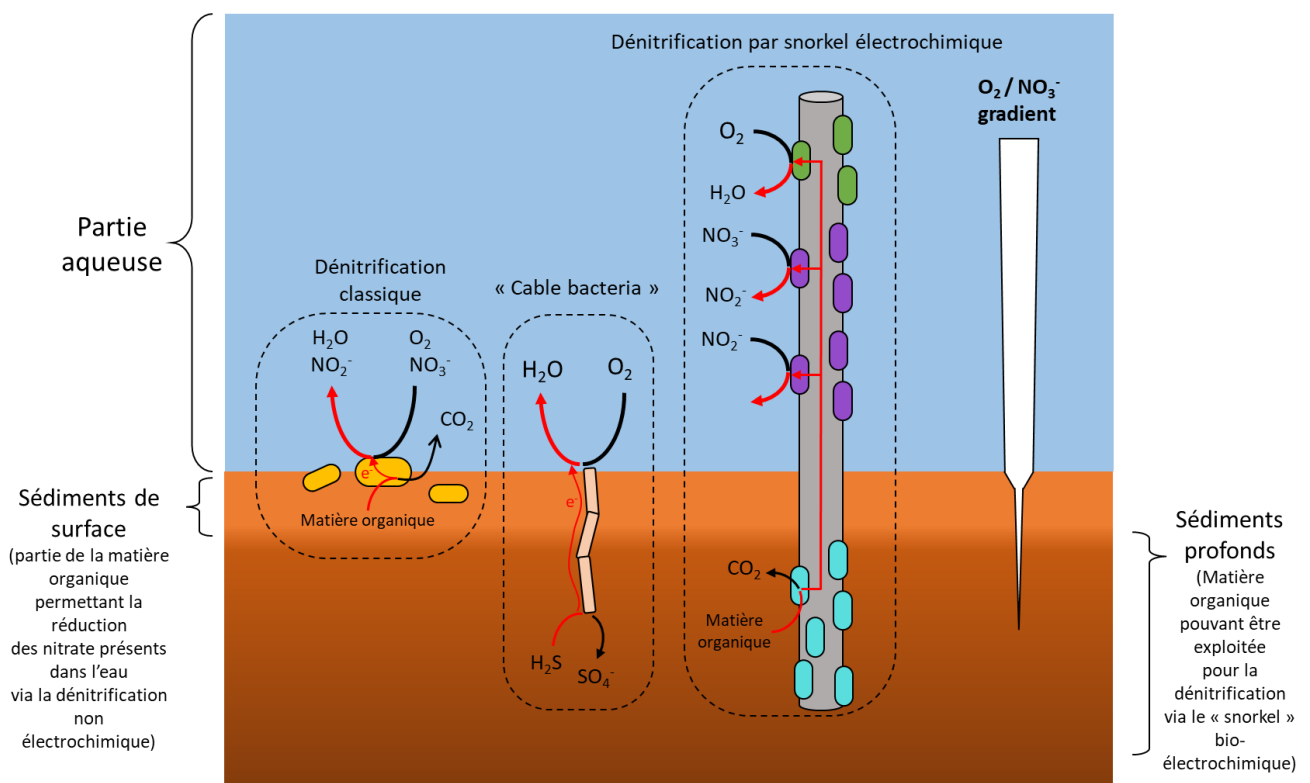


Figure 23 : Schéma représentant l'objectif du projet LowNitrate : la mise au point d'un système bioélectrochimique en court-circuit permettant la dénitrification via l'oxydation de la matière organique localisée plus en profondeur que celle servant à une dénitrification dite classique.

L'une des caractéristiques importantes du « snorkel » est qu'il s'agit d'un système bio-électrochimique en court-circuit. Cela signifie qu'entre la partie cathodique où les réactions de réduction ont lieu et la partie anodique où les réactions d'oxydation ont lieu, il n'y a qu'une très faible résistance (quelques Ohms à quelques centaines de Ohms) rendant de la résistance de l'électrolyte limitante (dans notre cas l'eau de Rampillon). Comme montré sur la Figure 23, le pôle cathodique doit être localisé là où sont les nitrates à réduire, autrement dit dans l'eau (ou à la surface des sédiments). A l'inverse, le pôle anodique sera idéalement localisé là où la matière organique est présente et où elle n'est pas déjà utilisée par les bactéries pour dénitrifier les eaux.

L'un des grands atouts du projet est la mise à disposition d'une zone humide artificielle servant de bassin de rétention pour les eaux provenant des zones agricoles se trouvant à proximité (Figure 24). Ce bassin artificiel a commencé à être mis au point par une équipe de l'INRAe (à l'époque l'IRSTEA d'Antony) en 2005 [93]. Ce bassin a été créé afin d'étudier les conséquences du drainage agricole sur l'environnement en étudiant la teneur en pesticides, nitrates et autres composés chimiques présents dans les eaux du bassin. Un suivi régulier est fait et permet de lier les pratiques agricoles avec les pics de pollution de l'eau [94]. Ce bassin est destiné à accueillir tout prototype d'électrodes dénitrifiantes développées lors du projet LowNitrate afin de vérifier son efficacité en milieu naturel et non contrôlé.



Figure 24 : Photo aérienne du bassin artificiel de Rampillon (Seine et Marne), devant servir comme milieu d'incubation test pour un prototype de système bio-électrochimique dénitrifiant en fin de projet.

Afin que le projet puisse atteindre ses objectifs, plusieurs conditions doivent être réunies :

- Il est nécessaire que le système soit autonome, autrement dit qu'il ne demande pas d'entretien particulier. Cela sous-entend à la fois que l'électrode ne se détériore pas au cours du temps tout en conservant son efficacité.
- Aucune source d'énergie extérieure ne doit être nécessaire à son fonctionnement. Cela implique que l'on se place dans le cas d'une pile à combustible microbienne en court-circuit et donc que le couple des deux réactions à l'anode et à la cathode soit thermodynamiquement favorable.
- Le système doit supporter les conditions environnementales présentes au cours de l'année (froid en hiver, précipitation et agitation en automne...) et rester fonctionnel.

Comme expliqué précédemment, les travaux présentés et décrits dans cette thèse s'inscrivent directement dans le cadre de ce projet avec un accent mis par notre équipe (ISCR) sur la caractérisation et l'étude du pôle cathodique réducteur du nitrate au sein des sédiments.

4. Intégration des travaux de cette thèse au sein du projet et des objectifs du projet LowNitrate

Cette thèse va majoritairement se concentrer sur l'étude et la caractérisation électro-chimique et microbiologique du pôle cathodique. Dans un premier temps, le cas complexe de la réduction bio-électrochimique de l'oxygène en compétition avec celle des nitrates sera étudiée afin de comprendre comment ces deux métabolismes peuvent s'influencer l'un l'autre à la surface d'une même électrode.

Sera ensuite évoqué la relation importante entre la présence d'oxygène et l'efficacité de la dénitrification via le montage de pilotes incluant une zone aqueuse n'étant pas en contact direct avec l'atmosphère.

En troisième partie, une première tentative de développement de bio-cathodes permettant réduction bio-électrochimique du nitrate dans un milieu simulant celui des milieux naturels aquifères sera détaillée et où les résultats et problèmes rencontrés seront expliqués.

La quatrième et dernière partie sera dans la continuation directe des trois précédentes via une tentative d'optimisation du montage par l'intermédiaire de la mise au point d'une version améliorée couplée avec une tentative de compréhension de l'impact de la polarisation sur les caractéristiques de la bio-cathodes.

V) Références

- [1] S. Sevda, T.R. Sreekishnan, N. Pous, S. Puig, D. Pant, Bioelectroremediation of perchlorate and nitrate contaminated water: A review, *Bioresour. Technol.* 255 (2018) 331–339. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.02.005>.
- [2] Potter, Electrical effects accompanying the decomposition of organic compounds, *Proc. R. Soc. London. Ser. B, Contain. Pap. a Biol. Character.* 84 (1911) 260–276. <https://doi.org/10.1098/rspb.1911.0073>.
- [3] A. Blanco, G. Blanco, Metabolism, in: *Med. Biochem.*, Elsevier, 2017: pp. 275–281. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803550-4.00013-6>.
- [4] P. Bhunia, Fundamentals of Biological Treatment, in: *Compr. Water Qual. Purif.*, Elsevier, 2014: pp. 47–73. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382182-9.00048-7>.
- [5] J.M. Willey, L.M. Sherwood, C.J. Woolverton, Catabolism: Energy Release and Conservation, in: McGraw-Hill Education (Ed.), *Prescott's Microbiol.*, 9th Editio, 2011: pp. 228–287. <http://books.google.com/books?id=qdbKKAAACAAJ&pgis=1>.
- [6] F. Kracke, I. Vassilev, J.O. Krömer, Microbial electron transport and energy conservation - The foundation for optimizing bioelectrochemical systems, *Front. Microbiol.* 6 (2015). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00575>.
- [7] G. Uden, J. Bongaerts, Alternative respiratory pathways of *Escherichia coli*: energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors, *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1320 (1997) 217–234. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(97\)00034-0](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(97)00034-0).
- [8] W.J. Ingledew, R.K. Poole, The respiratory chains of *Escherichia coli*., *Microbiol. Rev.* 48 (1984) 222–71. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3045516>.
- [9] V. Stewart, Nitrate respiration in relation to facultative metabolism in enterobacteria., *Microbiol. Rev.* 52 (1988) 190–232. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3045516>.
- [10] L.L. Yap, M.T. Lin, H. Ouyang, R.I. Samoilova, S.A. Dikanov, R.B. Gennis, The quinone-binding sites of the cytochrome *bo₃* ubiquinol oxidase from *Escherichia coli*, *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1797 (2010) 1924–1932.

- <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2010.04.011>.
- [11] J.R. Treberg, M.D. Brand, A Model of the Proton Translocation Mechanism of Complex I, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 17579–17584.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M111.227751>.
- [12] M. Nakanishi-Matsui, M. Sekiya, M. Futai, ATP synthase from *Escherichia coli* : Mechanism of rotational catalysis, and inhibition with the ϵ subunit and phytopolyphenols, *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1857 (2016) 129–140.
<https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2015.11.005>.
- [13] S. Deguchi, H. Shimoshige, M. Tsudome, S. -a. Mukai, R.W. Corkery, S. Ito, K. Horikoshi, Microbial growth at hyperaccelerations up to 403,627 x g, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108 (2011) 7997–8002. <https://doi.org/10.1073/pnas.1018027108>.
- [14] T.O. Strohm, B. Griffin, W.G. Zumft, B. Schink, Growth Yields in Bacterial Denitrification and Nitrate Ammonification, *Appl. Environ. Microbiol.* 73 (2007) 1420–1424. <https://doi.org/10.1128/AEM.02508-06>.
- [15] S.J. Ferguson, Denitrification and its control, *Antonie Van Leeuwenhoek.* 66 (1994) 89–110. <https://doi.org/10.1007/BF00871634>.
- [16] T. Friedrich, D.K. Dekovic, S. Burschel, Assembly of the *Escherichia coli* NADH:ubiquinone oxidoreductase (respiratory complex I), *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1857 (2016) 214–223. <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2015.12.004>.
- [17] D.G. Nicholls, S.J. Ferguson, Respiratory Chains, in: *Bioenergetics*, Elsevier, 2013: pp. 91–157. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-388425-1.00005-1>.
- [18] P.C. Hinkle, R.A. Butow, E. Racker, B. Chance, Partial Resolution of the Enzymes Catalyzing Oxidative Phosphorylation, *J. Biol. Chem.* 242 (1967) 5169–5173.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)99410-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)99410-X).
- [19] E.L. Robb, A.R. Hall, T.A. Prime, S. Eaton, M. Szibor, C. Viscomi, A.M. James, M.P. Murphy, Control of mitochondrial superoxide production by reverse electron transport at complex I, *J. Biol. Chem.* 293 (2018) 9869–9879.
<https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.003647>.

- [20] V. Raimondi, F. Ciccarese, V. Ciminale, Oncogenic pathways and the electron transport chain: a dangerROS liaison, *Br. J. Cancer*. 122 (2020) 168–181. <https://doi.org/10.1038/s41416-019-0651-y>.
- [21] S.J. Ferguson, W.J. Ingledew, Energetic problems faced by micro-organisms growing or surviving on parsimonious energy sources and at acidic pH: I. *Acidithiobacillus ferrooxidans* as a paradigm, *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1777 (2008) 1471–1479. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2008.08.012>.
- [22] D.G. Nicholls, S.J. Ferguson, Respiratory Chains, in: *Bioenergetics*, Elsevier, 2013: pp. 91–157. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-388425-1.00005-1>.
- [23] Y.D. Yilmazel, X. Zhu, K.-Y. Kim, D.E. Holmes, B.E. Logan, Electrical current generation in microbial electrolysis cells by hyperthermophilic archaea *Ferroglobus placidus* and *Geoglobus ahangari*, *Bioelectrochemistry*. 119 (2018) 142–149. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2017.09.012>.
- [24] M.S. Dodd, D. Papineau, T. Grenne, J.F. Slack, M. Rittner, F. Pirajno, J. O’Neil, C.T.S. Little, Evidence for early life in Earth’s oldest hydrothermal vent precipitates, *Nature*. 543 (2017) 60–64. <https://doi.org/10.1038/nature21377>.
- [25] N. Kitadai, R. Nakamura, M. Yamamoto, K. Takai, N. Yoshida, Y. Oono, Metals likely promoted protometabolism in early ocean alkaline hydrothermal systems, *Sci. Adv.* 5 (2019) eaav7848. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aav7848>.
- [26] C. Koch, F. Harnisch, Is there a Specific Ecological Niche for Electroactive Microorganisms?, *ChemElectroChem*. 3 (2016) 1282–1295. <https://doi.org/10.1002/celec.201600079>.
- [27] B.E. Logan, R. Rossi, A. Ragab, P.E. Saikaly, Electroactive microorganisms in bioelectrochemical systems, *Nat. Rev. Microbiol.* 17 (2019) 307–319. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0173-x>.
- [28] L. Shi, T.C. Squier, J.M. Zachara, J.K. Fredrickson, Respiration of metal (hydr)oxides by *Shewanella* and *Geobacter* : a key role for multihaem c -type cytochromes, *Mol. Microbiol.* 65 (2007) 12–20. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05783.x>.

- [29] Y. Yang, M. Xu, J. Guo, G. Sun, Bacterial extracellular electron transfer in bioelectrochemical systems, *Process Biochem.* 47 (2012) 1707–1714. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.07.032>.
- [30] A. Kumar, L.H.-H. Hsu, P. Kavanagh, F. Barrière, P.N.L. Lens, L. Lapinsonnière, J.H. Lienhard V, U. Schröder, X. Jiang, D. Leech, The ins and outs of microorganism–electrode electron transfer reactions, *Nat. Rev. Chem.* 1 (2017) 0024. <https://doi.org/10.1038/s41570-017-0024>.
- [31] J. Seidel, M. Hoffmann, K.E. Ellis, A. Seidel, T. Spatzal, S. Gerhardt, S.J. Elliott, O. Einsle, MacA is a Second Cytochrome c Peroxidase of *Geobacter sulfurreducens*, *Biochemistry.* 51 (2012) 2747–2756. <https://doi.org/10.1021/bi300249u>.
- [32] P.C. Portela, T.M. Fernandes, J.M. Dantas, M.R. Ferreira, C.A. Salgueiro, Biochemical and functional insights on the triheme cytochrome PpcA from *Geobacter metallireducens*, *Arch. Biochem. Biophys.* 644 (2018) 8–16. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2018.02.017>.
- [33] C. Schwalb, S.K. Chapman, G.A. Reid, The Tetraheme Cytochrome CymA Is Required for Anaerobic Respiration with Dimethyl Sulfoxide and Nitrite in *Shewanella oneidensis* †, *Biochemistry.* 42 (2003) 9491–9497. <https://doi.org/10.1021/bi034456f>.
- [34] S.J. Marritt, T.G. Lowe, J. Bye, D.G.G. McMillan, L. Shi, J. Fredrickson, J. Zachara, D.J. Richardson, M.R. Cheesman, L.J.C. Jeuken, J.N. Butt, A functional description of CymA, an electron-transfer hub supporting anaerobic respiratory flexibility in *Shewanella*, *Biochem. J.* 444 (2012) 465–474. <https://doi.org/10.1042/BJ20120197>.
- [35] G. Reguera, K.D. McCarthy, T. Mehta, J.S. Nicoll, M.T. Tuominen, D.R. Lovley, Extracellular electron transfer via microbial nanowires, *Nature.* 435 (2005) 1098–1101. <https://doi.org/10.1038/nature03661>.
- [36] Y.A. Gorby, S. Yanina, J.S. McLean, K.M. Rosso, D. Moyles, A. Dohnalkova, T.J. Beveridge, I.S. Chang, B.H. Kim, K.S. Kim, D.E. Culley, S.B. Reed, M.F. Romine, D.A. Saffarini, E.A. Hill, L. Shi, D.A. Elias, D.W. Kennedy, G. Pinchuk, K. Watanabe, S. Ishii, B. Logan, K.H. Nealson, J.K. Fredrickson, Electrically conductive bacterial nanowires produced by *Shewanella oneidensis* strain MR-1 and other microorganisms, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103 (2006) 11358–11363.

<https://doi.org/10.1073/pnas.0604517103>.

- [37] S. Pirbadian, S.E. Barchinger, K.M. Leung, H.S. Byun, Y. Jangir, R.A. Bouhenni, S.B. Reed, M.F. Romine, D.A. Saffarini, L. Shi, Y.A. Gorby, J.H. Golbeck, M.Y. El-Naggar, *Shewanella oneidensis* MR-1 nanowires are outer membrane and periplasmic extensions of the extracellular electron transport components, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111 (2014) 12883–12888. <https://doi.org/10.1073/pnas.1410551111>.
- [38] K.H. Nealson, A.R. Rowe, Electromicrobiology: realities, grand challenges, goals and predictions, *Microb. Biotechnol.* 9 (2016) 595–600. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12400>.
- [39] L. Craig, K.T. Forest, B. Maier, Type IV pili: dynamics, biophysics and functional consequences, *Nat. Rev. Microbiol.* 17 (2019) 429–440. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0195-4>.
- [40] M.S. Strom, S. Lory, Structure-Function and Biogenesis of the Type Iv Pili, *Annu. Rev. Microbiol.* 47 (1993) 565–596. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.47.100193.003025>.
- [41] F. Wang, Y. Gu, J.P. O’Brien, S.M. Yi, S.E. Yalcin, V. Srikanth, C. Shen, D. Vu, N.L. Ing, A.I. Hochbaum, E.H. Egelman, N.S. Malvankar, Structure of Microbial Nanowires Reveals Stacked Hemes that Transport Electrons over Micrometers, *Cell.* 177 (2019) 361-369.e10. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.03.029>.
- [42] C. Leang, X. Qian, T. Mester, D.R. Lovley, Alignment of the c-Type Cytochrome OmcS along Pili of *Geobacter sulfurreducens*, *Appl. Environ. Microbiol.* 76 (2010) 4080–4084. <https://doi.org/10.1128/AEM.00023-10>.
- [43] R.J. Steidl, S. Lampa-Pastirk, G. Reguera, Mechanistic stratification in electroactive biofilms of *Geobacter sulfurreducens* mediated by pilus nanowires, *Nat. Commun.* 7 (2016) 12217. <https://doi.org/10.1038/ncomms12217>.
- [44] D.R. Lovley, D.J.F. Walker, *Geobacter* Protein Nanowires, *Front. Microbiol.* 10 (2019). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02078>.
- [45] N.R. Glasser, S.H. Saunders, D.K. Newman, The Colorful World of Extracellular

- Electron Shuttles, *Annu. Rev. Microbiol.* 71 (2017) 731–751.
<https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090816-093913>.
- [46] Y. Suhara, A. Wada, Y. Tachibana, M. Watanabe, K. Nakamura, K. Nakagawa, T. Okano, Structure–activity relationships in the conversion of vitamin K analogues into menaquinone-4. Substrates essential to the synthesis of menaquinone-4 in cultured human cell lines, *Bioorg. Med. Chem.* 18 (2010) 3116–3124.
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2010.03.035>.
- [47] J.L. Bolton, G.R.J. Thatcher, Potential Mechanisms of Estrogen Quinone Carcinogenesis, *Chem. Res. Toxicol.* 21 (2008) 93–101.
<https://doi.org/10.1021/tx700191p>.
- [48] S.H. Light, L. Su, R. Rivera-Lugo, J.A. Cornejo, A. Louie, A.T. Iavarone, C.M. Ajo-Franklin, D.A. Portnoy, A flavin-based extracellular electron transfer mechanism in diverse Gram-positive bacteria, *Nature.* 562 (2018) 140–144.
<https://doi.org/10.1038/s41586-018-0498-z>.
- [49] L. Deng, F. Li, S. Zhou, D. Huang, J. Ni, A study of electron-shuttle mechanism in *Klebsiella pneumoniae* based-microbial fuel cells, *Chinese Sci. Bull.* 55 (2010) 99–104. <https://doi.org/10.1007/s11434-009-0563-y>.
- [50] E. Marsili, D.B. Baron, I.D. Shikhare, D. Coursolle, J.A. Gralnick, D.R. Bond, *Shewanella* secretes flavins that mediate extracellular electron transfer, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105 (2008) 3968–3973. <https://doi.org/10.1073/pnas.0710525105>.
- [51] K.B. Gregory, D.R. Lovley, Remediation and Recovery of Uranium from Contaminated Subsurface Environments with Electrodes, *Environ. Sci. Technol.* 39 (2005) 8943–8947. <https://doi.org/10.1021/es050457e>.
- [52] K.B. Gregory, D.R. Bond, D.R. Lovley, Graphite electrodes as electron donors for anaerobic respiration, *Environ. Microbiol.* 6 (2004) 596–604.
<https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00593.x>.
- [53] A.R. Rowe, P. Rajeev, A. Jain, S. Pirbadian, A. Okamoto, J.A. Gralnick, M.Y. El-Naggar, K.H. Nealson, Tracking Electron Uptake from a Cathode into *Shewanella* Cells: Implications for Energy Acquisition from Solid-Substrate Electron Donors,

- MBio. 9 (2018). <https://doi.org/10.1128/mBio.02203-17>.
- [54] L. Yu, Y. Yuan, S. Chen, L. Zhuang, S. Zhou, Direct uptake of electrode electrons for autotrophic denitrification by *Thiobacillus denitrificans*, *Electrochem. Commun.* 60 (2015) 126–130. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2015.08.025>.
- [55] A.R. Rowe, F. Salimijazi, L. Trutschel, J. Sackett, O. Adesina, I. Anzai, L.H. Kugelmass, M.H. Baym, B. Barstow, Identification of a Pathway for Electron Uptake in *Shewanella oneidensis*, *BioRxiv.* (2021) 2021.01.12.426419. <https://doi.org/10.1101/2021.01.12.426419>.
- [56] A. PrévotEAU, J.M. Carvajal-Arroyo, R. Ganigué, K. Rabaey, Microbial electrosynthesis from CO₂: forever a promise?, *Curr. Opin. Biotechnol.* 62 (2020) 48–57. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.08.014>.
- [57] T. Philippon, T. Flinois, E. Lebègue, N.L. Costa, F. Barrière, J. Rogińska, M. Etienne, 13. Current trends for water treatment with microbial electrodes, in: S. Cosnier (Ed.), *Bioelectrochemistry*, De Gruyter, Berlin, Boston, 2019: pp. 259–282. <https://doi.org/10.1515/9783110570526-013>.
- [58] J.K. Nørskov, J. Rossmeisl, A. Logadottir, L. Lindqvist, J.R. Kitchin, T. Bligaard, H. Jónsson, Origin of the Overpotential for Oxygen Reduction at a Fuel-Cell Cathode, *J. Phys. Chem. B.* 108 (2004) 17886–17892. <https://doi.org/10.1021/jp047349j>.
- [59] P. Clauwaert, K. Rabaey, P. Aelterman, L. De Schamphelaire, T.H. Pham, P. Boeckx, N. Boon, W. Verstraete, Biological Denitrification in Microbial Fuel Cells, *Environ. Sci. Technol.* 41 (2007) 3354–3360. <https://doi.org/10.1021/es062580r>.
- [60] B.C. Berks, S.J. Ferguson, J.W.B. Moir, D.J. Richardson, Enzymes and associated electron transport systems that catalyse the respiratory reduction of nitrogen oxides and oxyanions, *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1232 (1995) 97–173. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(95\)00092-5](https://doi.org/10.1016/0005-2728(95)00092-5).
- [61] N. Pous, A.A. Carmona-Martínez, A. Vilajeliu-Pons, E. Fiset, L. Bañeras, E. Trably, M.D. Balaguer, J. Colprim, N. Bernet, S. Puig, Bidirectional microbial electron transfer: Switching an acetate oxidizing biofilm to nitrate reducing conditions, *Biosens. Bioelectron.* 75 (2016) 352–358. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.08.035>.

- [62] N. Pous, C. Koch, J. Colprim, S. Puig, F. Harnisch, Extracellular electron transfer of biocathodes: Revealing the potentials for nitrate and nitrite reduction of denitrifying microbiomes dominated by *Thiobacillus* sp., *Electrochem. Commun.* 49 (2014) 93–97. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2014.10.011>.
- [63] N. Yang, G. Zhan, D. Li, X. Wang, X. He, H. Liu, Complete nitrogen removal and electricity production in *Thauera*-dominated air-cathode single chambered microbial fuel cell, *Chem. Eng. J.* 356 (2019) 506–515. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.08.161>.
- [64] R.R. Sayess, P.E. Saikaly, M. El-Fadel, D. Li, L. Semerjian, Reactor performance in terms of COD and nitrogen removal and bacterial community structure of a three-stage rotating bioelectrochemical contactor, *Water Res.* 47 (2013) 881–894. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.11.023>.
- [65] Y. Xiao, Y. Zheng, S. Wu, Z.-H. Yang, F. Zhao, Bacterial Community Structure of Autotrophic Denitrification Biocathode by 454 Pyrosequencing of the 16S rRNA Gene, *Microb. Ecol.* 69 (2015) 492–499. <https://doi.org/10.1007/s00248-014-0492-4>.
- [66] O.F. Vyatchina, D.I. Stom, S. Goel, B. Xie, Biocathode of microbial fuel cells based on nitrate-reducing strains of *Pseudomonas aeruginosa*, *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.* 408 (2020) 012084. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/408/1/012084>.
- [67] W. Zhang, Y. Zhang, W. Su, Y. Jiang, M. Su, P. Gao, D. Li, Effects of cathode potentials and nitrate concentrations on dissimilatory nitrate reductions by *Pseudomonas alcaliphila* in bioelectrochemical systems, *J. Environ. Sci.* 26 (2014) 885–891. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(13\)60460-X](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(13)60460-X).
- [68] K. Fricke, F. Harnisch, U. Schröder, On the use of cyclic voltammetry for the study of anodic electron transfer in microbial fuel cells, *Energy Environ. Sci.* 1 (2008) 144. <https://doi.org/10.1039/b802363h>.
- [69] H. Zhao, J. Zhao, F. Li, X. Li, Performance of Denitrifying Microbial Fuel Cell with Biocathode over Nitrite, *Front. Microbiol.* 7 (2016). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00344>.
- [70] K. Wang, S. Zhang, Extracellular electron transfer modes and rate-limiting steps in denitrifying biocathodes, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 26 (2019) 16378–16387.

<https://doi.org/10.1007/s11356-019-05117-x>.

- [71] C. Zhu, H. Wang, Q. Yan, R. He, G. Zhang, Enhanced denitrification at biocathode facilitated with biohydrogen production in a three-chambered bioelectrochemical system (BES) reactor, *Chem. Eng. J.* 312 (2017) 360–366.
<https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.11.152>.
- [72] A. Ding, D. Zhao, F. Ding, S. Du, H. Lu, M. Zhang, P. Zheng, Effect of inocula on performance of bio-cathode denitrification and its microbial mechanism, *Chem. Eng. J.* 343 (2018) 399–407. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.02.119>.
- [73] A. Vijay, M. Vaishnava, M. Chhabra, Microbial fuel cell assisted nitrate nitrogen removal using cow manure and soil, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23 (2016) 7744–7756.
<https://doi.org/10.1007/s11356-015-5934-0>.
- [74] S. Kondaveeti, B. Min, Nitrate reduction with biotic and abiotic cathodes at various cell voltages in bioelectrochemical denitrification system, *Bioprocess Biosyst. Eng.* 36 (2013) 231–238. <https://doi.org/10.1007/s00449-012-0779-0>.
- [75] Q. Yang, H. Zhao, H. Liang, Denitrification of overlying water by microbial electrochemical snorkel, *Bioresour. Technol.* 197 (2015) 512–514.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.127>.
- [76] V.K. Nguyen, Y. Park, J. Yu, T. Lee, Bioelectrochemical denitrification on biocathode buried in simulated aquifer saturated with nitrate-contaminated groundwater, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23 (2016) 15443–15451. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6709-y>.
- [77] V. Srinivasan, J. Weinrich, C. Butler, Nitrite accumulation in a denitrifying biocathode microbial fuel cell, *Environ. Sci. Water Res. Technol.* 2 (2016) 344–352.
<https://doi.org/10.1039/C5EW00260E>.
- [78] S. Kato, K. Hashimoto, K. Watanabe, Microbial interspecies electron transfer via electric currents through conductive minerals, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109 (2012) 10042–10046. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117592109>.
- [79] J.Y. Law, M.L. Soupir, D.R. Raman, T.B. Moorman, S.K. Ong, Electrical stimulation for enhanced denitrification in woodchip bioreactors: Opportunities and challenges,

- Ecol. Eng. 110 (2018) 38–47. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2017.10.002>.
- [80] E. Marx Sander, B. Viridis, S. Freguia, Bioelectrochemical Denitrification for the Treatment of Saltwater Recirculating Aquaculture Streams, *ACS Omega*. 3 (2018) 4252–4261. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b00287>.
- [81] A. Callegari, S. Bolognesi, D. Ceconet, Operation of a 2-Stage Bioelectrochemical System for Groundwater Denitrification, *Water*. 11 (2019) 959. <https://doi.org/10.3390/w11050959>.
- [82] J.A. Camargo, Á. Alonso, Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: A global assessment, *Environ. Int.* 32 (2006) 831–849. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2006.05.002>.
- [83] J.D. Rouse, C.A. Bishop, J. Struger, Nitrogen pollution: an assessment of its threat to amphibian survival., *Environ. Health Perspect.* 107 (1999) 799–803. <https://doi.org/10.1289/ehp.99107799>.
- [84] J.M.S. van Maanen, A. van Dijk, K. Mulder, M.H. de Baets, P.C.A. Menheere, D. van der Heide, P.L.J.M. Mertens, J.C.S. Kleinjans, Consumption of drinking water with high nitrate levels causes hypertrophy of the thyroid, *Toxicol. Lett.* 72 (1994) 365–374. [https://doi.org/10.1016/0378-4274\(94\)90050-7](https://doi.org/10.1016/0378-4274(94)90050-7).
- [85] M.H. Ward, B.A. Kilfoy, P.J. Weyer, K.E. Anderson, A.R. Folsom, J.R. Cerhan, Nitrate Intake and the Risk of Thyroid Cancer and Thyroid Disease, *Epidemiology*. 21 (2010) 389–395. <https://doi.org/10.1097/EDE.0b013e3181d6201d>.
- [86] OCDE, Environmental pressures rising in New Zealand, 2017. <https://doi.org/dx.doi.org/10.1787/888933459622>.
- [87] L. Denis, C. Grenz, Spatial variability in oxygen and nutrient fluxes at the sediment-water interface on the continental shelf in the Gulf of Lions (NW Mediterranean), *Oceanol. Acta*. 26 (2003) 373–389. [https://doi.org/10.1016/S0399-1784\(03\)00017-3](https://doi.org/10.1016/S0399-1784(03)00017-3).
- [88] M. Sayama, Presence of Nitrate-Accumulating Sulfur Bacteria and Their Influence on Nitrogen Cycling in a Shallow Coastal Marine Sediment, *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (2001) 3481–3487. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.8.3481-3487.2001>.

- [89] D. de Beer, J.-P.R.A. Sweerts, Measurement of nitrate gradients with an ion-selective microelectrode, *Anal. Chim. Acta.* 219 (1989) 351–356. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)80369-4](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)80369-4).
- [90] Y. Lipsewers, N. Bale, Seasonality and depth distribution of the abundance and activity of ammonia oxidizing microorganisms in marine coastal sediments (North Sea), *Front. Microbiol.* (2014). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00472>.
- [91] M. Hoareau, B. Erable, A. Bergel, Microbial electrochemical snorkels (MESs): A budding technology for multiple applications. A mini review, *Electrochem. Commun.* 104 (2019) 106473. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2019.05.022>.
- [92] C. Pfeffer, S. Larsen, J. Song, M. Dong, F. Besenbacher, R.L. Meyer, K.U. Kjeldsen, L. Schreiber, Y.A. Gorby, M.Y. El-Naggar, K.M. Leung, A. Schramm, N. Risgaard-Petersen, L.P. Nielsen, Filamentous bacteria transport electrons over centimetre distances, *Nature.* 491 (2012) 218–221. <https://doi.org/10.1038/nature11586>.
- [93] Julien Tournebize, C. Chaumont, S. Molina, D. Berthault, Guide technique à l'implantation des zones tampons humides artificielles (ZTHA) pour réduire les transferts de nitrates et de pesticides dans les eaux de drainage : cas du département de la Seine-et-Marne, 2013.
- [94] J.D. Lebrun, S. Ayrault, A. Drouet, L. Bordier, L.C. Fechner, E. Uher, C. Chaumont, J. Tournebize, Ecodynamics and bioavailability of metal contaminants in a constructed wetland within an agricultural drained catchment, *Ecol. Eng.* 136 (2019) 108–117. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2019.06.012>.

Chapitre II : Premiers développements de bio-cathodes bactériennes par polarisation d'une électrode dans un milieu naturel

Table des matières

I) Tentative de reproduction de bio-cathodes à <i>Thiobacillus denitrificans</i> au sein du milieu test de Rampillon.....	68
1) Introduction	68
2) Matériel et Méthodes	69
3) Résultats	72
4) Conclusion.....	76
II) Développement de bio-cathodes à oxygène permettant la dénitrification	77
1) Introduction	77
2) Matériel et Méthodes - Première Partie.....	78
3) Résultats – Première Partie.....	80
2) Matériel et Méthodes - Deuxième Partie.....	82
3) Résultats – Deuxième Partie.....	93
4) Hypothèse et Conclusion	105
III) Références	109

I) Tentative de développement de bio-cathodes à *Thiobacillus denitrificans* au sein du milieu test de Rampillon

1) Introduction

L'un des buts principaux du projet LowNitrate est de définir si le milieu test de Rampillon est propice au développement par pression de sélection de bio-cathodes dénitrifiantes via les micro-organismes présents naturellement. Parmi les études publiées portant sur les bio-cathodes dénitrifiantes, une des plus prometteuses pour le projet est probablement celle de [Pous *et al.*](#) [1] publiée en 2014. Cette étude est importante car elle identifie à la fois les potentiels précis de réduction du nitrate par une bio-cathode colonisée par un biofilm (autour de -0,3 V vs Ag/AgCl) mais également car le système bio-électrochimique a été développé par simple pression de sélection sans utilisation de culture pure. Enfin, on peut noter que la deuxième étape de la dénitrification à savoir la réduction des nitrites en monoxyde d'azote est également présente et visible sur voltamétrie cyclique. La toute première expérience menée est une tentative de développer des bio-cathodes sur un principe similaire mais en utilisant comme inoculum des prélèvements d'eau provenant du lac artificiel de Rampillon prévu comme milieu test pour les futurs prototypes de systèmes dénitrifiants mis au point via le projet LowNitrate.

Dans l'étude de Pous *et al.*, les bio-cathodes dénitrifiantes sont développées par pression de sélection en se servant de barreaux de graphite comme électrodes constamment polarisées à -0,32 V vs Ag/AgCl (saturée au KCl) soit -0,12 V vs ENH. Une étude microbiologique permet ensuite de mettre en évidence une prédominance de *Thiobacillus denitrificans* identifiée par les auteurs comme l'espèce exo-électrogène permettant la réduction des nitrates via des électrons provenant de la cathode. Or, il s'avère que cette espèce a notamment été isolée dans un bassin de rétention domestique [2], milieu dont les caractéristiques pourraient potentiellement se rapprocher en termes de composition au bassin de rétention pour les eaux de ruissellement agricole situé à Rampillon. C'est la raison pour laquelle l'expérience de Pous *et al.* sera utilisée comme modèle avec quelques différences comme l'utilisation d'eaux naturelles (possédant une conductivité entre 500 et 700 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-2}$ soit suffisante pour les études en voltamétrie cyclique) et non des solutions synthétiques.

Néanmoins, si les eaux prélevées directement depuis le milieu naturel sont privilégiées, quelques ajouts seront pratiqués afin de favoriser le développement de bio-cathodes dénitrifiantes via pression de sélection. En premier lieu une forte concentration de nitrate de sodium sera ajouté dans cette optique mais également du carbonate de sodium. En effet, comme expliqué dans l'introduction, les bactéries cathodiques comme *Thiobacillus denitrificans* utilisent les électrons captés depuis une électrode afin synthétiser de l'ATP. De plus, il existe des bactéries dites chimio-autotrophe capables d'utiliser du carbone inorganique afin de synthétiser leurs composants cellulaires via l'anabolisme. De fait, l'ajout de carbonate est pratiqué afin de favoriser d'autant plus le développement de ce type de bactéries sur l'électrode.

2) Matériel et Méthodes

- Structure du pilote

Deux pilotes sont montés en utilisant une cellule en verre cylindrique de 9 cm de diamètre et 5 cm de hauteur. Le couvercle, également en verre est percé de quatre orifices cylindriques rodés et est scellés à la partie inférieure par un film plastique de parafilm et de téflon en ruban afin d'empêcher au maximum l'entrée d'air ambiant dans la cellule. Le milieu d'incubation est composé de 150 mL d'eau de la zone humide artificielle de Rampillon prélevée le mois précédent, soit durant le mois d'Avril (Printemps). A ces 150 mL d'eaux naturelles, ont été ajoutés 0,100 M (mole.L⁻¹) de K₂HPO₄ et de KH₂PO₄, 20 mM de NaCO₃ ainsi que 10 mM de NaNO₃ (soit 850 mg.L⁻¹ de NaNO₃ ou 620 mg.L⁻¹ de NO₃⁻). La concentration en nitrate utilisée est très supérieure à celles retrouvées dans la nature (rarement plus de quelques centaines de mg.L⁻¹ pour les zones les plus polluées) néanmoins le but ici est avant tout de générer une forte pression de sélection afin favoriser le développement de biofilms dénitrifiants. Le pilote a été saturé en argon en début d'expérience et de nouveau saturé chaque matin. Le pH a également été relevé régulièrement et les valeurs pour les deux pilotes n'ont jamais dépassé 7,1 et ne sont jamais tombées en dessous de 6,8.

- Electrodes

Pour l'un des deux pilotes, trois des quatre orifices sont colmatés en utilisant des bouchons percés dans lesquels sont insérés trois barreaux de graphite ayant un diamètre de 0,5 cm. Dans le dernier est inséré une électrode de référence de type ECS (Electrode au Calomel Saturée, saturée au KCl, + 0,244 V vs ENH). Un joint en caoutchouc ainsi qu'une couche de téflon sont ajoutés autour de l'ECS afin de limiter le passage d'air dans la cellule. Pour le deuxième pilote, la totalité des orifices sont colmatés via des bouchons sans ajout d'électrodes (voir Figure 1).

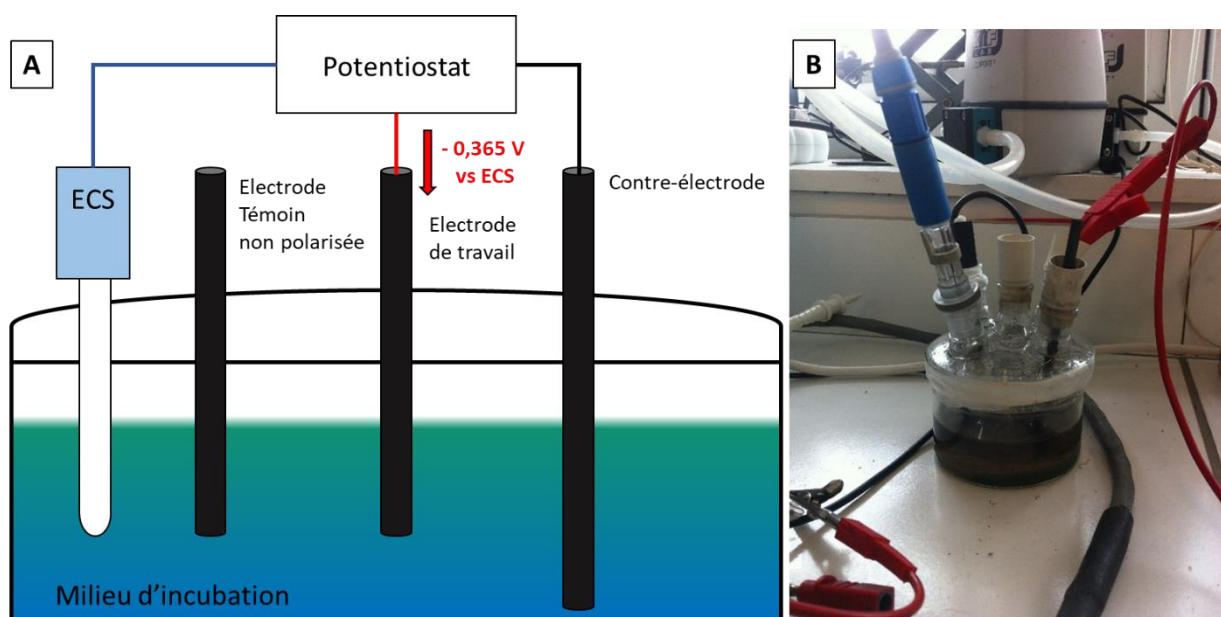


Figure 1 : A) Schéma du montage du pilote contenant les électrodes, B) Photo du même montage contenant les électrodes.

- Polarisation

Pour le pilote avec électrodes, l'une des trois électrodes de graphite sera placée sous polarisation à $-0,365\text{ V vs ECS}$ (Electrode Calomel Saturée, $-0,12\text{V vs ENH}$) via un potentiostat analogique (pas d'enregistrement du courant) avec comme contre électrode la deuxième électrode de graphite. La troisième électrode est laissée sans polarisation comme témoin négatif afin de pouvoir comparer les effets de la polarisation via étude en voltamétrie cyclique.

- Etude en voltamétrie cyclique

Des études en voltamétrie cyclique sont pratiquées régulièrement. L'électrode de référence est toujours indiquée sur les voltamogrammes présentés. La vitesse de balayage peut varier et reste toujours indiquée également. Toutes les études ont été faites via un potentiostat Metrohm® (PGSTAT 302N).

- Suivi des concentrations en nitrate

Les suivis des concentrations en nitrate dans le milieu d'incubation sont pratiqués via le protocole colorimétrique de l'acide salicylique déjà décrit dans la littérature par Cataldo *et al* [3] dans les années 70 et largement répandu (plus de 3000 citations). L'absorbance à 410 nm est lue via un spectrophotomètre UV-1605 de la marque Shimadzu®. Afin de s'assurer de l'efficacité du protocole de détermination des concentrations en nitrate, une courbe de calibration via des solutions contrôles a été faite et est montrée Figure 2.

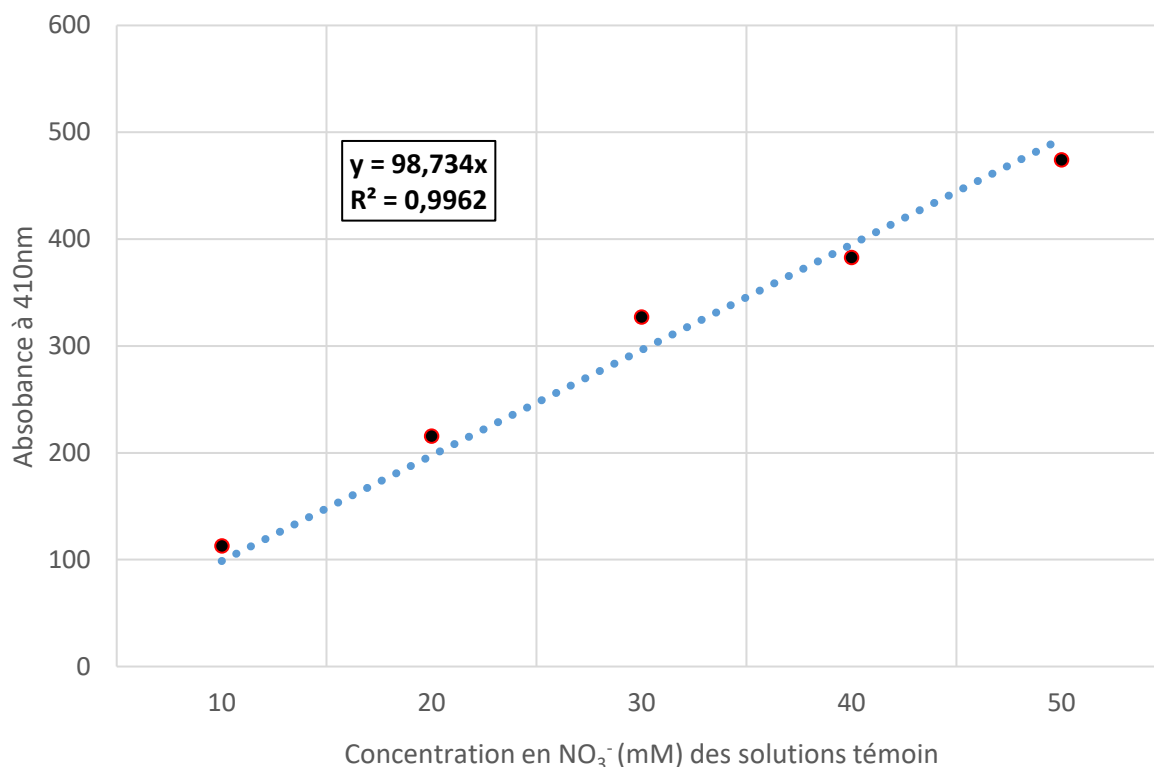


Figure 2 : Courbe de calibration de l'absorbance en fonction des concentrations en nitrate de solutions témoin. La méthode est considérée comme efficace mais au vu des légères imprécisions, les concentrations en nitrate obtenues via cette méthode seront considérées comme ayant une marge d'erreur de mesure de 5 %.

- Chronologie de l'expérience

Les deux pilotes, l'un contenant les électrodes et l'autre sans électrodes ont été laissés incuber 20 jours à température ambiante et à lumière ambiante également et sous polarisation de l'électrode de travail pour le premier pilote. Après ces 20 jours d'incubation, le milieu du pilote contenant les trois électrodes a été renouvelé avec la même composition à l'exception du nitrate de sodium. Une chronoampérométrie a été lancée sur l'électrode de travail du premier pilote via le potentiostat Metrohm, le tout sous air ambiant. Le potentiel fixé est le même que précédemment (à -0,365 V vs ECS) mais avec cette fois-ci l'enregistrement de l'évolution du courant au niveau de cette électrode de travail. La chronoampérométrie est lancée sur 10 heures puis le nitrate de sodium est ajouté pour la même concentration que précédemment (10 mM ou 850 mg.L⁻¹) à t = 2 h. L'objectif est de pouvoir visualiser la possible augmentation du courant de réduction liée à une réduction des nitrates par des biofilms exo-électrogènes ayant colonisé l'électrode de travail polarisée durant les 20 jours d'expérience.

3) Résultats

- Evolution des concentrations en nitrate

En premier lieu, l'évolution des concentrations en nitrate dans le pilote contenant les électrodes et dans celui n'en possédant pas est étudiée afin de visualiser si une différence significative est visible.

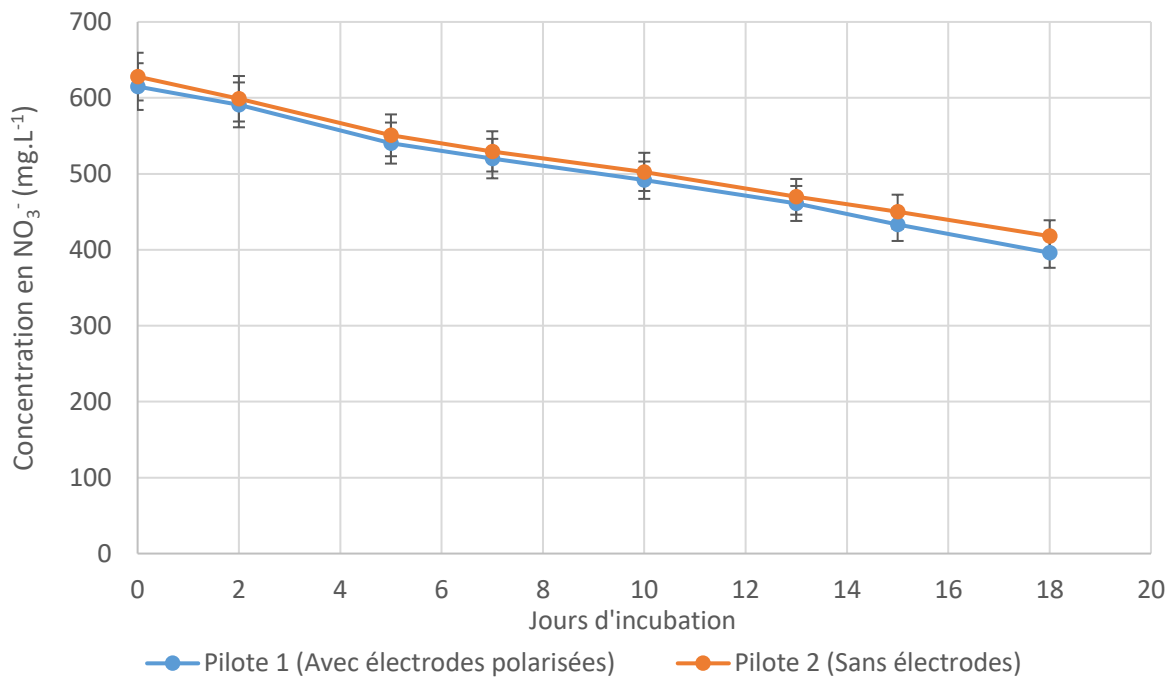


Figure 3 : Graphe représentant la concentration en nitrate dans l'eau naturelles de Rampillon des deux pilotes durant les 20 jours d'incubation.

Comme on peut l'observer sur la Figure 3, l'évolution des concentrations en nitrate ne varie pas de façon significative entre le pilote sans électrode et le pilote avec électrodes. En effet, les efficacités de la dénitrification sur les 20 jours d'incubation (18 jours de mesures) sont globalement similaires. On peut donc à première vue considérer que l'ajout d'électrodes polarisées ou non n'as pas permis d'augmenter la vitesse de réduction des nitrates au sein du pilote de façon notable.

Néanmoins, il faut rappeler que la concentration en nitrate utilisée (620 mg.L^{-1} ou 10 mM) est très largement supérieure aux concentrations rencontrées dans la nature et que le but était avant tout de générer une pression de sélection sur les organismes naturellement présents dans les eaux de Rampillon afin de favoriser le développement de bactéries à la fois réductrices du nitrate (concentration importante et saturation à l'argon) et à la fois exo-électrogènes (ajout

d'électrode polarisée ou non pour le premier pilote). Afin de vérifier si cet objectif est atteint, il est nécessaire d'étudier les électrodes incubées dans ce milieu par cyclo-voltamétrie et chronoampérométrie.

- Etude électrochimique des électrodes

Comme expliqué dans la partie Matériel et Méthodes, après les 20 jours d'incubation le milieu du pilote avec électrode est renouvelé mais sans ajout de nitrate de sodium. Une chronoampérométrie est alors enregistrée sur l'électrode polarisée au même potentiel que précédemment à savoir $-0,365$ V vs ECS pendant 10 heures mais avec enregistrement de l'évolution du courant cette fois-ci. A $t = 2$ h sont ajoutés 10 mM de nitrate de sodium dans le milieu.

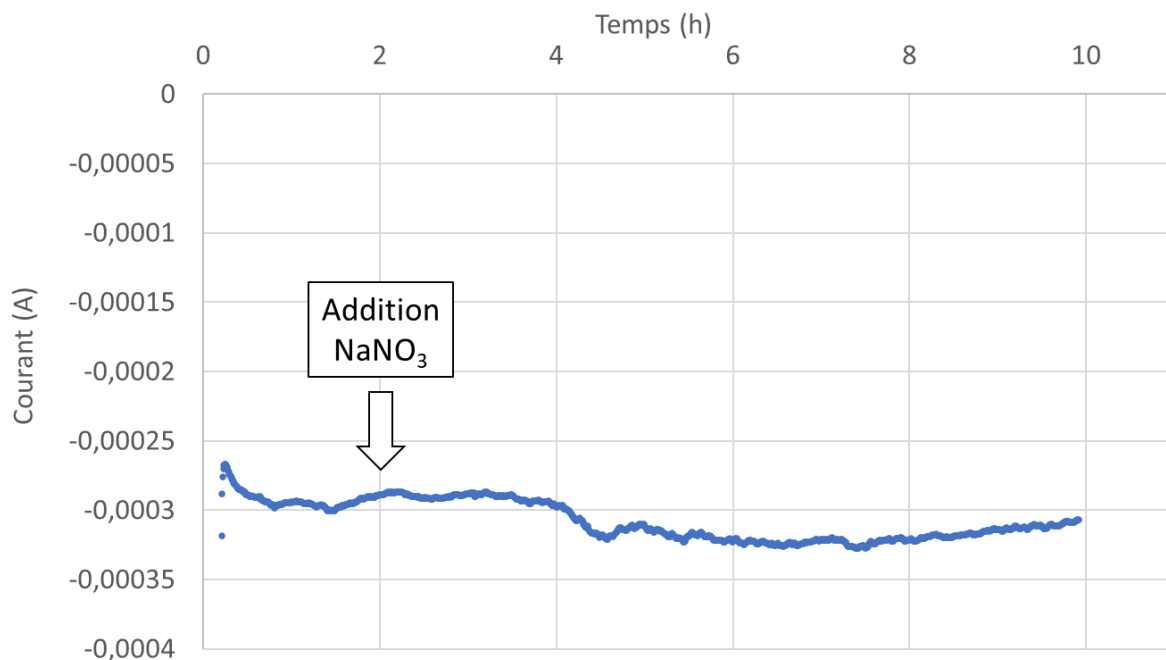


Figure 4 : Chronoampérométrie de l'électrode de travail polarisée à $-0,365$ V vs ECS dans son milieu renouvelé mais sans nitrate présent en début d'expérience. L'ajout de 10 mM de nitrate de sodium à $t = 2$ heures est indiqué. La saturation à l'argon est faite chaque matin mais n'est pas constante.

La Figure 4 montre l'évolution du courant au niveau de l'électrode de travail et on peut observer que l'ajout du nitrate de sodium n'a pas d'effet visible. En effet, si l'électrode polarisée à $-0,365$ V vs ECS se révélait être capable de pratiquer la dénitrification électrochimique à ce potentiel, une augmentation du courant réducteur (négatif) devrait être visible sur la chronoampérométrie. Ici on peut effectivement observer une augmentation de courant négatif mais seulement 2

heures après ajout du nitrate (soit à $t = 4$ h) et à des valeurs très faibles (passage de $-0,27 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ à $-0,31 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$, soit environ +15 % seulement). Quant au courant négatif avant ajout de nitrate, il est vraisemblablement lié à la réduction de l'oxygène qui peut se réduire à ce potentiel sur graphite nu [4].

Néanmoins il faut garder à l'esprit que la chronoampérométrie ne montre l'évolution du courant qu'à un potentiel donné à savoir $-0,320 \text{ V}$ dans notre cas. Il est envisageable que la réduction des nitrates par des biofilms ayant colonisé l'électrode de travail soit possible mais à un potentiel différent de celui de *Thiobacillus denitrificans* qui fut choisi pour la valeur de la polarisation de cette expérience. Afin de vérifier si cette réduction des nitrates est présente, une étude par voltamétrie cyclique est nécessaire.

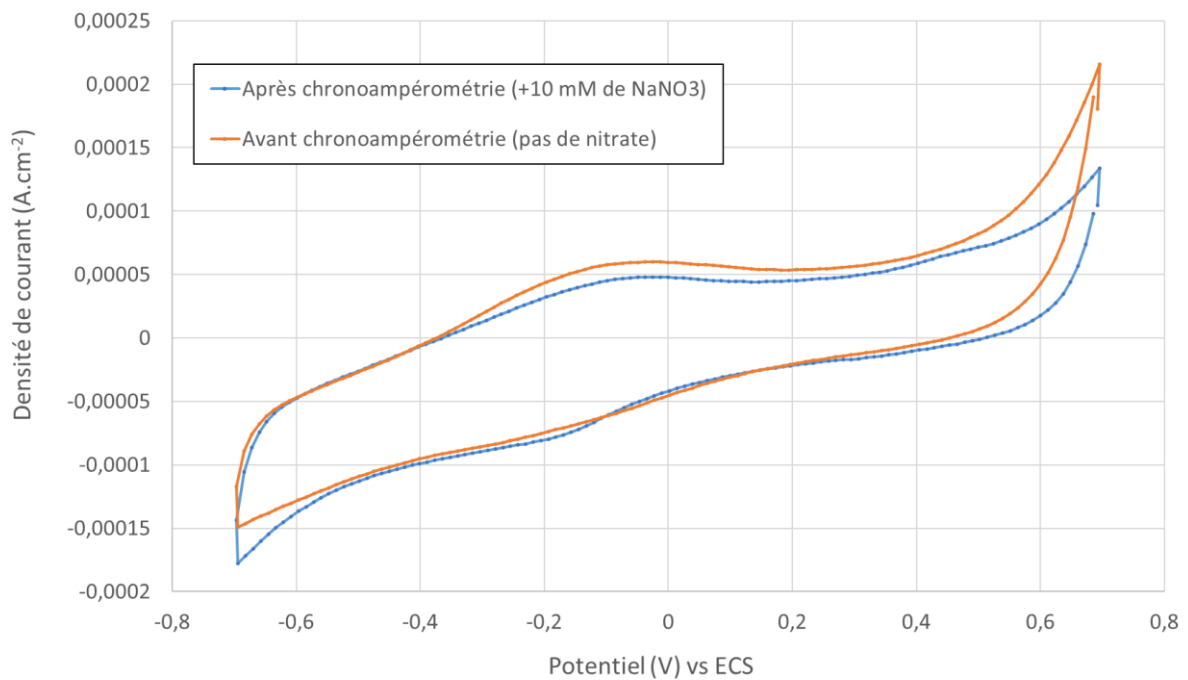


Figure 5 : Voltamétrie cyclique de l'électrode de travail polarisée à $-0,365 \text{ V}$ vs ECS sur les 20 jours d'incubation dans son milieu d'incubation renouvelé (eaux naturelles + 20 mM de NaHCO_3 + 0,1 M de K_2HPO_4 et KH_2PO_4) avant le lancement de la chronoampérométrie incluant l'ajout des 10 mM de NaNO_3 comparée à une voltamétrie faite à la fin de cette chronoampérométrie ($t = 10$ h). Les deux voltamétries sont faites à $10 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ et sous argon.

Comme on peut le voir sur les deux voltamogrammes de la Figure 5, l'ajout de nitrates durant la chronoampérométrie décrite précédemment n'a déclenché aucun effet particulier au niveau de l'électrode de travail en termes d'oxydation et de réduction. Ainsi, on peut affirmer que la légère augmentation de courant réducteur visible sur chronoampérométrie n'est pas liée à la réduction des nitrates.

L'électrode non polarisée dans le pilote servant de contrôle négatif permettant de vérifier l'effet de la polarisation est également étudiée en voltamétrie avant et après l'ajout de nitrates :

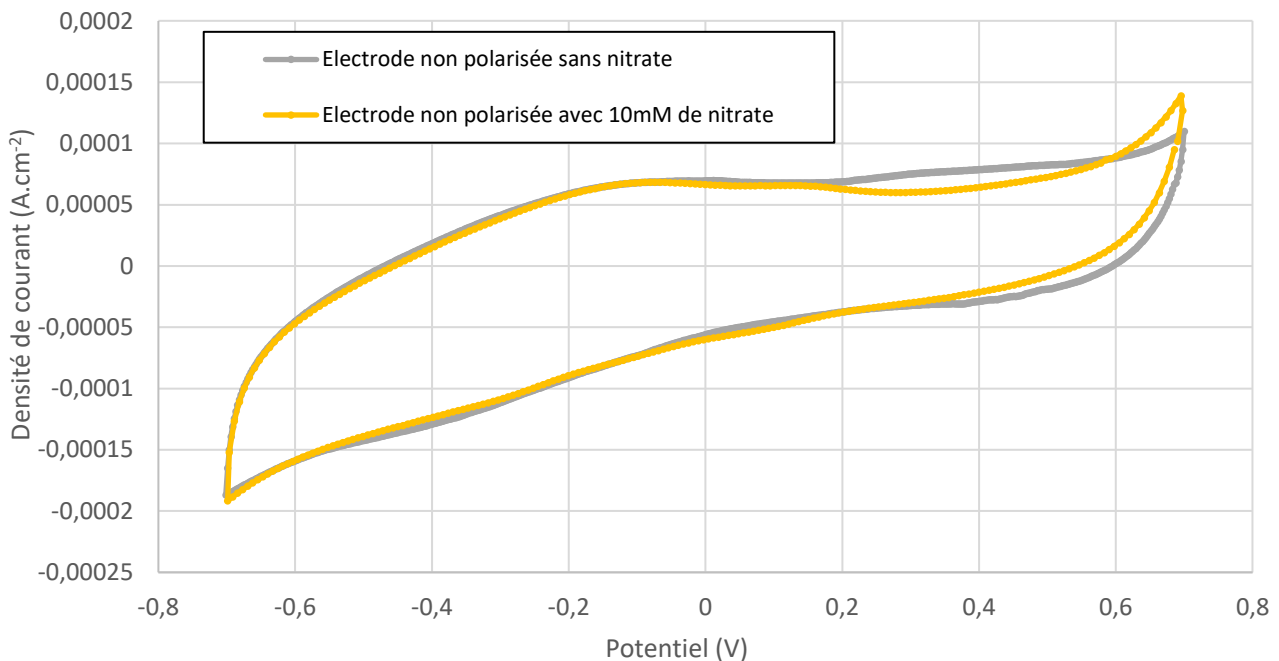


Figure 6 : Voltamétries cycliques de l'électrode laissée sans polarisation dans son milieu d'incubation renouvelé (eaux naturelles + 20 mM de NaHCO₃ + 0,1 M de K₂HPO₄ et KH₂PO₄) avant et après l'ajout des 10 mM de NaNO₃. Les voltamétries sont faites à 10 mV.s⁻¹ et sous argon.

Tout comme l'électrode qui a été laissée sous polarisation durant les 20 jours d'incubation, l'électrode non polarisée ne montre pas de changements visibles avant et après ajout de nitrates dans milieu comme on peut le constater Figure 6. Encore une fois, on peut alors émettre l'hypothèse qu'aucun biofilm exo-électrogène réducteur du nitrate ne s'est développé sur cette électrode.

Cette toute première expérience qui visait à tenter de favoriser le développement de biofilms composés de bactéries dénitrifiantes réduisant le nitrate via une cathode à un potentiel proche ou égal à celui de *Thiobacillus denitrificans* n'a pas fonctionné car aucune réduction n'est visible sur le voltamogramme.

4) Conclusion

Plusieurs conclusions et hypothèses peuvent être émises au vu des résultats :

- Il est possible que le milieu d'incubation, à savoir les eaux naturelles de Rampillon ne contiennent pas d'espèces bactériennes exo-électrogènes réduisant le nitrate. Cette hypothèse est problématique car cette absence pourrait s'avérer être une barrière difficile à franchir dans le cadre du projet. Néanmoins, il faut garder à l'esprit que les espèces bactériennes ne sont pas réparties de façon homogène dans un milieu naturel. Par exemple, dans notre cas, nous avons choisi d'utiliser de l'eau récoltée à un certain moment de l'année mais nous aurions pu utiliser d'autres inocula provenant de Rampillon comme par exemple des sédiments du lac contenant vraisemblablement d'autres communautés bactériennes que celles de l'eau, parmi lesquelles possiblement des bactéries exo-électrogènes.

- L'autre hypothèse est celle du temps d'incubation. En effet, dans le cas de l'étude de Pous *et al.* ayant servi de base à cette expérience, l'inoculum utilisé est un prélèvement provenant d'un système bio-électrochimique précédemment mis au point par les auteurs. C'est une information importante car cela signifie que l'inocula biologique utilisé était déjà, au moins en partie, adapté à la colonisation d'électrodes.

- L'autre possibilité est que le potentiel choisi n'est finalement pas le plus favorable au développement de bio-cathodes dénitrifiantes. Ce potentiel a été choisi en grande partie car l'étude de Pous *et al.* est l'une des rares décrivant des potentiels de réduction des nitrates avec précision. A cela s'ajoute le fait que le métabolisme décrit permet à la fois la réduction des nitrates mais également des nitrites, chose très rare dans le domaine de la bio-électrochimie où seul la réduction exo-électrogène des nitrates est la plupart du temps décrite. Le changement de potentiel fixé à l'électrode est également une piste à suivre. Il est à noter que fixer un potentiel plus négatif que celui permettant la réduction du nitrate par *Thiobacillus denitrificans* n'est pas fondamentalement un problème pour son développement car une réduction est également possible à des potentiels inférieurs (plus négatifs ou plus cathodiques).

II) Développement de bio-cathodes à oxygène permettant la dénitrification

1) Introduction

La deuxième expérience décrite ici est de nouveau une tentative de développer des bio-cathodes à nitrate mais en tirant les leçons de l'expérience précédente. Deux des trois principales hypothèses émises précédemment afin de justifier l'absence de biofilms dénitrifiants vont être considérées dans cette seconde expérience.

- En premier lieu, le potentiel fixé sur l'électrode de travail sera modifié pour passer de -0,320 V à -0,5 V vs ECS soit -0,256 V vs ENH. En effet, de nombreuses études semblent indiquer que c'est aux alentours de ce potentiel (entre -0,2 et -0,3 V vs ENH) que le développement de bio-cathodes dénitrifiantes est le plus optimal [5][6], y compris des bio-cathodes comprenant des biofilms contenant la bactérie *Thiobacillus denitrificans* [7] prouvant ainsi qu'elle peut se développer à un potentiel plus négatif que celui décrit dans l'étude de Pous *et al.* utilisée comme référence auparavant.

- L'autre grande problématique évoquée en conclusion de la partie précédente est celle de la possible absence de bactéries exo-électrogènes dénitrifiantes. Afin de tenter de contourner cet écueil possible, une tentative de bio-augmentation sera faite en se servant de culture pure de l'espèce *Thiobacillus denitrificans*. Néanmoins, il ne faut pas perdre de vue que dans les études citant cette espèce, tous les biofilms décrits sont mixtes. Autrement dit, ils sont composés de plusieurs espèces cohabitant au sein d'un même biofilm bactérien. Ainsi, en plus de la culture pure, un échantillon d'eaux naturelles de Rampillon sera ajouté dans un des deux pilotes afin de tester le développement de *Thiobacillus denitrificans* à la fois avec inocula et sans inocula supplémentaire.

Le milieu d'incubation sera cette fois-ci majoritairement synthétique contenant des composés pouvant en théorie favoriser le développement des bio-cathodes. Ce milieu d'incubation va globalement s'apparenter à un milieu de culture pure pour bactéries dénitrifiantes mais sans la matière organique servant en temps normal de donneur d'électrons (glucose, acétate, extrait de levure...) afin que le donneur principal d'électrons soit l'électrode polarisée. Enfin, une étude

des communautés bactériennes est pratiquée sur les biofilms cathodiques obtenus via une amplification puis séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S.

➤ Première Partie

2) Matériel et Méthodes - Première Partie

- Structure des pilotes

Trois pilotes ont été montés pour cette expérience et sont constitués d'une structure en verre pouvant contenir 150 mL de liquide surmonté d'une structure à quatre tubes de verre pouvant accueillir un système à trois électrodes. Dans chacun de ces trois pilotes sont ajoutés 150 mL de milieu d'incubation contenant 8,6 mM de NaCl, 0,8 mM de MgSO₄, 1,3 mM de CaCl₂, 0,3 mM de NH₄Cl, 11,9 mM de NaHCO₃, 10,9 mM de Na₂HPO₄, 4,2 mM de KH₂PO₄, 11,7 mM de NaNO₃ (730 mg.L⁻¹ de NO₃⁻), 7,0 mM de NaNO₂ (294 mg.L⁻¹ de NO₂⁻) avec en plus 1 mL.L⁻¹ de solution trace SL-6 (solution type contenant divers oligoéléments). Pour les pilotes 1 et 2, deux électrodes de graphite sont ajoutées avec en plus une électrode de référence de type ECS.

- Ajout de culture pure et inocula

En amont, une culture pure de *Thiobacillus denitrificans* (souche type AB7) commandée sur le site commerciale DSMZ a été réalisée. Le milieu de culture utilisé est le milieu DSMZ n°113, soit celui recommandé par l'entreprise. La culture est saturée à l'argon et placée à 30°C pendant 18 jours. Après ces 18 jours, la Densité Optique mesurée à 600 nm est de 2,2. Puis 5 mL de cette culture pure sont prélevés et centrifugés. Le surnageant (milieu de culture) est alors éliminé et le culot (bactéries) est resuspendu dans 3 mL de milieu d'incubation (voir point précédent). Ce volume est divisé par deux (1,5 mL) et ajouté au milieu d'incubation des deux premiers pilotes (avec électrodes). Pour le pilote n°1, un autre ajout est fait : 1,5 mL d'eaux naturelles provenant du bassin artificiel de Rampillon. Il est à noter que si les structures en verre des trois pilotes ont été lavées à l'alcool et que le milieu d'incubation a été stérilisé avant le lancement de l'expérience, l'incubation, elle, ne se déroule pas en milieu stérile.

- Electrodes

Les pilotes n°1 et 2 vont tous deux accueillir deux électrodes de graphite de diamètre de 0,5 cm, l'une servant d'électrode de travail et l'autre comme contre-électrode. Dans chacun des pilotes, une ECS est également ajouté. Ces électrodes sont insérées dans les pilotes via des bouchons percés et la dernière entrée est colmatée afin de limiter au mieux l'entrée d'air dans le pilote (voir Figure 7)

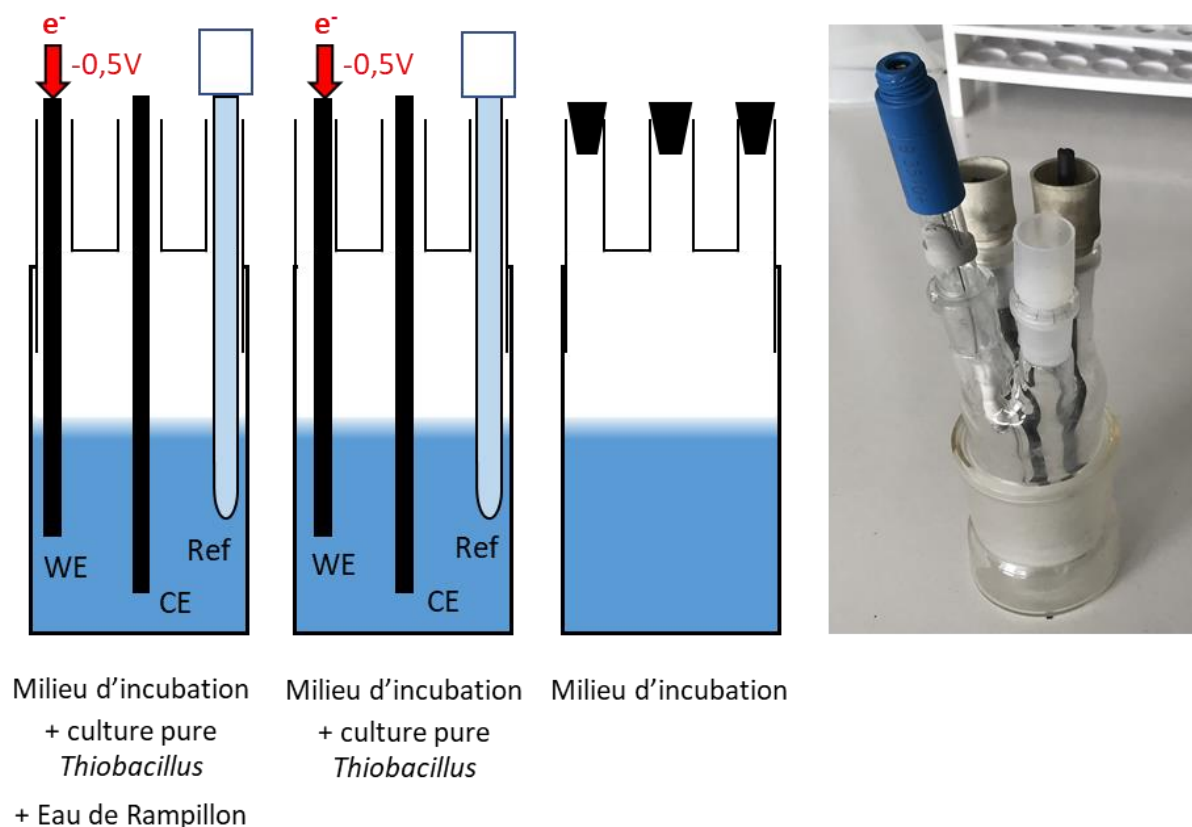


Figure 7 : Schéma des trois pilotes montés pour cette expérience.

- Polarisation et étude en voltamétrie cyclique

Les méthodes de polarisation et de voltamétrie cyclique pour les deux pilotes avec électrodes sont les mêmes que celles décrites précédemment (voir Matériel et Méthode, polarisation).

- Suivi des concentrations en nitrate

La méthode est la même que celle décrite dans la partie précédente (voir Matériel et Méthode, suivi des concentrations en nitrates), en utilisant la même courbe de calibration et donc en appliquant la même marge d'erreur (5%).

- Chronologie de l'expérience

Dans un premier temps, les trois pilotes sont laissés à incuber pendant 30 jours à température ambiante et à lumière ambiante. Durant cette période, les électrodes de travail des pilotes numéro 1 et 2 sont polarisées à -0,5 V vs ECS via un potentiostat analogique durant toute la durée de la première incubation sans enregistrement de l'évolution du courant. Cette phase est couplée d'un suivi des concentrations en nitrates dans les milieux d'incubation des trois pilotes. A la suite de ce mois d'incubation, les électrodes de travail des deux premiers pilotes sont transférées dans un nouveau pilote avec un milieu renouvelé. Les études menées sur les électrodes de travail des deux pilotes à partir de ce point sont décrites dans la deuxième partie des résultats de cette expérience.

3) Résultats – Première Partie

- Evolution des concentrations en nitrates

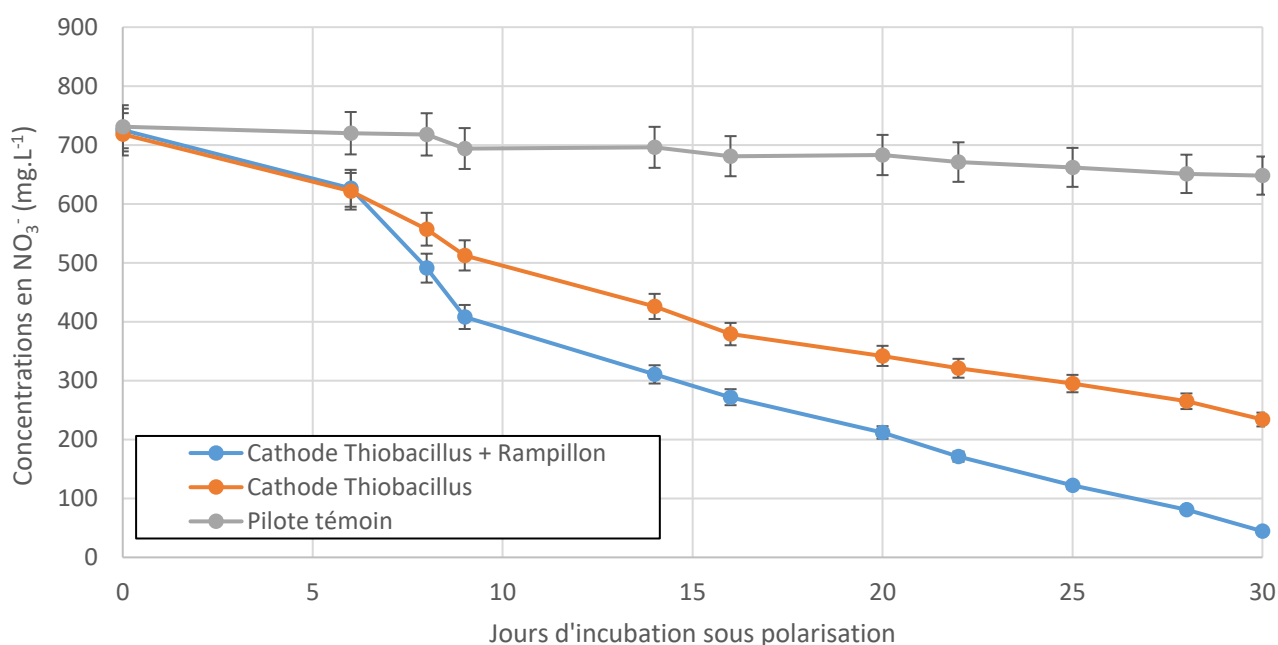


Figure 8 : Graphique représentant l'évolution des concentrations en nitrates au cours du temps dans chacun des trois pilotes incubés pendant un mois.

Durant ce mois d'incubation, les concentrations en nitrates dans chacun des trois pilotes ont été mesurées afin de comparer l'efficacité de la dénitrification comme détaillé dans la Figure 8.

Comme on peut le voir sur ce graphique, contrairement à l'expérience précédente, il y a une claire différence dans l'évolution des concentrations en nitrates dans chacun des trois pilotes.

En premier lieu, on peut noter que cette concentration reste relativement stable dans le cas du contrôle négatif sans électrode et sans ajout d'inocula (en gris sur la Figure 8).

A cela s'ajoute le fait que l'efficacité de la dénitrification diffère entre les deux pilotes avec électrodes mais contenant des inocula différents (culture pure de *Thiobacillus denitrificans* avec ajout de 1,5 mL d'eau de Rampillon dans le premier pilote et le deuxième où seul a été ajouté la culture pure). En effet, sur les 20 premiers jours, on observe une efficacité de dénitrification moyenne de 25 mg de NO_3^- par litre et par jour (soit environ 4 mg de nitrate par jour au sein du pilote) pour le premier pilote et de 19 mg de NO_3^- par litre et par jour (soit 2,8 mg par jour au sein du pilote). Cette augmentation de 36 % de l'efficacité de dénitrification entre le pilote incluant de l'Eau de Rampillon + la culture pure et le pilote avec seulement la culture pure peut potentiellement être corrélée à une capacité à dénitrifier électrochimiquement (réduction du NO_3^- par captation d'électrons depuis l'électrode polarisée) liée à la différence de l'inocula.

On peut alors émettre deux hypothèses sur le fait que l'absence d'ajout d'eau de Rampillon comme second inoculum dans le deuxième pilote est responsable de cette efficacité moindre par rapport au premier :

- La première hypothèse est que l'ajout de l'eau de Rampillon a amené d'autres espèces dénitrifiantes au sein du milieu liquide qui ont permis une augmentation importante de la dénitrification sans que cette dernière ne soit de nature électrochimique.

- L'autre hypothèse est que la nature exo-électrogène des bactéries est directement impliquée dans cette différence. Comme expliqué précédemment, l'étude de Pous *et al.* met en lumière la présence d'un biofilm dominé par *Thiobacillus denitrificans* mais pas exclusivement composé de cette espèce (70 % parmi les bactéries possédant les gènes de la dénitrification sont de cette espèce). De fait, on peut émettre l'hypothèse que c'est le caractère exo-électrogène de *Thiobacillus denitrificans* qui cause cette différence d'efficacité de dénitrification et que celle-ci n'est possible qu'en présence d'autres espèces présentes au sein d'un biofilm mixte ayant colonisé l'électrode. Cette forme d'électro-assistance pourrait être apportée par les bactéries provenant de l'eau de Rampillon. Afin de tester ces hypothèses, il est nécessaire d'étudier les électrodes polarisées de chacun des deux pilotes dans un nouveau milieu ne contenant pas d'inocula dans l'optique de mettre en évidence une réponse électro-chimique au nitrate et tenter de lier cette réponse à une augmentation de l'efficacité de la dénitrification.

➤ Deuxième partie

2) Matériel et Méthodes - Deuxième Partie

- Etude en chronoampérométrie

La première étape a été d'étudier les électrodes en chronoampérométrie avec ajout en nitrate. Les deux électrodes ont été prélevées de leur précédents milieux et transférées dans un milieu d'incubation renouvelé (le même que celui utilisé dans la première partie mais sans les nitrates en début de chronoampérométrie) au sein d'un nouveau pilote en verre. Les chronoampérométries ont alors été réalisées à -0,5 V vs ECS pendant 10 heures avec un ajout en nitrates à 2 heures de chronoampérométrie pour une concentration finale de 10 mM (620 mg.L⁻¹ de NO₃⁻), le tout sous air ambiant.

Au vu des résultats, une deuxième phase de chronoampérométrie a été faite mais cette fois-ci dans le même milieu d'incubation contenant les 10 mM de NO₃⁻ dès le début de la chronoampérométrie, le tout dans un pilote en verre de 40 mL contenant 20 mL de milieu d'incubation sous air ambiant. Cette étape comporte plusieurs phases de chronoampérométrie et d'incubation sans polarisation (en laissant les électrodes dans le même milieu). La première chronoampérométrie a été lancée à -0,5 V vs ECS pendant 32 heures puis les électrodes ont été laissées à incuber sans polarisation pendant 34 heures avant de relancer la chronoampérométrie pendant 32 heures puis laissée à nouveau à incuber sans polarisation pendant 42 heures. Cette phase comprend également un suivi des concentrations en nitrate au cours du temps via le protocole de l'acide salicylique déjà décrit dans la partie précédente (voir Partie I, Matériel et Méthodes, suivi des concentrations en nitrates). Le protocole est résumé Figure 9.

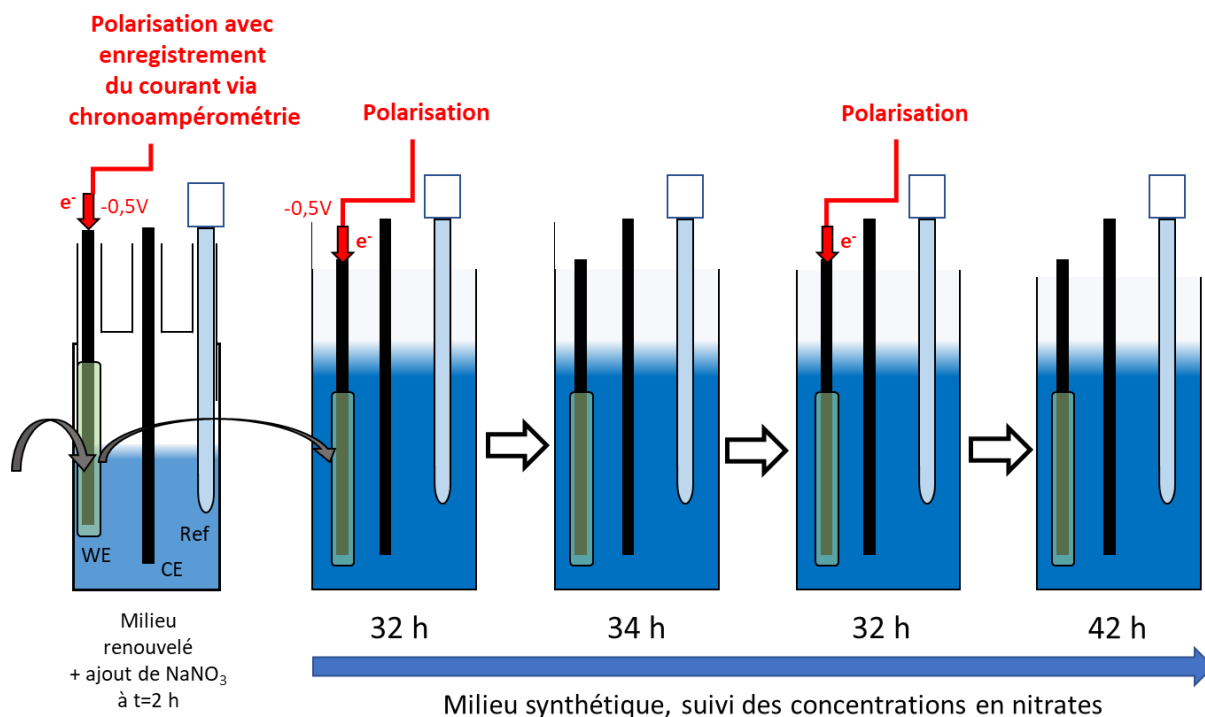


Figure 9 : Description du protocole d'étude effectué sur la biocathode développée durant la première partie (30 jours d'incubation sous polarisation). Une première étude est faite via une chronoampérométrie de 10 heures avec ajout de NaNO_3 afin de vérifier si une réaction est visible sur chronoampérométrie et sur voltamétrie cyclique. La bio-cathode est ensuite transférée dans un milieu d'incubation renouvelé et subira une succession de phases de polarisation et d'incubation sans polarisation avec suivi des concentrations en nitrate sur toute la durée de cette étude.

- Etudes en voltamétrie cyclique

Des études en voltamétrie cyclique sont pratiquées régulièrement. L'électrode de référence est toujours indiquée sur les voltamogrammes présentés. La vitesse de balayage peut varier et reste toujours indiquée également. Toutes les études ont été faites via un potentiostat Metrohm® (PGSTAT 302N).

- Analyse des communautés microbiennes des biofilms des électrodes

A la suite des analyses électro-chimiques va suivre l'analyse des communautés microbiennes présentes sur l'électrode du premier pilote (avec comme inocula la culture pure *Thiobacillus denitrificans* + l'eau de Rampillon). Cette analyse comporte plusieurs étapes à savoir l'extraction de l'ADN du biofilm bactérien, l'amplification du gène codant pour l'ARNr 16S suivi de son séquençage et enfin le traitement des données obtenues via des outils bio-informatiques. Toutes ces étapes vont permettre d'identifier les espèces procaryotes présentes sur l'électrode ainsi que leur proportion relative. Chaque étape est détaillée ici afin d'offrir une vision globale de ce protocole fondamental dans le domaine de l'écologie microbienne.

1. Explication du principe général

En premier lieu il convient d'expliquer brièvement le principe du séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S. Toutes les bactéries et les archaea possèdent un chromosome composé d'ADN au sein duquel se trouve toujours un gène codant pour la sous-unité de l'ARN ribosomique 16S. Toutes les bactéries possèdent ce gène et certaines parties de celui-ci sont invariables d'une espèce à l'autre alors que d'autres vont varier en fonction de l'espèce de la bactérie ou de l'archaea.

Ce gène étant présent chez tous les procaryotes connus avec des parties variant d'une espèce à l'autre, il a alors été utilisé par les microbiologistes comme une sorte de carte d'identité spécifique à chaque espèce de procaryotes. Le principe du séquençage est d'extraire l'ADN bactérien global d'un échantillon avant d'amplifier le gène codant pour l'ARNr 16S via le protocole de PCR ou *polymerase chain reaction* en conservant la proportion relative de ce gène par espèces puis de le séquencer (connaître le code génétique de chaque partie amplifiée) et enfin d'attribuer à chacun d'entre eux une espèce procaryote en se servant des bases de données. Le protocole de chaque étape peut varier selon les besoins et les habitudes des équipes et ceux utilisés dans cette étude seront donc détaillés ici.

2. Extraction de l'ADN du biofilm bactérien

La première étape afin de connaître les espèces bactériennes ou archaea présentes sur l'électrode est l'extraction de l'ADN total de tous les organismes présents sur l'électrode (Figure 10). Pour cela, un kit commercial spécifiquement destiné à cette finalité a été utilisé. Le kit en question est le PowerBiofilm DNA isolation kit (cat : 24000-50)[®] du fabricant MO BIO. L'électrode du pilote 1 a été grattée et le biofilm ainsi prélevé a été utilisé comme échantillon. Le protocole fourni avec le kit a ensuite été suivi et le produit final obtenu est l'ADN total dilué dans une solution (brevetée, composition non connue) permettant sa conservation au mieux. Une estimation de la concentration en ADN a ensuite été obtenue via l'appareil Nanodrop[®] qui estime la concentration en ADN via spectrométrie d'absorption à une longueur d'onde correspondant à la zone d'absorbance des composants de l'ADN (260 nm).

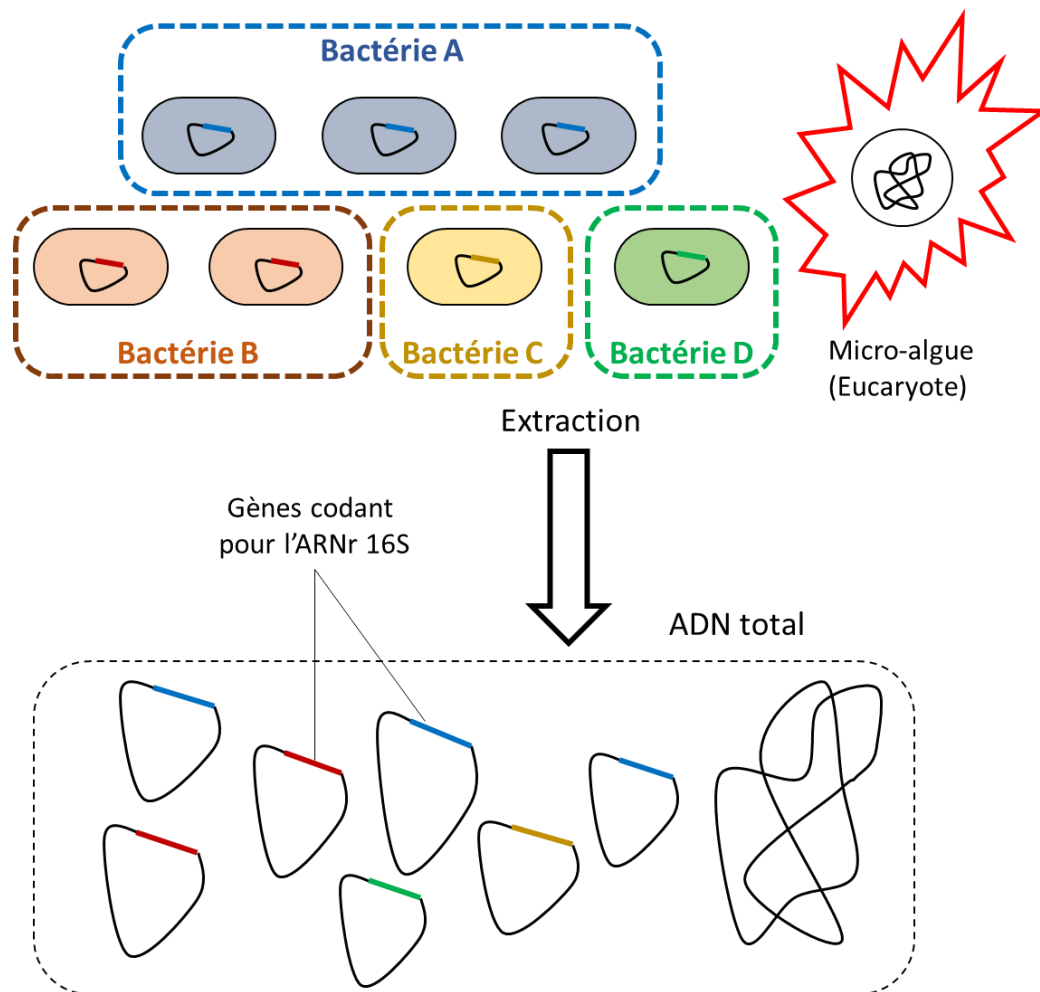


Figure 10 : Schéma résumant la première étape du séquençage de l'ARNr 16S, à savoir l'extraction de l'ADN à partir d'un échantillon. Dans le cas présent, l'échantillon est un biofilm ayant colonisé l'électrode du pilote 1. L'ADN total sera extrait, y compris celui des organismes non procaryotes (eucaryotes et possiblement virus).

3. Amplification du gène codant pour l'ARNr 16S et séquençage des amplicons

La deuxième étape du protocole est l'amplification du gène qui nous intéresse : le gène codant pour l'ARNr 16S (Figure 11). Seule une petite partie du gène sera amplifiée, à savoir les régions variables, encadrées par des régions invariables qui serviront de point d'ancrage pour les primers (ou amorces), de courtes chaînes d'ADN synthétiques. L'amplification est possible en se servant d'une protéine nommée l'ADN polymérase qui va permettre de répliquer l'ADN simple brin avec comme départ une courte séquence double brin à savoir le primer couplé à la région ciblée de l'ADN. Le protocole global est nommé PCR (pour Polymérase Chain Reaction) et va consister en une succession de changement de température de l'ADN extrait dans un milieu aqueux contenant à la fois les primers choisis, la protéine de l'ADN polymérase et des

désoxyribonucléoside triphosphate des quatre types (A, T, G et C) qui vont composer les brins nouvellement synthétisés.

Dans notre cas, la région variable choisie pour être amplifiée est la région V4-V5 en se servant des primers 515F (50- Ion Adapter–Barcode–GTGYCAGCMGCCGCGGTA-30) et 928R (50-Ion trP1 adapter–CCCCGYCAATTCMTTTRAGT-30). Le milieu de PCR contient comme base du SuperFi Buffer® (commercial, composition non connue) avec comme ajout 0,2 mM de chaque dNTP (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) et 1 U de Platinum SuperFi DNA Poly-merase (Invitrogen®) avec entre 10 et 50 ng d'ADN extrait de notre bio-cathode dans un volume final de 50 µL.

L'amplification est faite dans l'ordre suivant ; 30 secondes à 90°C pour séparer les deux brins, 10 secondes à 50 °C pour permettre l'attache des amorces (primers), 30 secondes à 72 °C pour la phase d'élongation par l'ADN polymérase, le tout répété 30 fois.

Avant séquençage, une étape intermédiaire est pratiquée : la migration sur gel d'électrophorèse. Cette étape va permettre de séparer les morceaux d'ADN contenus en solution en fonction de leur charge est donc de leur taille (longueur en nombre de paires de bases). Une fois la migration effectuée, on prélève directement sur gel les fragments amplifiés dont la longueur est définie par le choix des différents primers. Cette étape est essentielle car elle permet de ne garder que l'ADN à séquencer et ainsi de se débarrasser du potentiel ADN eucaryote ou viral.

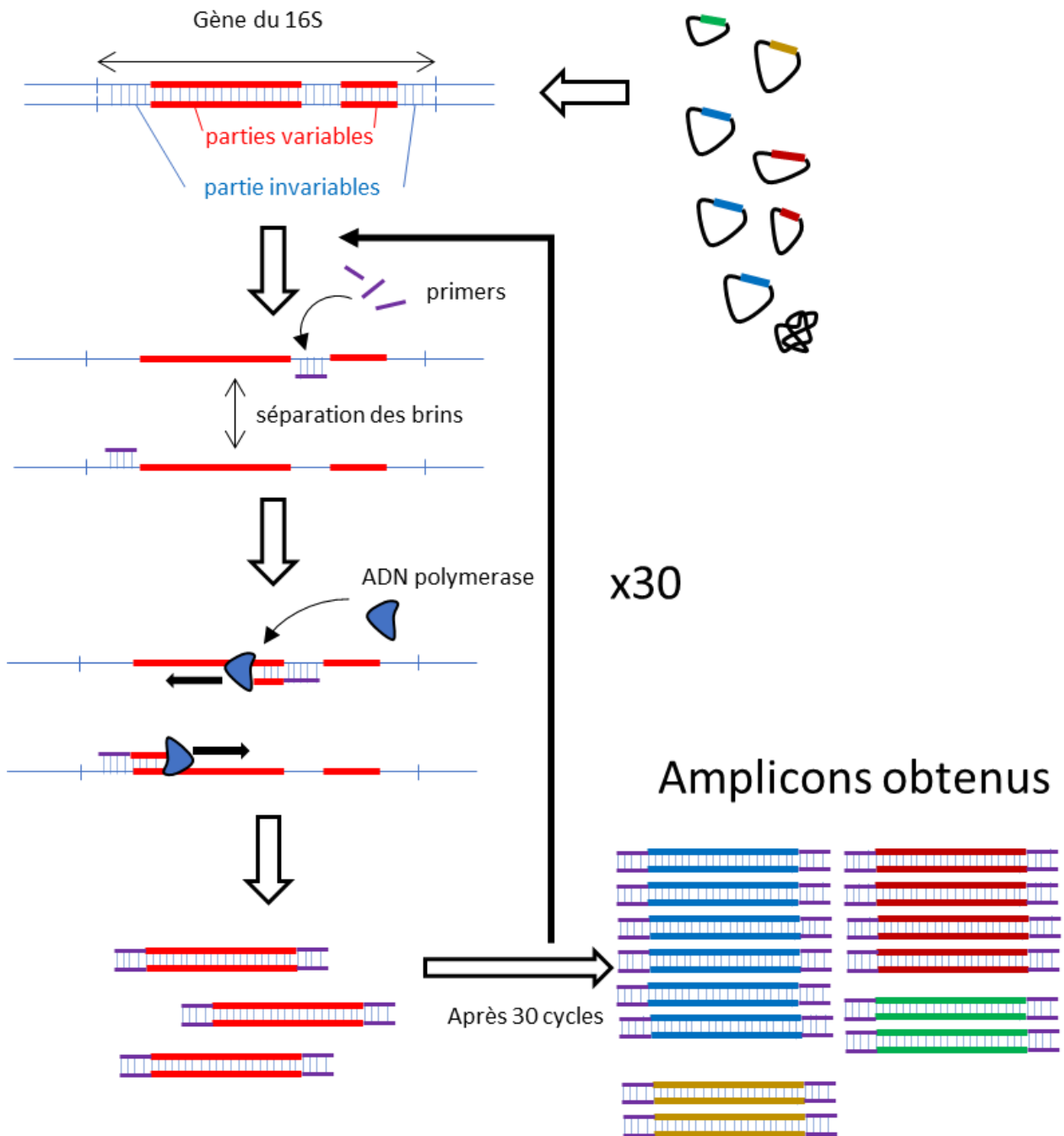


Figure 11 : Schéma explicatif du principe de l'amplification du gène codant l'ARNr 16S par PCR. Cette étape va permettre à la fois d'éliminer le reste de l'ADN total (ADN procaryotique non concerné et ADN eucaryote) mais également d'augmenter la concentration afin de permettre le séquençage. Il faut également noter que les proportions entre espèces sont conservées.

Une fois les séquences amplifiées (appelées amplicons) et isolées, il est possible de les séquencer (Figure 12). Chose bien connue, le code génétique présent dans tous les organismes s'organise selon une succession de base azotée de quatre types (A, T, G et C). L'étape du séquençage va permettre de connaître les séquences exactes de chaque amplicon présent en

solution et de générer un fichier informatique se résumant à un grand nombre de séquences composées de ces quatre caractères. Les détails de l'étape de séquençage sont difficiles à expliquer car il existe plusieurs procédés. Le plus connu et le plus utilisé avant les années 2000 est la méthode de Sanger mais depuis une décennie environ, de nouvelles technologies sont apparues, plus rapides et bien plus performantes que l'on désigne souvent sous le terme de méthodes NGS (New Generation Sequencing methods) dans lesquelles sont incluses par exemple le pyro-séquençage, le protocole Illumina et la méthode du Séquençage Ion Torrent. Or, la large majorité de ces méthodes sont brevetées car mises au point par des entreprises privées et l'utilisation des appareils qui leur sont associées inclue un protocole à suivre avec des produits spécifiques dont la composition n'est pas toujours donnée. Dans notre cas, c'est la méthode de Séquençage Ion Torrent qui a été utilisée, via un Ion 316™ Chip Kit v2 BC de la marque Life Technologies®. Cette méthode se base sur la détection de la libération d'un proton lors de la phase d'élongation d'un brin d'ADN par l'ADN polymérase. Ainsi, comme lors de la PCR, on va séparer les brins d'ADN puis lancer une phase d'élongation par l'ADN polymérase mais cette fois-ci les dNTP (bases azotées) sont ajoutées en flux les unes après les autres (A, T, G puis C) afin que lorsque l'une d'entre elles se lie à sa base complémentaire et relâche un proton, on puisse déterminer de laquelle il s'agit et donc déterminer à terme l'entière séquence de l'amplicon.

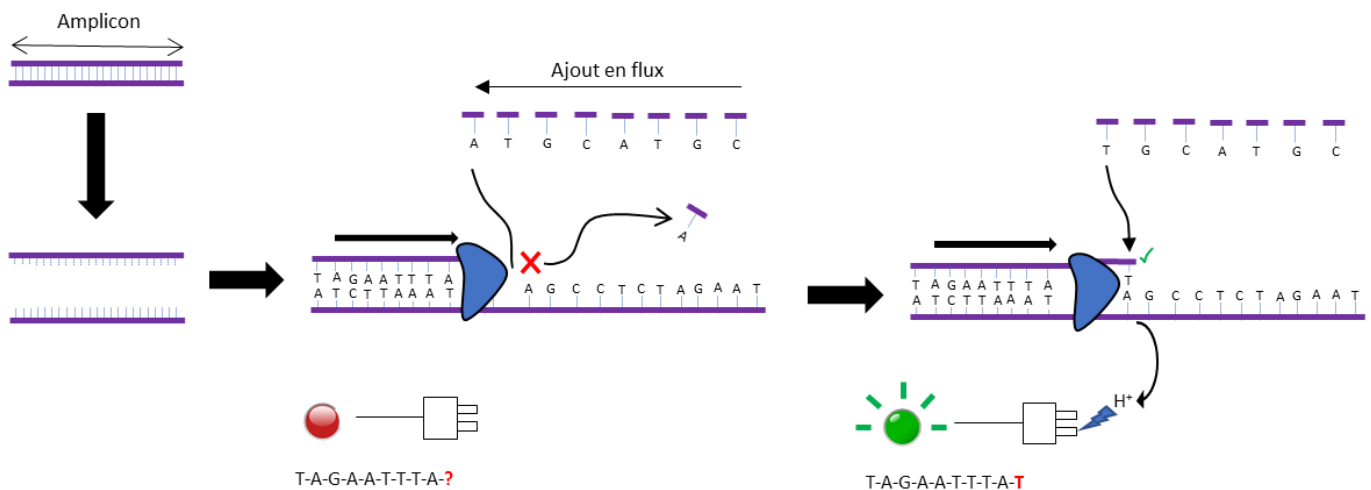


Figure 12 : Schéma simplifié du principe du séquençage via le principe de Ion Torrent

La dernière étape est le traitement des données brutes obtenues via le séquençage (Figure 13, 14 et 15). Une fois le séquençage fait, on obtient alors un fichier informatique contenant des centaines de milliers (parfois plus) de séquences composées de successions des quatre caractères A, T, G et C. Chaque séquence est en fait celle d'un amplicon et les caractères

correspondent chacun à une base azotée (A pour adénine, T pour thymine, G pour guanine et C pour cytosine). Comme expliqué auparavant, ces séquences correspondent donc aux régions du gène de l'ARNr 16S qui varient d'une espèce à l'autre.

Or, depuis la démocratisation des nouvelles méthodes de séquençage, tout un processus collectif et coopératif de la part de la recherche dans le domaine de l'écologie microbienne a été mis en place. Ce processus a consisté à associer ces séquences variables du gène de l'ARNr 16S à des espèces procaryotes précises et à stocker à la fois la séquence en question avec l'identité de l'espèce qui lui est associée, le tout sur des bases de données gratuites et accessibles en ligne. Cette vision d'une science ouverte et collaborative a permis ainsi de bâtir une gigantesque bibliothèque d'espèces avec leur séquence associée du gène de l'ARNr 16S.

Cette dernière étape va donc consister tout d'abord à traiter les fichiers obtenus au terme du séquençage (supprimer les artefacts et les séquences trop courtes ou trop longues), les rassembler (étape dite de clustering) puis de comparer ces séquences à celle de ces bases de données afin d'identifier les espèces auxquelles elles sont associées. Chacune de ces étapes sont faites via une plateforme (intégrant plusieurs logiciels différents) de bio-informatique nommée Galaxy [8].

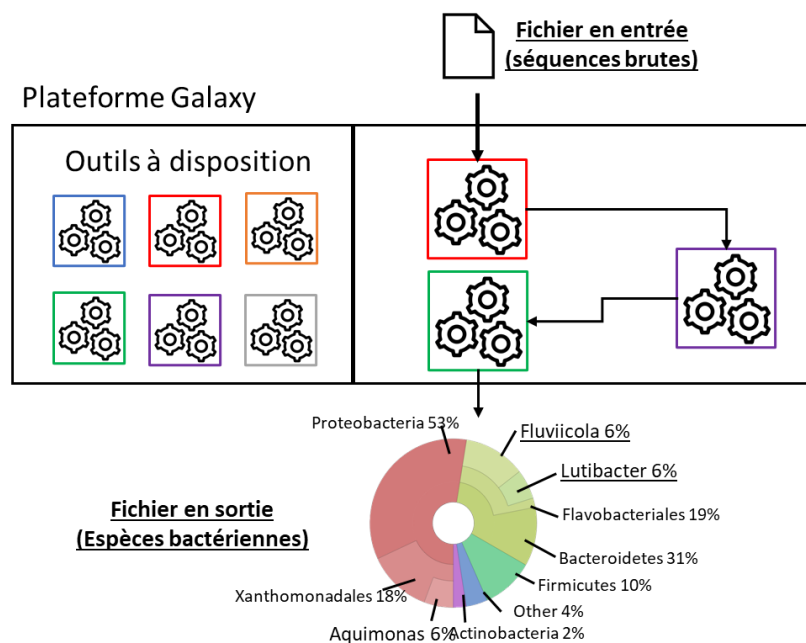


Figure 13 : Schéma du principe de la plateforme Galaxy dans le cadre d'une étude des communautés bactérienne via séquençage du gène de l'ARNr 16S.

Dans le cas présent, un pipeline a été utilisé sur la plateforme Galaxy. Un pipeline est une succession d'opérations réalisées sur le fichier d'entrée (contenant toutes les séquences des amplicons) de façon automatisée. Le pipeline en question est composé d'outils provenant d'un ensemble plus grand nommé FROGS [9]. Cet ensemble d'outils a été développé par une équipe de chercheurs en bio-informatiques de l'INRAe de Toulouse [9]. Chacun de ces outils est disponible et configurable sur Galaxy mais ils ont également leur code source accessible en open-source sur le site web GitHub (<https://github.com/geraldinepascal/FROGS>). GitHub offre de télécharger ce code source (rédigé dans le langage informatique python) et de le modifier.

Outils FROGS disponibles sur Galaxy

Configuration de l'outil choisi sous Galaxy

Code source (en python) de l'outil disponible et téléchargeable sur GitHub

The screenshot displays the Galaxy tool configuration interface for 'FROGS Abundance normalisation'. On the left, a sidebar lists various tools, with 'FROGS Abundance normalisation' highlighted. The main panel shows configuration options for 'Sequence file' (248: FASTQ to FASTA on data 96), 'Abundance file' (257: FROGS BIOM to std BIOM: abundance.biom), 'Number of reads', and 'Email notification' (set to 'No'). An 'Execute' button is visible at the bottom. On the right, the GitHub repository page for 'normalisation.py' is shown, displaying the Python source code for the tool.

Figure 14 : A gauche, est montrée via une capture d'écran le tableau de bord de la plateforme Galaxy avec une liste d'outils accompagnée d'une courte description. Sur la plateforme Galaxy Genouest, plusieurs centaines de ces outils sont disponibles. Chacun de ces outils est également configurable de manière plus ou moins fine. Néanmoins la très grande majorité d'entre eux ont leur code source accessible sur le site GitHub (image de droite). Ce code source peut être téléchargé, modifié et réinstallé dans Galaxy.

Pour cette expérience mais également pour celles qui suivront (les petites modifications d'une expérience à l'autre seront décrites le cas échéant), un pipeline a été développé en utilisant les outils FROGS en suivant les instructions fournies par l'équipe de développement.

Néanmoins, plusieurs modifications ont été réalisées sur les outils en question aussi bien via les options de configuration qu'au niveau du code source lui-même. Il est très important de noter que ces modifications sont avant tout faites pour des raisons de confort, de clarté et d'optimisation et ne change en rien la base du fonctionnement des outils composant le pipeline développé.

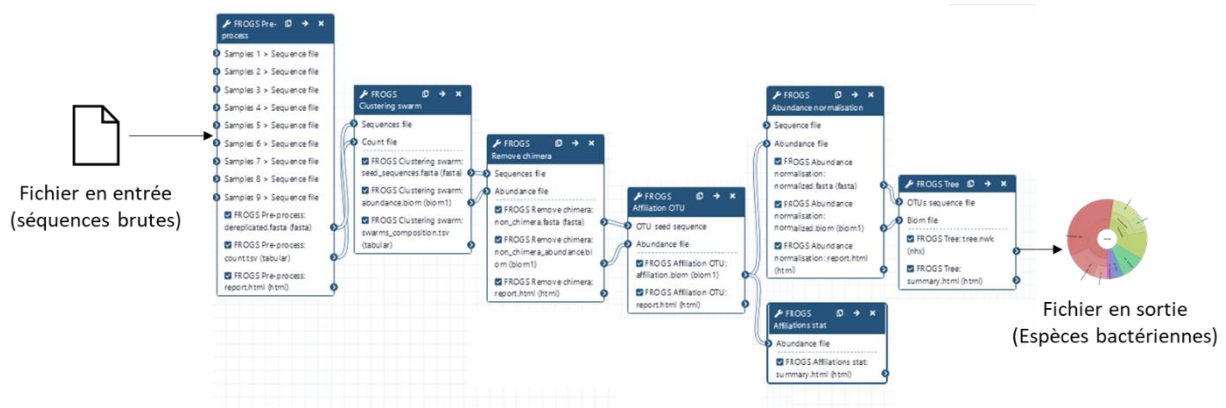


Figure 15 : Représentation du pipeline programmé et utilisé sur la plateforme Galaxy afin d’identifier les organismes auxquels appartient les séquences des amplicons.

Les modifications faites sur les outils ont trois objectifs principaux :

- Arrêter l’attribution au niveau du genre bactérien plutôt qu’à l’espèce. Par exemple si l’espèce *Geobacter sulfurreducens* est présente, seule son genre, autrement dit *Geobacter* sera cité. La raison de ce choix est que la notion d’espèce en microbiologie pose problème pour deux raisons : une très grande majorité des espèces demeurent inconnues à ce jour mais également car deux individus d’une même espèce peuvent avoir des métabolismes relativement différents à un temps t de par les transferts de gènes horizontaux (directement d’individus à individus et non de parent à enfant).
- Ne pas présenter les genres dont l’abondance relative est inférieure à 1 % dans un souci de lisibilité pour la phase d’analyse
- Ne pas prendre en compte les séquences incluant au moins une base azotée non identifiée dans la séquence de l’amplicon (visible dans les fichiers de cette manière : ...ATTCGTTANATCG...)

Comme expliqué précédemment, le principe de cette étude bio-informatique consiste à comparer les amplicons obtenus (séquences du gène codant l’ARNr 16S de nombreux organismes procaryotes) à des bases de données collaboratives existantes regroupant des séquences du gène codant l’ARNr 16S et attribuées à des microorganismes. Ces bases de données sont utilisables sur la plateforme Galaxy via des fichiers compilant celles en libre accès sur des sites web dédiés à la bio-informatique comme par exemple le site du NCBI (National Center for Biotechnology Information). Dans notre cas, c’est la base de données SILVA [10] qui a été utilisée comme référence pour la comparaison avec nos amplicons. Cette base de données est largement reconnue comme fiable par la communauté scientifique (plus de 11 000

citations de la publication d'origine) mais également car elle est très souvent mise à jour par de nouveaux dépôts de séquences avec l'espèce associée.

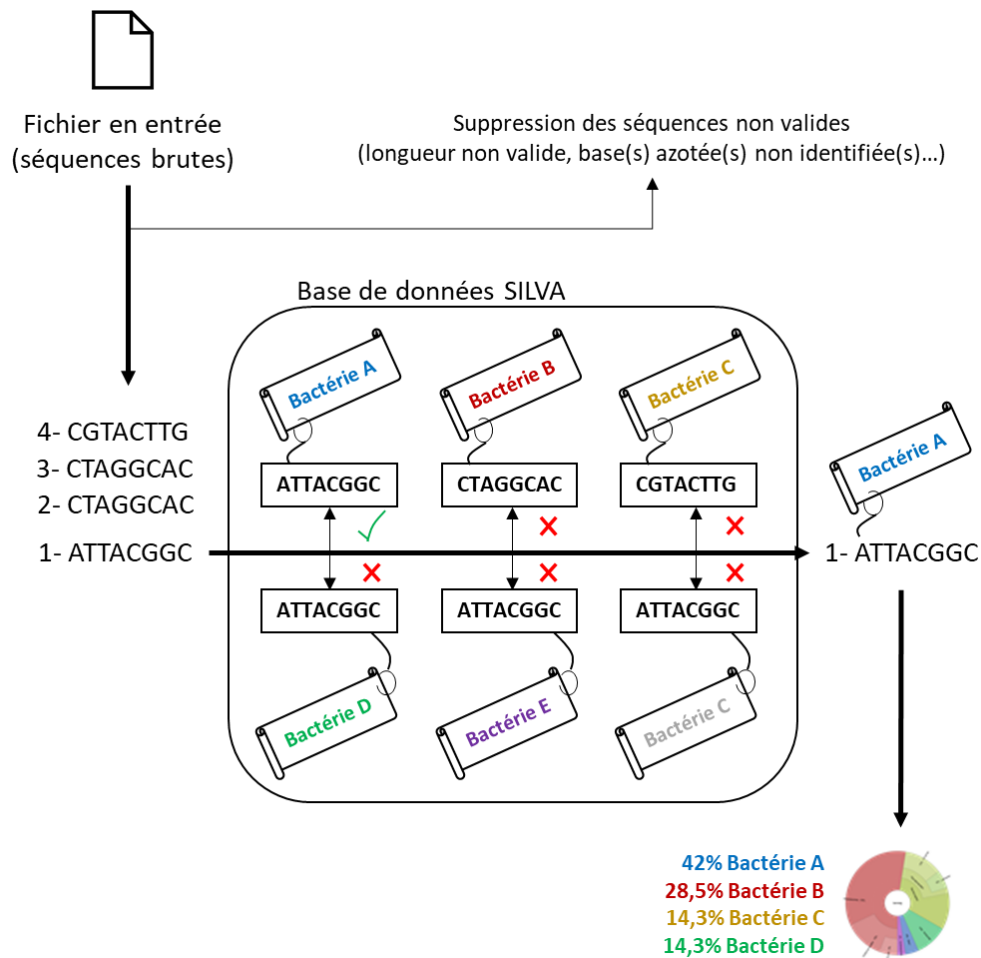


Figure 16 : Schéma simplifié montrant le fonctionnement du pipeline développé avec les outils FROGS de la plateforme Galaxy et en exploitant la base de données SILVA.

Il est à noter que l'abondance relative est conservée parmi les séquences amplifiées. Cela signifie (comme visible sur la Figure 16) qu'il est possible par cette méthode de savoir si un biofilm est dominé par tel ou tel genre de procaryote par rapport à la quantité totale de procaryote. En revanche, il est très important de savoir que les biofilms peuvent parfois inclure des eucaryotes, notamment des plantes et des champignons. Or, ces organismes ne sont pas pris en compte car ne possèdent pas d'ARNr 16S. Ces derniers ne sont donc pas visibles sur les données obtenues en sortie de traitement et il est donc impossible de savoir s'il s'en trouve sur l'électrode via cette méthode.

3) Résultats – Deuxième Partie

Nous avons pu observer une différence significative en termes d'efficacité de la dénitrification entre le pilote ayant comme inocula la culture pure et l'eau de Rampillon et celle n'ayant reçu que la culture pure de *Thiobacillus*. Il est maintenant nécessaire d'effectuer une étude en électro-chimie des deux électrodes polarisées afin de déterminer si cette réduction des nitrates plus importante est bien liée à des bactéries exo-électrogènes captant les électrons depuis l'électrode polarisée.

En premier lieu, une voltamétrie cyclique sans nitrate dans le milieu sera effectuée puis une deuxième sera faite après ajout de nitrate. Entre les deux une chronoampérométrie est lancée afin de vérifier si cet ajout est visible à la fois sur voltamétrie et sur chronoampérométrie.

- Etude en chronoampérométrie et voltamétrie cyclique

Comme expliqué dans la section Matériel et Méthodes, il convient tout d'abord d'étudier la chronoampérométrie de 10 heures à -0,5 V vs ECS sous air ambiant dans un milieu renouvelé (sans nitrate initialement) avec ajout de nitrate à t=2 heures.

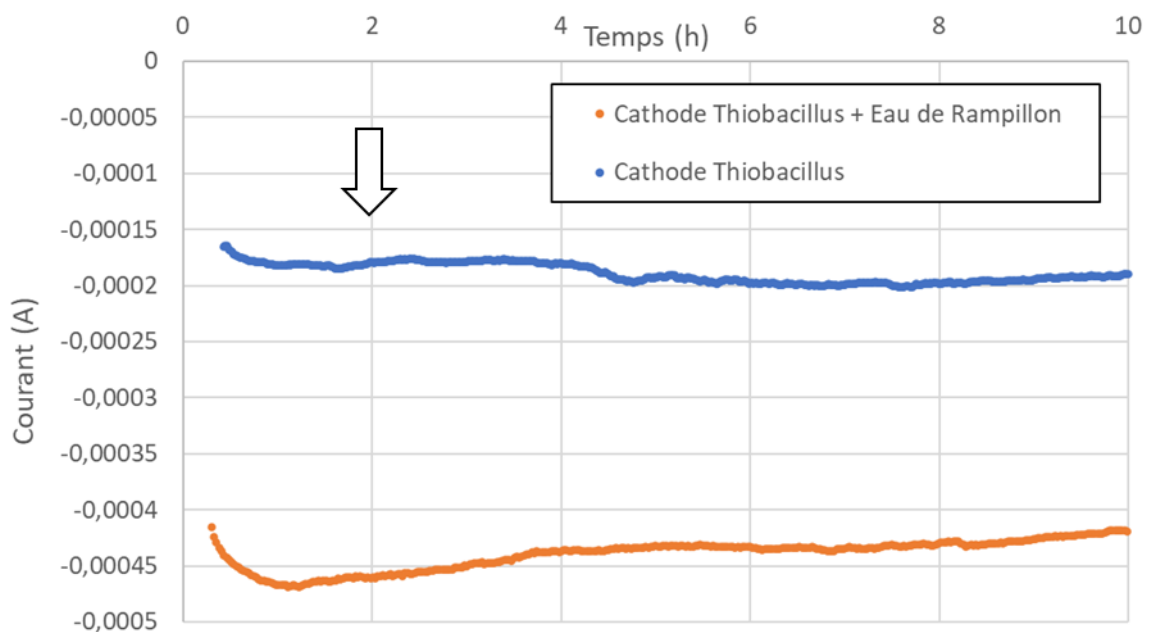


Figure 17 : Evolution du courant sous chronoampérométrie à -0,5 V vs ECS sur deux électrodes de travail des pilotes 1 et 2 (même surface immergée) dans un milieu d'incubation renouvelé (sans nitrate) sous air avec ajout de 10 mM de nitrate à t = 2h (matérialisé par une flèche).

Comme on peut l'observer sur la Figure 17, encore une fois l'ajout de nitrate à $t = 2$ heures de chronoampérométrie ne cause pas d'augmentation du courant de réduction. Cette observation laisse à penser qu'aucune réduction bio-électrochimique du nitrate par les bactéries n'a lieu sur les électrodes. Un point important que l'on peut néanmoins noter est la différence importante de courant entre les deux électrodes.

En effet, l'électrode provenant du deuxième pilote (avec comme inocula seulement la culture pure de *Thiobacillus*) présente un courant de réduction stable aux alentours de 0,2 mA par cm^2 d'électrode immergée. A l'inverse, pour l'électrode qui a été incubée dans le premier pilote avec en plus l'ajout de l'eau de Rampillon, on peut observer un courant de réduction stable autour de 0,4 mA par cm^2 d'électrode immergée soit +100 % de densité de courant.

Durant la précédente expérience (Figure 4, page 71), le courant de réduction visible avant ajout en nitrate avait été assimilé à la réduction de l'oxygène, chose également probable ici mais le niveau de réduction plus important à ce potentiel pour l'électrode du pilote 1 pourrait indiquer une catalyse de la réduction de l'oxygène, possiblement par des bactéries exo-électrogènes. Néanmoins, avant de se pencher sur cette question, il convient de vérifier si la réduction des nitrates de manière bio-électrochimique ne se fait pas à un potentiel différent que celui imposé via la chronoampérométrie, à savoir -0,5 V vs ECS.

Afin de s'assurer de cela, il convient de comparer les voltamétries cycliques sous argon qui ont été faites sur les deux électrodes étudiées avant et après la chronoampérométrie et donc en absence et présence de nitrate dans la solution d'incubation.

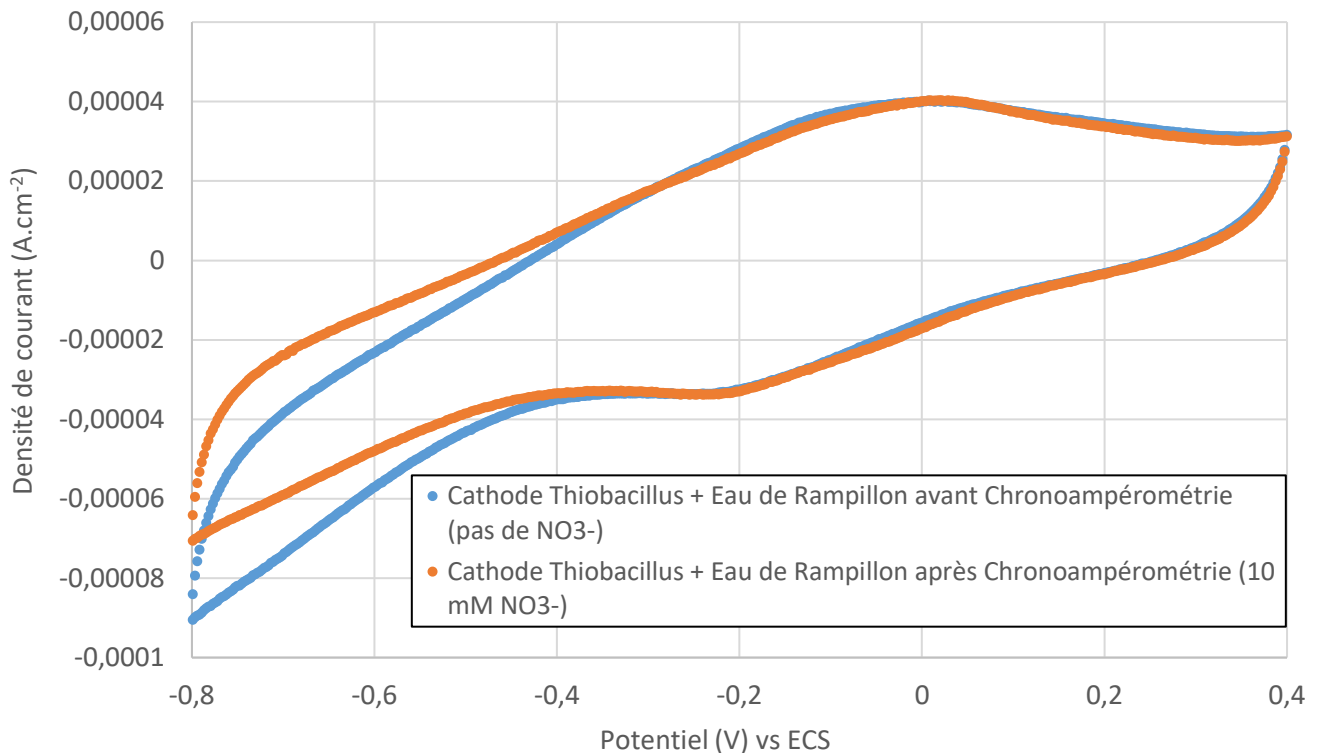


Figure 18 : Voltamétrie cyclique à 1 mV.s^{-1} sous argon de l'électrode du pilote 1 dans son milieu d'incubation renouvelé avant la chronoampérométrie (montrée Figure 17 sans nitrate) et après la chronoampérométrie et donc ajout de 10 mM de nitrate de sodium dans le milieu.

La voltamétrie cyclique montrée sur la Figure 18 tend à démontrer que la réduction bio-électrochimique des nitrates au niveau de l'électrode est bel et bien absente. En effet, si on peut observer une différence de réduction à $-0,4 \text{ V}$ vs ECS, cette dernière ne peut pas correspondre à celle des nitrates car c'est en absence de nitrate de sodium (courbe bleue) que le courant de réduction observé est le plus important. De fait, cela ne peut pas correspondre à la réduction bio-électrochimique des nitrates.

La nature exacte de cette réduction observable à partir de $-0,4 \text{ V}$ vs ECS (Figure 18) est difficile à identifier de façon claire mais il est envisageable qu'elle soit due à la présence d'oxygène résiduel dans le milieu où a été faite la voltamétrie cyclique. La confirmation sera obtenue lors des études en voltamétries cycliques sous air ambiant et sous saturation à l'oxygène (détaillées plus loin). Quoiqu'il en soit, on peut désormais affirmer que la réduction bio-électrochimique des nitrates n'est pas présente. Or, la claire différence d'efficacité en termes de dénitrification entre les électrodes des deux pilotes (visible sur la Figure 8 page 78) montre que l'ajout d'eau

de Rampillon a bien un effet sur le de réduction des nitrates. Manifestement, parmi les deux hypothèses émises précédemment (page 79), c'est la deuxième qui semble se confirmer, soit le fait que cette meilleure dénitrification est avant tout liée à des métabolismes dénitrifiant non exo-électrogènes apportés par les espèces présentes dans l'eau de Rampillon.

Bien que l'efficacité de la dénitrification soit moins importante dans le cas du pilote 2 n'ayant reçu comme inocula que la culture pure de *Thiobacillus*, il reste important de vérifier si une réduction bio-électrochimique des nitrates est présente à la surface de l'électrode polarisée.

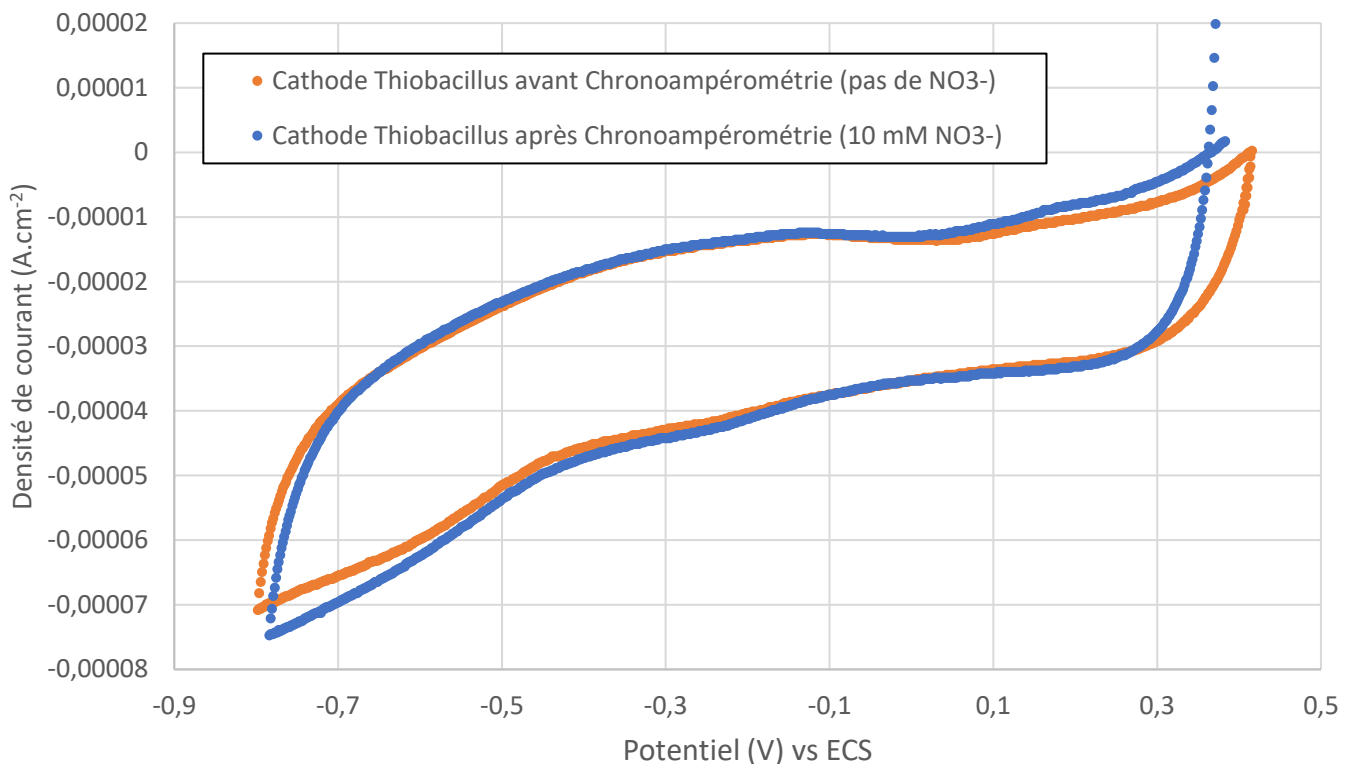


Figure 19 : Voltamétrie cyclique à 1 mV.s^{-1} sous argon de l'électrode du pilote 2 dans son milieu d'incubation renouvelé avant la chronoampérométrie (montrée Figure 17 sans nitrate) et après la chronoampérométrie et ajout de 10 mM de nitrate de sodium dans le milieu.

Comme on peut le voir Figure 19, l'électrode du deuxième pilote ne montre aucune réaction à l'ajout de nitrate de sodium en matière de courant de réduction indiquant qu'il n'y a aucun biofilm exo-électrogène réducteur de nitrate.

Ainsi, il semble à première vue que la différence d'efficacité en termes de dénitrification n'est pas due à la réduction bio-électrochimique des nitrates présents dans le milieu d'incubation. Néanmoins, au vu de la différence importante du niveau de courant de réduction visible durant la chronoampérométrie à $-0,5 \text{ V}$ vs ECS (Figure 17), une étude de la réduction de l'oxygène reste importante à faire.

Pour cela, une étude en voltamétrie cyclique des deux électrodes a été faite en simple tampon phosphate (100 mM de K_2HPO_4 et de KH_2PO_4) sous trois conditions : sous air ambiant, sous argon et sous oxygène. Les résultats obtenus sont ensuite comparés avec ceux d'une électrode de graphite (même modèle, barreau de 0,5 cm de diamètre) nue, donc sans incubation préalable et donc sans bactéries à sa surface.

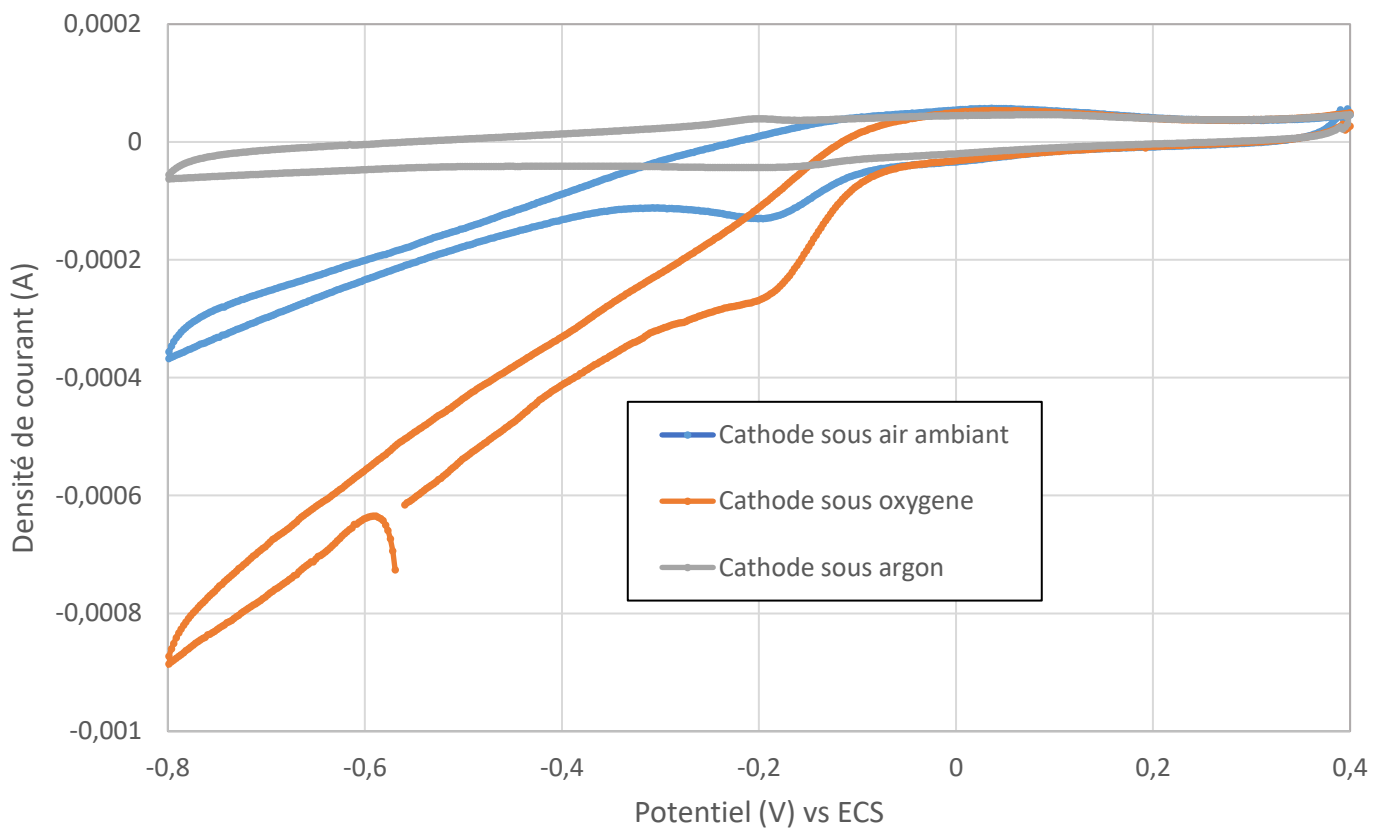


Figure 20 : Voltamétrie cyclique de l'électrode du pilote 1 (*Thiobacillus* + Eau de Rampillon) à $1 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ sous argon, sous air ambiant et sous oxygène dans un tampon phosphate (100 mM de K_2HPO_4 et de KH_2PO_4).

Comme on peut le voir sur cette voltamétrie montrée Figure 20, on observe une augmentation du courant attribuée à la réduction du dioxygène. Cette réduction commence aux alentours de -0,1 V vs ECS.

Il est à noter que comme expliqué précédemment, le dioxygène peut se réduire sur graphite nu. Ainsi, afin de vérifier si la biocatalyse de la réduction de O_2 est bel et bien présente sur cette électrode du premier pilote, il est nécessaire de comparer cette étude avec une électrode de graphite nu.

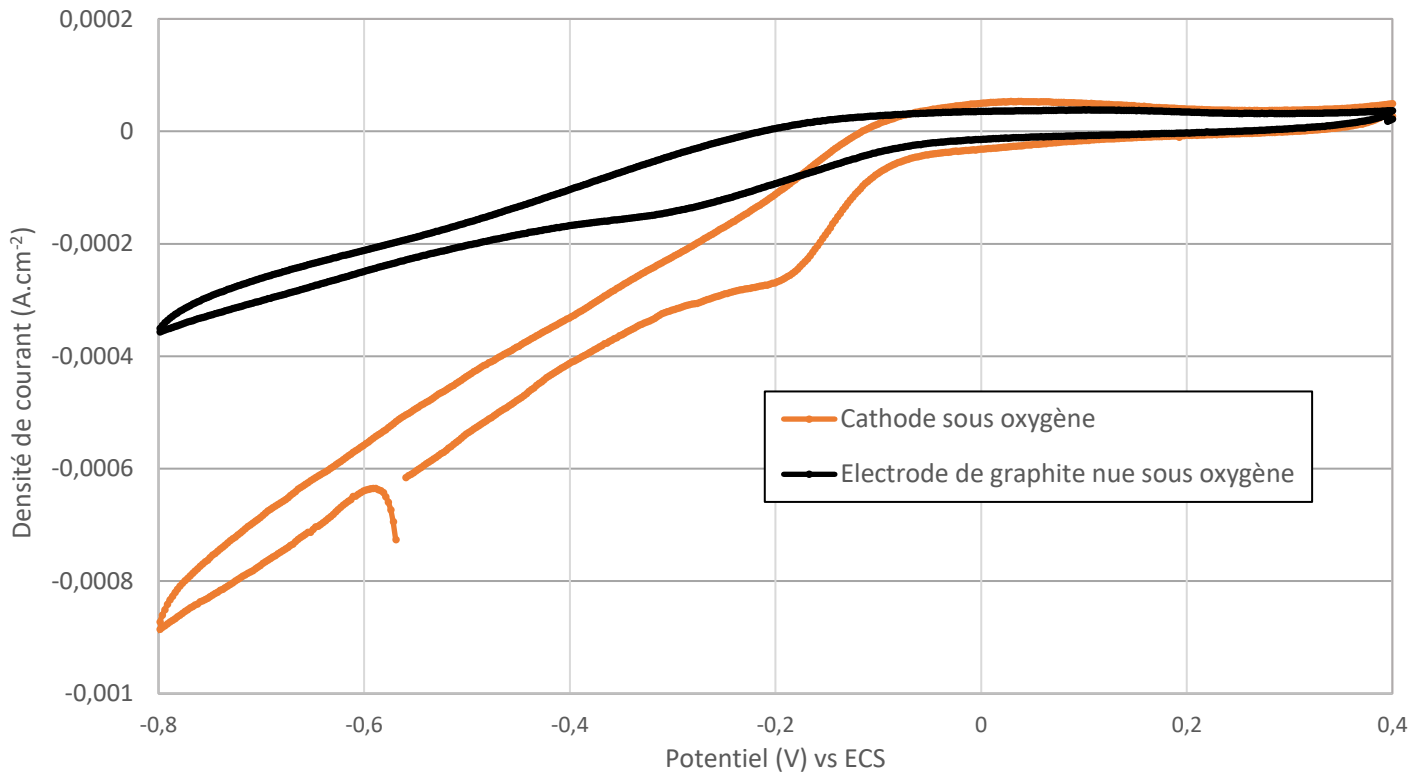


Figure 21 : Comparaison des voltamétries de l'électrode du pilote 1 (*Thiobacillus* + Eau de Rampillon) et de celle d'une électrode en graphite nu à 1 mV.s^{-1} dans un tampon phosphate (100 mM de K_2HPO_4 et de KH_2PO_4) sous saturation à l'oxygène.

Comme visible sur la Figure 21, en comparant la densité de courant liée à la réduction de l'oxygène entre notre cathode (*Thiobacillus* + Eau de Rampillon) et une simple électrode de graphite nue comme contrôle, on peut clairement visualiser une différence en termes de courant de réduction pour la réduction de l'oxygène. En effet, si l'on se place au potentiel utilisé lors de la chronoampérométrie ($-0,5 \text{ V}$ vs ECS), on obtient une densité de courant d'environ $-0,2 \text{ mA.cm}^{-2}$ pour l'électrode de graphite nue et $-0,5 \text{ mA.cm}^{-2}$ pour notre biocathode, soit une augmentation de la densité de courant d'environ 150 % à ce potentiel, causée par la présence d'un biofilm bactérien.

On peut alors en arriver à la conclusion qu'il y a clairement une biocatalyse de la réduction de l'oxygène pour cette bio-cathode. Reste à déterminer si cette catalyse est également présente ou non pour la cathode du deuxième pilote (avec uniquement la culture pure *Thiobacillus* comme inocula).

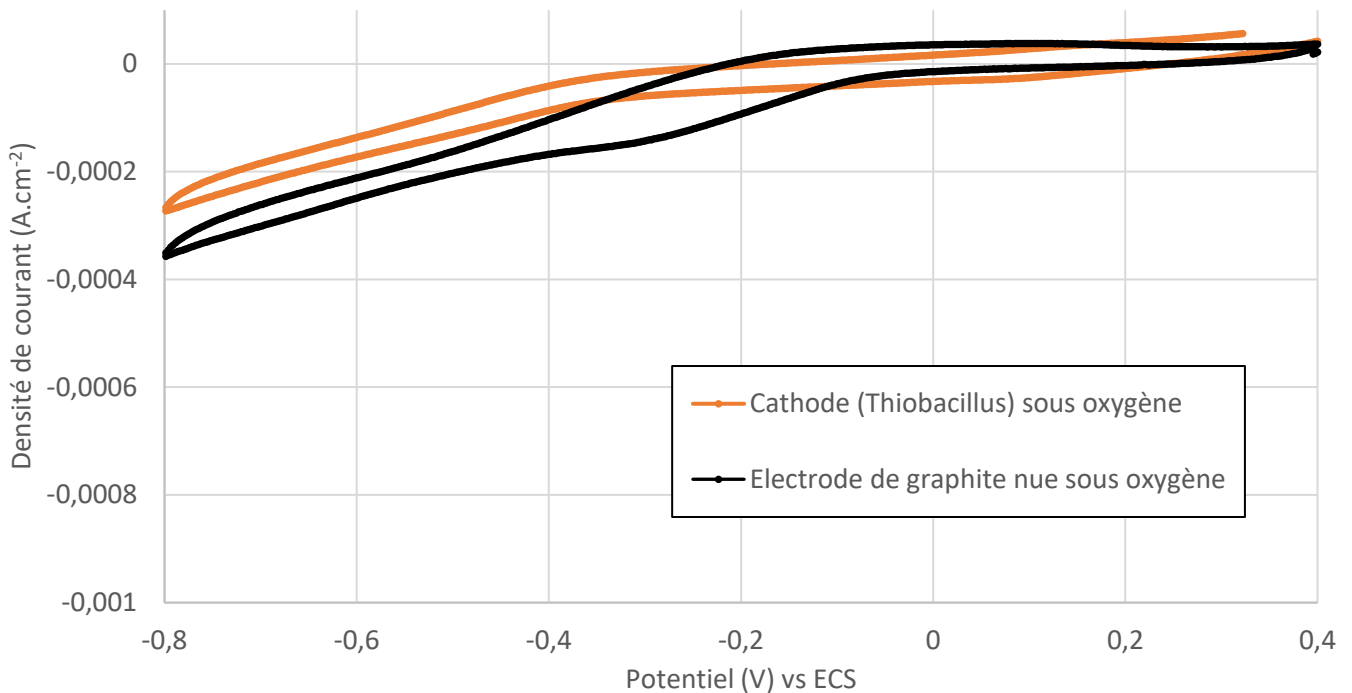


Figure 22 : Comparaison des voltamétries de l'électrode du pilote 2 (*Thiobacillus*) et de celle d'une électrode en graphite nu à 1 mV.s^{-1} dans un tampon phosphate (100 mM de K_2HPO_4 et de KH_2PO_4) sous saturation à l'oxygène. L'échelle est conservée entre les Figure 21 et 22 pour faciliter la comparaison entre les deux.

Via la Figure 22, on constate que contrairement à la première cathode incluant de l'eau de Rampillon comme inocula, la deuxième bio-cathode développée ne semble pas montrer de biocatalyse de la réduction de l'oxygène et montre même une légère diminution du courant lié à cette réduction. Ce résultat peut se montrer étonnant car si une biocatalyse de la réduction de l'oxygène par des organismes exo-électrogènes est documentée, celle d'une inhibition de cette réduction à la surface où se développe le biofilm en question est n'est pas documentée.

Néanmoins il faut noter que cette diminution est globalement très basse, notamment lorsqu'on la compare à l'augmentation dans le cas de bio-cathode du premier pilote. En effet, à $-0,5 \text{ V}$ vs ECS, dans le cas de la deuxième bio-cathode (*Thiobacillus* seul) on passe d'une densité de courant de $-0,0002 \text{ A.cm}^{-2}$ pour l'électrode témoin à $-0,00015 \text{ A.cm}^{-2}$ soit une diminution de 25 % alors que pour la première bio-cathode (*Thiobacillus* + eau de Rampillon) on passe d'une même densité de courant de $-0,0002 \text{ A.cm}^{-2}$ pour l'électrode témoin à environ $-0,0005 \text{ A.cm}^{-2}$, soit une augmentation de 150 %. Nous avons donc d'un côté une biocatalyse très importante de la réduction de l'oxygène pour la première cathode (*Thiobacillus* + eau de Rampillon) et une légère inhibition de cette même réduction pour la deuxième cathode (*Thiobacillus* seule).

- Deuxième étude du suivi de la dénitrification couplée à la polarisation

Bien qu'aucune des deux cathodes développées ne montre de réactions bio-électrochimiques au nitrate, il faut malgré tout se souvenir que dans le cas de la cathode du pilote 1 (*Thiobacillus* + eau de Rampillon) on observe clairement une dénitrification plus importante lors de la phase d'incubation (Figure 8, page 78). De fait, une autre étude en incubation est faite sur cette première cathode afin de déterminer si cette différence est de nature bio-électrochimique ou non. Pour répondre à cette question, une succession de phases sous polarisation et sans polarisation couplées à un suivi des concentrations en nitrate est lancée.

La première cathode a été placée dans 20 mL de milieu d'incubation (détaillée dans la partie Matériel et Méthode de la première partie, page 76) contenant seulement 10 mM de NaNO_3 et sous air ambiant. La polarisation sera faite via le potentiostat analogique (pas d'enregistrement de l'évolution du courant) à $-0,5$ V vs ECS avec comme contre électrode une électrode de graphite neuve.

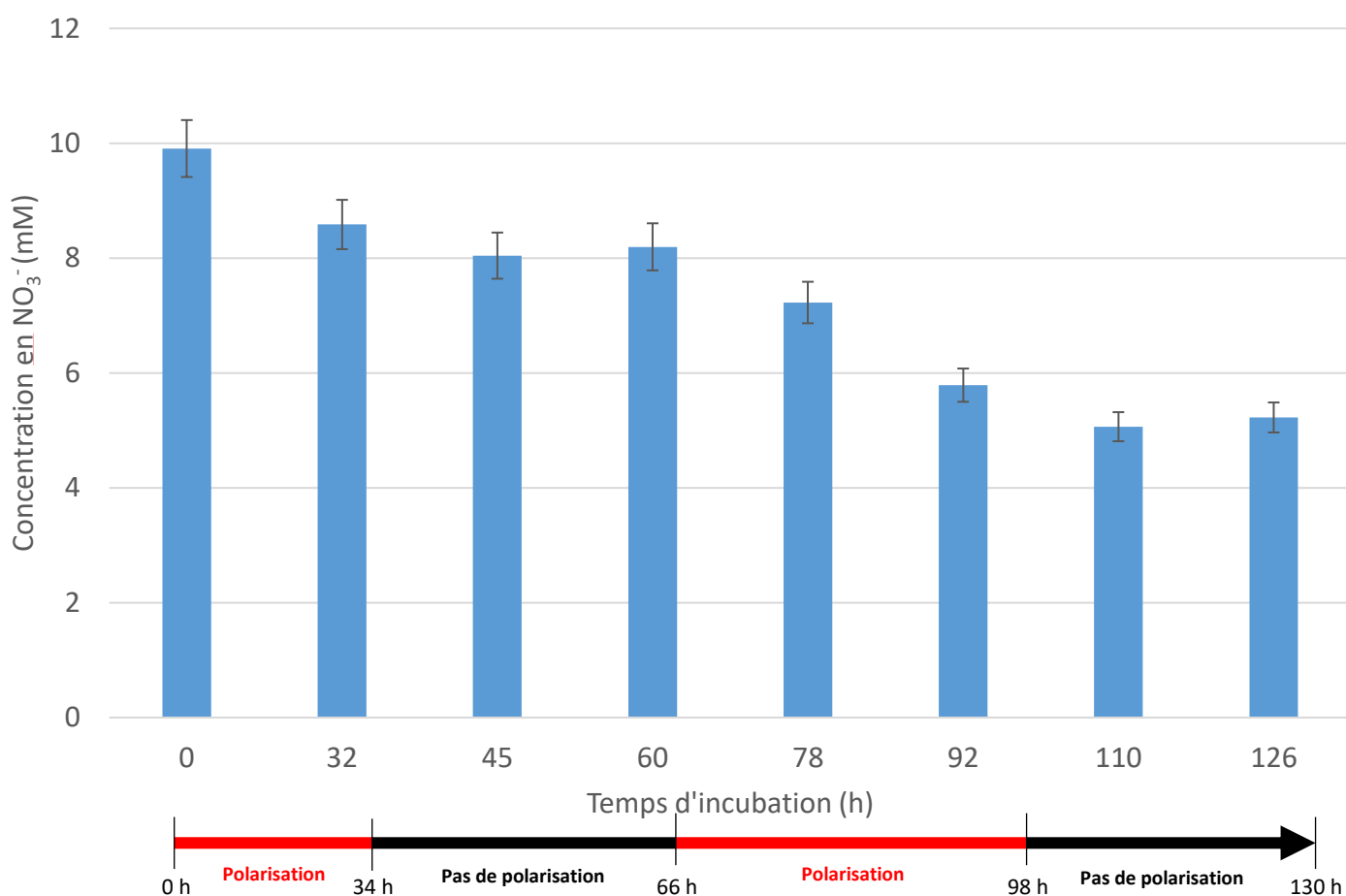


Figure 23 : Evolution des concentrations en nitrate du milieu d'incubation en fonction de la polarisation de la cathode du pilote 1 (*Thiobacillus* + Eau de Rampillon) à $-0,5$ V vs ECS sous air ambiant.

Comme visible sur la Figure 23, il y a une claire corrélation entre la polarisation de la cathode et l'évolution des concentrations en nitrate. En effet on peut observer que l'élimination des nitrates du milieu d'incubation est plus importante lorsque l'électrode est polarisée et ralentie lors de l'absence de polarisation. Sur la première période de polarisation, on observe une diminution de la concentration en nitrate d'environ 2 mM (soit 2,48 mg de NO_3^- à l'échelle du pilote) pour une durée de 34 heures. La phase suivante de 32 heures sans polarisation ne montre aucune diminution notable de la concentration. La deuxième phase, elle aussi sous polarisation à -0,5 V vs ECS montre une diminution d'environ 2,3 mM de nitrate (soit 2,85 mg à l'échelle du pilote) toujours pour 32 heures.

Ce résultat est étonnant car lors des études précédentes, aucune réaction à l'ajout en nitrate n'était visible aussi bien sur chronoampérométrie (Figure 17) que sur voltamétrie cyclique (Figure 18). Pourtant on peut clairement affirmer qu'il existe un lien entre polarisation (de nature bio-électrochimique) et l'efficacité de la dénitrification. Afin de mieux saisir la nature de ce lien, étudier la communauté bactérienne composant le biofilm présent sur l'électrode est fondamental. La cathode du pilote 1 (*Thiobacillus* + Eau de Rampillon) mais également celle du pilote 2 (*Thiobacillus* seule) montrant des résultats prometteurs a donc été étudiée via séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S.

- Etude des communautés bactériennes présentes sur la cathode du pilote 1 et du pilote 2

Comme expliqué dans la section Matériel et Méthodes, la première étape consiste à extraire l'ADN du biofilm présent sur les deux cathodes en question. A cette fin, ces dernières sont grattées à l'aide d'un scalpel pour prélever le biofilm présent à leur surface.

Pour ce qui est de la bio-cathode incluant à la fois la culture pure *Thiobacillus* + Eau de Rampillon, environ 70 % de la surface immergée durant la phase d'incubation est ainsi grattée et le biofilm est ensuite placée dans un tube à part. Après que l'étape du grattage ait été faite, on peut alors étudier à nouveau la cathode en voltamétrie cyclique afin de visualiser s'il existe une différence avant et après grattage dans l'optique de confirmer le rôle du biofilm en question.

Dans notre cas, c'est la réduction de l'oxygène qui est la réaction catalysée par le biofilm, c'est donc sur cette réaction que la comparaison sera faite (sous air ambiant) dans un milieu ne contenant que du tampon phosphate.

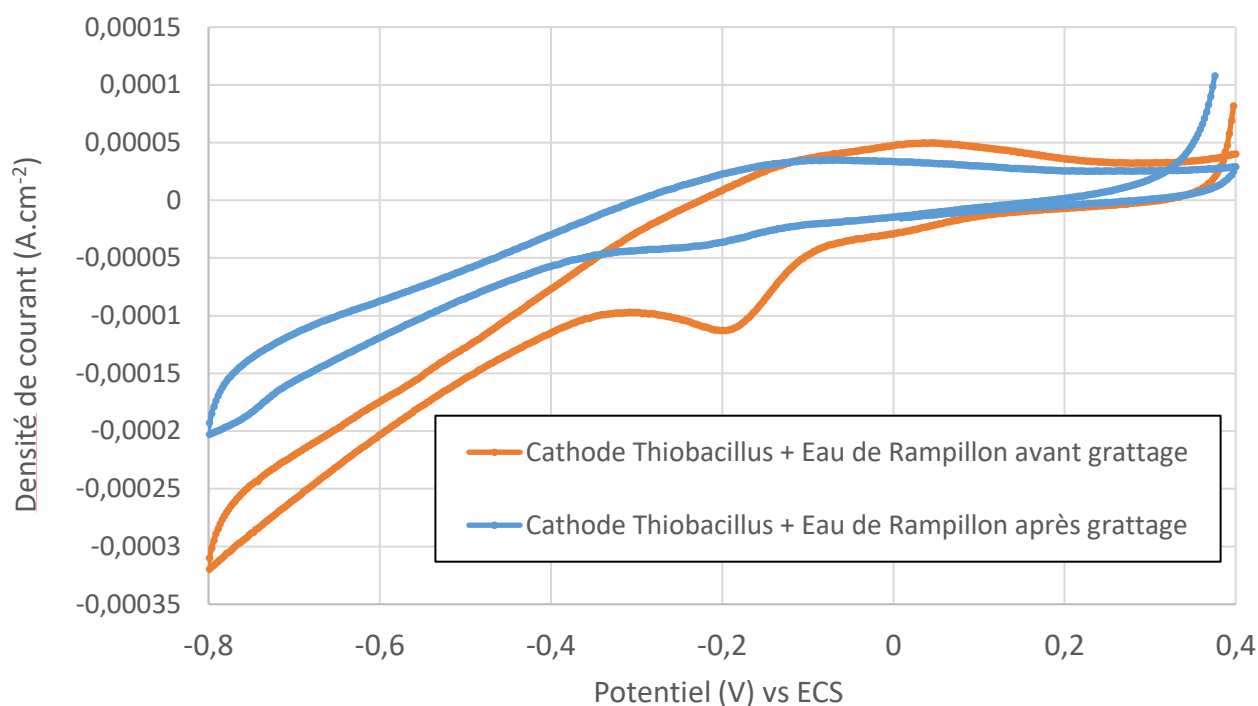


Figure 24 : Voltamétrie cycliques de la cathode dans un tampon phosphate sous air ambiant (100 mM de K_2HPO_4 et de KH_2PO_4) à $1\text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ contre ECS avant et après grattage du biofilm à la surface de l'électrode du pilote 1 (*Thiobacillus* + Eau de Rampillon).

Grâce à cette comparaison on peut clairement visualiser la différence après le grattage du biofilm. En effet, une fois une partie du biofilm enlevé, on peut observer une perte notable de courant de réduction lié à l'oxygène, notamment au potentiel $-0,2\text{ V}$ vs ECS (avec un passage de $-0,1\text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ à $0,03\text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ après grattage, soit une diminution de 70 %). Ce résultat confirme donc que l'augmentation de la réduction de l'oxygène par rapport à une électrode de graphite nue est bel et bien liée à une biocatalyse de nature électrochimique, soit liée à une captation des électrons provenant de l'électrode par des organismes présents à sa surface afin de réduire l'oxygène.

Pour ce qui est du pilote n°2 n'incluant que la culture pure *Thiobacillus*, l'électrode a également été grattée mais après grattage, aucune différence n'est visible sur voltamétrie cyclique entre avant et après prélèvement du biofilm.

Une fois cette étude effectuée, l'ADN des biofilms prélevés par grattage a ensuite été extraits via un procédé décrit dans la partie Matériel et Méthodes. Après une estimation de la concentration de l'ADN extrait via l'appareil NanoDrop pour les deux échantillons, les deux ont été expédiés à l'INRAe de Paris Antony pour l'étape de séquençage. Les fichiers contenant les séquences obtenues ont ensuite été traités sous Galaxy via un procédé de bio-informatique

(décrit dans la partie Matériel et Méthodes). La base de données comparative utilisée pour le blast (alignement entre séquences et base de données) avec les séquences des échantillons de biofilm provenant des électrodes est SILVA 128. Pour ce qui est du fichier fastq obtenu via le séquençage de l'échantillon d'ADN obtenu à partir du pilote n°2 (*Thiobacillus* seul), il ne contient qu'environ 2000 séquences, soit trop peu pour être exploité. Si la concentration d'ADN avait été jugée suffisante lors de l'estimation via Nanodrop mais que le nombre de séquences dans le fichier final est trop bas, cela peut s'expliquer par le fait que la majorité de l'ADN extrait (et quantifié via Nanodrop) n'est pas d'origine procaryote. Ainsi, l'amplification du gène de l'ARNr 16S n'est pas possible, donnant en sortie de séquençage un très petit nombre de séquences dans le fichier. On peut alors émettre l'hypothèse que la majorité des organismes présents sur l'électrode du pilote n°2 puissent être des eucaryotes (notamment des algues) provenant de l'extérieur, le pilote n'étant pas incubé dans des conditions stériles.

A l'inverse, le fichier obtenu à partir du pilote n°1 (*Thiobacillus* + Eau de Rampillon) montre un nombre largement suffisant de séquences (plus de 32 000) pour que les résultats puissent être exploités.

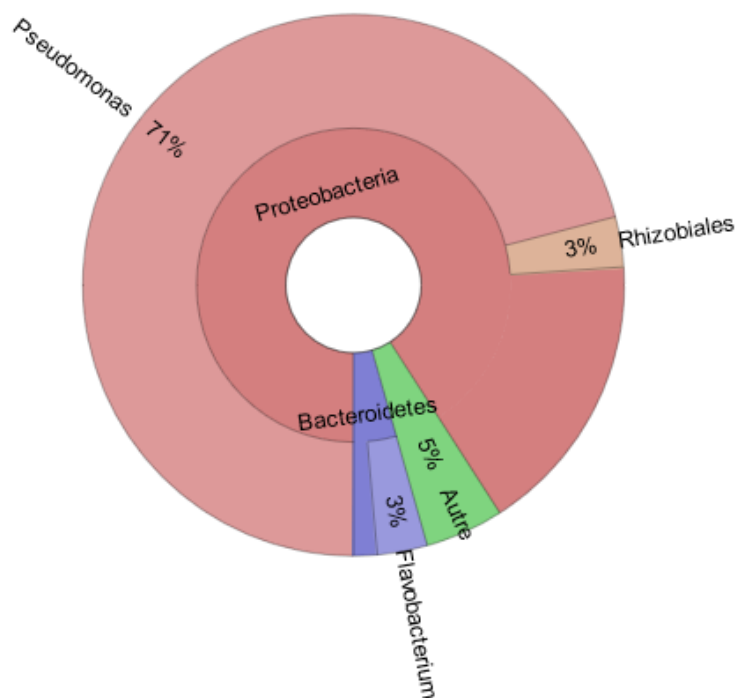


Figure 25 : Représentation sous forme de Krona Pie de la composition des communautés bactérienne du biofilm présent à la surface de la cathode du pilote 1. Le traitement a été fait sous Galaxy et après pré-traitement du fichier, un total de 32 000 séquences considérées comme utilisables ont été blastées à la base de données SILVA. Seuls les genres bactériens avec une prédominance de plus de 3 % sont visibles ici.

Le résultat obtenu après traitement et résumé Figure 25 montre une très large prédominance du genre *Pseudomonas* représentant plus de 71 % des genres bactériens présents. Une prédominance de cette ampleur est relativement rare dans un biofilm développé à partir d'un inoculum naturel à la composition en micro-organismes non contrôlée (ici l'eau provenant de l'étang artificiel de Rampillon).

On peut également noter la quasi-totale absence du genre *Thiobacillus* (0,4 %, non visible sur le Krona Pie) alors que l'inoculum incluait également une culture pure de *Thiobacillus denitrificans*. Cela indique clairement que les conditions physico-chimiques appliquées sur la cathode d'où a été prélevée le biofilm (sous air ambiant, polarisée à -0,5 V vs ECS, sur une électrode de graphite, à pH = 7, etc.) a généré une pression sélective très largement favorable au développement de *Pseudomonas* (provenant vraisemblablement de l'eau de Rampillon) au détriment de *Thiobacillus denitrificans* (apporté via ajout de culture pure).

Ce résultat est en accord avec les résultats électrochimiques obtenus durant l'étude de la cathode du pilote 1. En effet, les voltamétries cycliques ont démontré de manière claire que l'incubation avait permis le développement à la surface de l'électrode en graphite d'un biofilm réduisant bio-électrochimiquement l'oxygène faisant de l'électrode une bio-cathode à oxygène.

Or, il s'avère que cette capacité à capter des électrons depuis une surface solide afin de réduire l'oxygène chez le genre *Pseudomonas* a déjà été étudiée et documentée, notamment chez l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* [11][12][13]. On peut ajouter à cela le fait que certaines espèces appartenant au genre *Pseudomonas* sont capables d'utiliser le nitrate comme accepteur terminal d'électrons lorsqu'elles se trouvent en conditions anaérobie via régulation de leur métabolisme, notamment au niveau de ses transporteurs membranaires chargés du transports des composés azotés [14].

Pour conclure cette partie résultat, on peut résumer plusieurs points importants :

- Une tentative de développer des biocathodes à nitrate a été faite par polarisation à -0,5 V vs ECS de deux électrodes dans un milieu d'incubation sous air ambiant. Deux pilotes ont été lancés : dans le premier pilote ont été ajoutés 1,5 mL de culture pure de *Thiobacillus denitrificans* et 1,5 mL d'eaux naturelles provenant du bassin de Rampillon. Le deuxième pilote a seulement reçu les 1,5 mL de la culture pure de *Thiobacillus denitrificans*.

- Durant l'incubation sous polarisation, une différence notable en termes de dénitrification a été observée entre les deux pilotes. Le premier pilote ayant reçu l'eau de Rampillon a montré une meilleure dénitrification par rapport au deuxième ayant reçu uniquement la culture pure.
- Une étude électro-chimique des deux électrodes des deux pilotes n'a montré aucune bio-électro-réduction du nitrate. En revanche, l'électrode du premier pilote s'est révélée être une biocathode à oxygène avec une évidente catalyse de la réduction de l'oxygène, ce qui n'est pas le cas de l'électrode du deuxième pilote.
- Une étude en chronoampérométrie a démontré que malgré l'absence de bio-électro-réduction du nitrate via la bio-cathode du pilote 1, on observe une claire corrélation entre dénitrification et polarisation lorsqu'elle est incubée sous air ambiant et dans un milieu renouvelé en nitrate. En effet, sur un temps court et dans ces conditions, la dénitrification ne semble possible et efficace que sous polarisation.
- Une étude des communautés bactériennes a montré que le biofilm colonisant cette bio-cathode composée des inocula *Thiobacillus* + Eau de Rampillon et montrant une biocatalyse de la réduction de l'oxygène est très largement dominé par le genre *Pseudomonas*.

4) Hypothèse et Conclusion

Un point saillant de cette étude est la contradiction entre le fait qu'aucune réponse au nitrate n'est visible en voltamétrie et chronoampérométrie pour la cathode du premier pilote et la claire observation que dans un milieu renouvelé ne contenant que la cathode, la dénitrification n'est possible que sous polarisation.

Cette contradiction apparente peut pourtant s'expliquer via une hypothèse somme toute assez simple. Comme expliqué dans l'introduction, les bactéries peuvent parfois utiliser plusieurs composés différents comme accepteur terminal d'électrons. La plupart du temps si la bactérie a le choix entre plusieurs d'entre eux, elle va réguler son métabolisme afin réduire le composé thermodynamiquement le plus favorable. Or, le plus favorable d'entre eux reste le dioxygène (O_2) avec un potentiel thermodynamique pour le couple O_2/H_2O à pH 7 de $E'_0 = 0,81$ V, signifiant que si une espèce se trouve en présence de deux composés pouvant être utilisés comme accepteur terminal d'électrons avec l'un des deux étant l'oxygène, elle va favoriser ce dernier au détriment de l'autre composé.

Si l'on considère que cet autre composé est le nitrate, on se retrouve dans le cas d'une espèce bactérienne qui ne va réduire le nitrate que si le milieu est en condition d'anaérobiose (pas ou très peu d'oxygène présent). C'est notamment le cas pour certaines espèces de *Pseudomonas* qui n'utilisent le nitrate que si l'oxygène est absent du milieu. On peut alors émettre l'hypothèse que la dénitrification visible sous polarisation à $-0,5\text{ V}$ vs ECS est possible car le biofilm de l'électrode se trouve localement en condition d'anaérobiose due à une réduction accrue de l'oxygène par captation des électrons à la surface de l'électrode (réduction bio-électro-chimique par métabolisme exo-électrogène).

Ainsi, en cas d'arrêt de cette polarisation, plus aucun électron ne sera acheminé depuis la contre-électrode et donc la réduction bio-électro-chimique de l'oxygène devient alors impossible. La conséquence est alors une absence de catalyse microbienne de la réduction de l'oxygène si la polarisation est stoppée. Les conditions anaérobiques locales au sein du biofilm seront alors perdues ce qui aura comme conséquence de stopper la dénitrification car l'oxygène redevient alors l'accepteur terminal d'électron le plus favorable par rapport au nitrate pour les bactéries du biofilm.

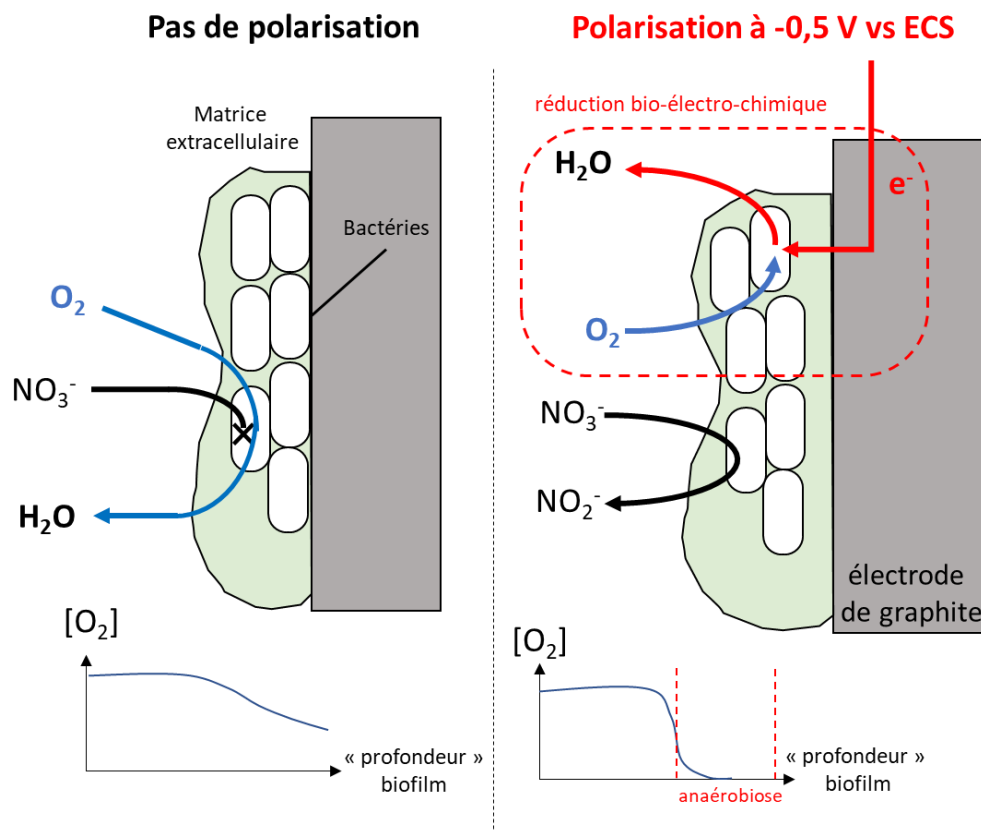


Figure 26 : Schéma explicatif de l'hypothèse expliquée précédemment sur la raison d'une dénitrification possible par le biofilm présent à la surface de la bio-cathode du pilote 1 uniquement sous polarisation à $-0,5\text{ V}$ vs ECS.

Afin de pouvoir vérifier cette hypothèse, il faudrait pouvoir estimer la concentration en oxygène au sein même du biofilm, ce qui est difficile. En effet, lorsqu'elles s'organisent sous forme de biofilm, les bactéries ont tendance à synthétiser ce que l'on appelle une matrice extracellulaire [15]. La composition de cette matrice est extrêmement complexe incluant de l'ADN, ARN, protéines, des polysaccharides ou encore des lipides avec également des molécules impliquées dans le quorum sensing telle que les homo-sérine-lactones. Ainsi la matrice extra-cellulaire du biofilm va posséder des caractéristiques physico-chimiques locales bien spécifiques et une déplétion de l'oxygène au sein de cette matrice uniquement sous polarisation de l'électrode est difficile à vérifier expérimentalement.

Il est également important de relativiser l'idée que le genre *Pseudomonas* est seul responsable de ces phénomènes à savoir la réduction bio-électrochimique de l'oxygène et la dénitrification. En effet, le biofilm, bien que dominé par le genre *Pseudomonas* (71 %), reste un biofilm mixte. Si notre hypothèse d'une dénitrification rendu possible grâce à une déplétion de l'oxygène par réduction bio-électrochimique se tient, il faut rester très prudent sur l'identité des acteurs impliqués dans ce phénomène et ne pas extrapoler le rôle des bactéries du genre *Pseudomonas*, d'autre pouvant jouer un rôle tout aussi fondamental dans le processus.

Néanmoins, si notre hypothèse se révèle vraie, ce résultat est à la fois prometteur mais peut aussi poser plusieurs limites importantes du point de vue des objectifs à long terme du projet LowNitrate. En effet, notre principal but est le développement de bio-cathodes à nitrate (autrement dit la réduction bio-électrochimiques via des électrons captés depuis l'électrode par des bactéries exo-électrogènes). Or, si notre hypothèse se révèle vrai, alors nous nous trouvons dans un cas différent : une réduction des nitrates rendue possible par une réduction bio-électrochimique importante de l'oxygène causant une anaérobiose localisée.

Cette nuance peut paraître négligeable mais au vu des objectifs du projet, elle est en réalité fondamentale. En effet, l'un des atouts importants de l'électrode en court-circuit de notre projet, est la possibilité pour les bactéries exo-électrogènes de pouvoir utiliser les électrons des sédiments (oxydés par les bactéries du pôle anodique et transmis à l'électrode) et donc empêcher les électrons d'être limitants dans la réduction du nitrate. Dans notre expérience, ce n'est pas vraiment le cas. Ici, la réduction des nitrates (lors de la polarisation) n'est pas de nature bio-électrochimique (pas de pic de réduction visible sur voltamétrie cyclique ni

chronoampérométrie) ce qui signifie que les électrons servant à cette réduction ne proviennent pas directement de l'électrode et pourrait venir à manquer sur une plus longue incubation.

Ce constat pose problème car nous nous trouvons davantage dans le cas d'une réduction des nitrates opportuniste en cas d'absence d'oxygène dans le biofilm. On se retrouve alors face à une problématique centrale du projet : la compétition entre l'oxygène et le nitrate comme accepteur terminal d'électrons à la cathode.

C'est cette problématique qui sera considérée dans le prochain chapitre, via une étude du niveau d'influence de l'oxygène sur le processus de la dénitrification.

III) Références

- [1] N. Pous, C. Koch, J. Colprim, S. Puig, F. Harnisch, Extracellular electron transfer of biocathodes: Revealing the potentials for nitrate and nitrite reduction of denitrifying microbiomes dominated by *Thiobacillus* sp., *Electrochem. Commun.* 49 (2014) 93–97. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2014.10.011>.
- [2] D.P. Kelly, A.P. Wood, Confirmation of *Thiobacillus denitrificans* as a species of the genus *Thiobacillus*, in the beta-subclass of the Proteobacteria, with strain NCIMB 9548 as the type strain., *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50 (2000) 547–550. <https://doi.org/10.1099/00207713-50-2-547>.
- [3] D.A. Cataldo, M. Maroon, L.E. Schrader, V.L. Youngs, Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid, *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 6 (1975) 71–80. <https://doi.org/10.1080/00103627509366547>.
- [4] B. Lovreček, M. Batinic, J. Čaja, The electrochemical oxygen reduction on the graphite electrode, *Electrochim. Acta.* 28 (1983) 685–690. [https://doi.org/10.1016/0013-4686\(83\)85065-8](https://doi.org/10.1016/0013-4686(83)85065-8).
- [5] K.B. Gregory, D.R. Bond, D.R. Lovley, Graphite electrodes as electron donors for anaerobic respiration, *Environ. Microbiol.* 6 (2004) 596–604. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00593.x>.
- [6] N. Pous, A.A. Carmona-Martínez, A. Vilajeliu-Pons, E. Fiset, L. Bañeras, E. Trably, M.D. Balaguer, J. Colprim, N. Bernet, S. Puig, Bidirectional microbial electron transfer: Switching an acetate oxidizing biofilm to nitrate reducing conditions, *Biosens. Bioelectron.* 75 (2016) 352–358. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.08.035>.
- [7] L. Yu, Y. Yuan, S. Chen, L. Zhuang, S. Zhou, Direct uptake of electrode electrons for autotrophic denitrification by *Thiobacillus denitrificans*, *Electrochem. Commun.* 60 (2015) 126–130. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2015.08.025>.

- [8] E. Afgan, D. Baker, B. Batut, M. van den Beek, D. Bouvier, M. Čech, J. Chilton, D. Clements, N. Coraor, B.A. Grüning, A. Guerler, J. Hillman-Jackson, S. Hiltemann, V. Jalili, H. Rasche, N. Soranzo, J. Goecks, J. Taylor, A. Nekrutenko, D. Blankenberg, The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2018 update, *Nucleic Acids Res.* 46 (2018) W537–W544. <https://doi.org/10.1093/nar/gky379>.
- [9] F. Escudié, L. Auer, M. Bernard, M. Mariadassou, L. Cauquil, K. Vidal, S. Maman, G. Hernandez-Raquet, S. Combes, G. Pascal, FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution, *Bioinformatics.* 34 (2018) 1287–1294. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx791>.
- [10] C. Quast, E. Pruesse, P. Yilmaz, J. Gerken, T. Schweer, P. Yarza, J. Peplies, F.O. Glöckner, The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools, *Nucleic Acids Res.* 41 (2012) D590–D596. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>.
- [11] A. Cournet, M. Bergé, C. Roques, A. Bergel, M.-L. Délia, Electrochemical reduction of oxygen catalyzed by *Pseudomonas aeruginosa*, *Electrochim. Acta.* 55 (2010) 4902–4908. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2010.03.085>.
- [12] M. Rosenbaum, F. Aulenta, M. Villano, L.T. Angenent, Cathodes as electron donors for microbial metabolism: Which extracellular electron transfer mechanisms are involved?, *Bioresour. Technol.* 102 (2011) 324–333. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.07.008>.
- [13] Amandine DE ALMEIDA COURNET, Etude de la catalyse microbienne de la réduction électrochimique du dioxygène, Université de Toulouse, 2010.
- [14] D. Hernandez, F.M. Dias, J.J. Rowe, Nitrate transport and its regulation by O₂ in *Pseudomonas aeruginosa*, *Arch. Biochem. Biophys.* 286 (1991) 159–163. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(91\)90022-B](https://doi.org/10.1016/0003-9861(91)90022-B).
- [15] H.-C. Flemming, J. Wingender, The biofilm matrix, *Nat. Rev. Microbiol.* 8 (2010) 623–633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>.

Chapitre III : Etude de la relation entre oxygène et dénitrification

Table des Matières

I) Introduction	112
II) Matériel et méthodes	114
III) Résultats	122
1. Etude préliminaire	122
2. Etude principale	123
• Suivi des quantités en nitrate	125
• Suivi des potentiels des structures porteuses en acier inoxydable.....	130
• Etude de la composition relative des phases gazeuses	132
• Analyse des communautés bactériennes.....	135
IV) Conclusions	138
V) Références	139
VI) Annexes.....	141

I) Introduction

De par les résultats obtenus précédemment, il est désormais indispensable d'étudier l'impact de la présence de l'oxygène sur l'efficacité de la dénitrification au sein d'un pilote mimant le milieu naturel. En effet, il est admis dans la littérature que la dénitrification au sein des zones humides a majoritairement lieu dans les sédiments de surface (sur les premiers centimètres de profondeur), là où les nitrates sont détectables mais où le dioxygène est très peu présent. En effet, le nitrate est détectable dans les sédiments sur une profondeur à l'échelle du centimètre, alors que les concentrations en oxygène ont tendance à s'effondrer sur des profondeurs à l'échelle du millimètre [1][2][3][4]. Pour cette raison, on peut observer une zone privilégiée pour les processus de dénitrification au sein de cette zone anoxique avec nitrate mais sans oxygène.

On peut néanmoins se demander à quel point la présence de dioxygène au sein des sédiments peut impacter l'efficacité de la dénitrification. S'agit-il d'une caractéristique influant modérément sur l'efficacité de la dénitrification ou bien s'agit-il d'un point critique ayant des répercussions importantes sur cette efficacité ? Cette interrogation est centrale car elle va déterminer le type de montage pour les électrodes qui seront utilisées dans les expériences futures. Pour rappel, notre objectif est de parvenir à développer des bio-cathodes dénitrifiantes uniquement par pression de sélection au sein d'un environnement naturel spécifique à savoir les zones humides ou bassins de rétention. Ainsi la variable la plus évidente sur laquelle jouer pour atteindre cet objectif est la nature même de l'électrode (matière, forme, localisation au sein du milieu...). Lors de la précédente expérience, nous avons utilisé un simple barreau de graphite comme électrode de travail mais le biofilm s'étant développé à sa surface par pression de sélection s'est avéré être exo-électrogène uniquement pour la réduction de l'oxygène et non pour le nitrate.

Il est donc essentiel, avant de passer au montage d'un nouveau système bio-électrochimique, d'essayer de comprendre à quel point l'oxygène influe sur l'efficacité de la dénitrification via un modèle mimant le milieu naturel.

Ainsi, dans cette deuxième expérience, seront étudiées deux variables majeures : en premier lieu la présence d'oxygène. Concernant cette variable, la caractéristique importante du montage est l'absence d'utilisation de saturation à l'argon pour supprimer l'oxygène dans le milieu aqueux où les processus de dénitrification ont lieu. En effet, il faut rappeler que cette thèse a

pour objectif principal la conception d'une électrode capable d'être placée dans un milieu naturel afin d'augmenter l'efficacité de la dénitrification sans entretien régulier. Pour cette raison, les conditions anaérobies seront obtenues via la création d'une poche d'eau au sein même des sédiments et n'étant pas en contact avec l'atmosphère, ce qui permet de s'affranchir du dégazage de l'oxygène. En effet, l'oxygène ne diffuse pas ou très peu dans les sédiments [5][6][7].

La deuxième variable qui sera étudiée est la présence d'une structure composée de matériaux conducteurs permettant potentiellement le développement de métabolisme exo-électrogènes bactériens. En effet, il est bon de rappeler que le système bio-électrochimique dont nous visons le développement est censé être un système autonome, autrement dit incluant une bio-cathode dénitrifiante en court-circuit avec une bio-anode. Cette partie bio-anodique de l'électrode est, de fait, destinée à être placée dans les sédiments, où la matière organique oxydable est localisée. Ainsi nous vérifierons si les paramètres étudiés, notamment les potentiels d'abandon des électrodes en acier inoxydable enfouies dans les sédiments, sont bien compatibles avec le développement de biofilms exo-électrogènes anodiques. Une étude des communautés bactériennes s'étant développées à la surface de ces structures en fin d'incubation sera par ailleurs effectuée afin d'identifier les potentielles espèces d'intérêt, aussi bien du point de vue de la dénitrification que du métabolisme exo-électrogène anodique.

II) Matériel et méthodes

- Explication générale de l'expérience

Cette expérience se basera sur l'incubation et le suivi de neuf pilotes divisés en trois conditions, soit trois réplicats pour chaque condition. Les trois premiers pilotes feront office de contrôles négatifs avec simplement des sédiments broyés du lac de Rampillon auxquels est ajoutée de l'eau de ce lac enrichie en nitrate. Les six autres pilotes contiennent également des sédiments mais avec deux phases séparées par une phase aqueuse « enterrée ». Cela est rendu possible par la présence d'une structure permettant de porter la phase supérieure des sédiments (Figure 1). Dans le cas des pilotes 4 à 6, cette structure est en PVC (polychlorure de vinyle, non conductrice) alors que dans le cas des pilotes 7 à 9, cette structure est en acier inoxydable. Dans le cas des trois pilotes avec structure en acier inoxydable (7-9), une électrode de référence (ECS + 0,242 vs ENH) permet de suivre l'évolution du potentiel de la structure porteuse au cours du temps. Le temps d'incubation total est de 26 jours avec suivi des quantités de nitrates (suivi individuel des phases aqueuses supérieures et enterrées pour les pilotes 4 -9), suivi des potentiels de la structure en acier inoxydable pour les pilotes 7-9 ainsi qu'une étude de la composition des gaz émis dans les phases aqueuses profondes pour les pilotes 4-9.

L'objectif ici est de comparer quantitativement la dénitrification entre les deux phases aqueuses, celles présentes en surface et donc en contact permanent avec l'air ambiant chargé à environ 20 % de dioxygène (ce dernier étant capable de diffuser dans l'eau) et celles enterrées sans accès à l'oxygène de l'air. La concentration d'oxygène dissous dans l'eau (DO en mg.L^{-1} , 8,26 mg.L^{-1} dans l'eau pure à 25°C par exemple) dépend de nombreux facteurs comme la température, le mouvement au sein du volume d'eau, la quantité d'organismes produisant ou consommant de l'oxygène, etc. Néanmoins, si la quantité d'oxygène peut varier, elle est toujours présente en cas de contact entre un milieu majoritairement composé d'eau et une atmosphère chargée en oxygène, et ce même à des profondeurs importantes [8]. La différence majeure entre les phases aqueuses supérieures et celles localisées en profondeur est l'accessibilité à l'oxygène de l'air. En effet, l'absence de contact avec l'atmosphère pour les phases enterrées rend impossible une diffusion de celui-ci pour remplacer l'oxygène consommé par les métabolismes aérobies. Cela nous permettra d'estimer l'impact de l'oxygène sur les métabolismes liés à la dénitrification.

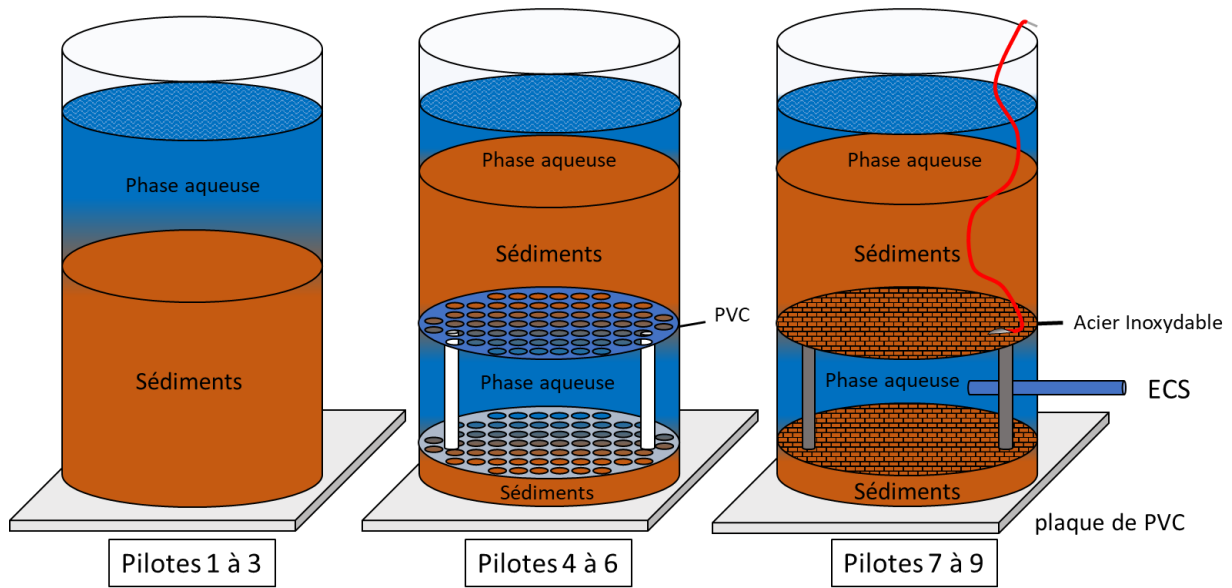


Figure 1 : Schéma général de l'expérience avec les conditions pour les neuf pilotes lancés en incubation.

- Description générale du pilote

Neuf pilotes similaires ont été bâtis dans l'optique de lancer trois réplicats pour trois conditions différentes. Les pilotes sont tous constitués d'une structure en PVC cylindrique transparente d'un diamètre de 6,9 cm pour 35 cm de hauteur. Ces cylindres ont ensuite été fixés à par une extrémité à une plaque, également en PVC, en utilisant de la colle époxy. Dans le cas des pilotes 7 à 9, un orifice a été percé au travers de la paroi de PVC à 3,5 cm de hauteur pour un diamètre de 1,3 cm afin d'y insérer une électrode de référence type ECS.

- Description des structures porteuses

Six structures porteuses ont été montées, de deux types différents : trois en PVC (matériau isolant) et trois en acier inoxydable (type 316, entre 16 et 18% de chrome). Dans les deux cas, ces structures sont composées de deux grilles de 6,7 cm de diamètre. Bien que la taille des mailles de ces grilles diffère, la surface ouverte totale reste relativement similaire avec une estimation de 40% pour les grilles en PVC et de 37% pour les grilles en acier inoxydable. Dans chaque structure, les deux grilles sont reliées entre elles par deux vis d'acier inoxydable de 6,2 cm de long, sachant que pour celles dont les grilles sont en PVC, ces tiges ont été au préalable recouvertes en totalité par du téflon. Dans le cas des structures conductrices, une soudure à l'étain a également été faite sur les grilles supérieures afin de les raccorder à un fil de cuivre recouvert d'une couche de PVC pour mesurer le potentiel de la structure par rapport à l'électrode de référence. Avant lancement de l'expérience, une mesure de la résistance entre l'extrémité du fil de cuivre et la grille d'acier inoxydable inférieure a été faite pour toutes les

structures et aucune n'était supérieure à 50Ω . Enfin dans le cas des grilles de PVC, quatre fines tiges de plastique ont été insérés au niveau des mailles afin d'empêcher leur déformation sous le poids des sédiments (Figure 2 et 3).

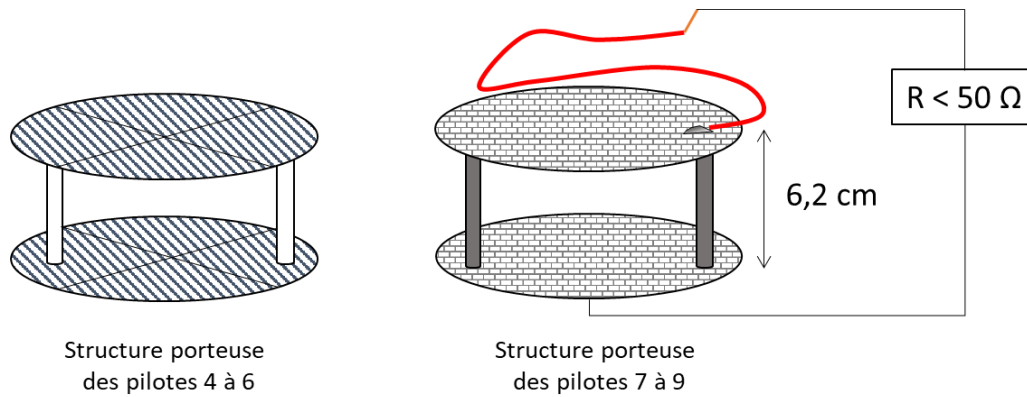


Figure 2 : Schéma des structures porteuses en acier inoxydable pour les pilotes quatre à neuf

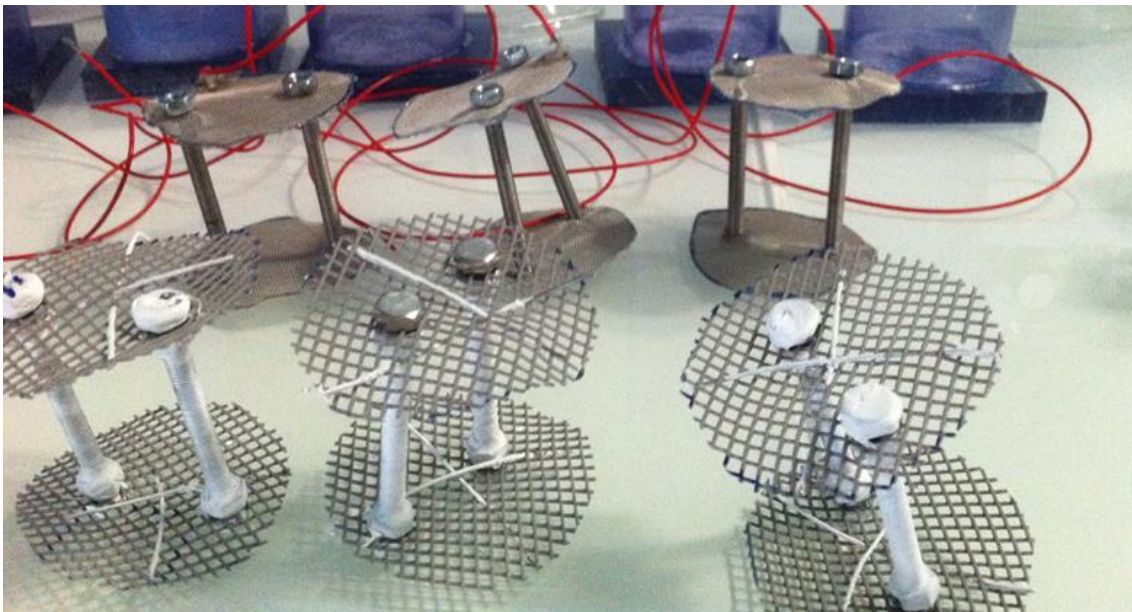


Figure 3 : Photographie des structures porteuses utilisées dans cette expérience. Celles au premier plan en PVC sont utilisées pour les pilotes 4, 5 et 6. A noter que celle du pilote 5 (milieu) n'a pas encore ses vis totalement recouvertes de téflon au moment où cette photo a été prise, ce qui sera bel et bien le cas lors du lancement de l'expérience. Au deuxième plan sont montrées celles avec des grilles en acier inoxydable utilisées pour les pilotes 7, 8 et 9.

- Description des inocula biologiques

Pour cette expérience, les sédiments utilisés proviennent à nouveau de la zone humide de Rampillon et sont prélevés au mois d'avril. Ces sédiments secs ont été broyés à l'aide d'un marteau puis les déchets organiques (branches, végétaux, coques de crustacés...) ont été enlevés autant que possible. L'eau utilisée pour les phases aqueuses provient également de la zone humide de Rampillon, prélevée au même moment que les sédiments. De plus une mesure des concentrations initiales en nitrate et nitrite (avant enrichissement dans le cadre de cette étude) a permis de montrer que leurs concentrations respectives ne dépassaient pas 1 mg L^{-1} .

- Description de la phase de montage de l'expérience

Les pilotes ont été montés dans un ordre qu'il est important de décrire. Pour les trois premiers pilotes (sans structures porteuses), 326 g de sédiments ont simplement été ajoutés. Pour le cas des pilotes avec structures porteuses (4-9), 72 g de sédiments ont été ajoutés dans l'optique de créer un premier fond de sédiments pour une hauteur d'environ 2 cm. Sont ensuite ajoutés les structures posées sur ce premier fond. Pour les pilotes avec une structure porteuse en acier inoxydable (pilotes 7, 8 et 9) l'électrode de référence (ECS saturée KCl, $E = + 0,244 \text{ V vs ENH}$ à 25°C , SI Analytics®) a été insérée via l'orifice percé dans la paroi en PVC du cylindre. Du silicone a ensuite été utilisé afin de calfeutrer l'orifice et l'ECS afin de la maintenir en place. Une deuxième couche de 250 g sédiments a ensuite été déposée sur les structures porteuses pour une hauteur comprise entre 12 et 14 cm. Seulement à ce moment ont été ajoutés 600 mL d'eau dans les neuf pilotes sans ajout de nitrate initialement.

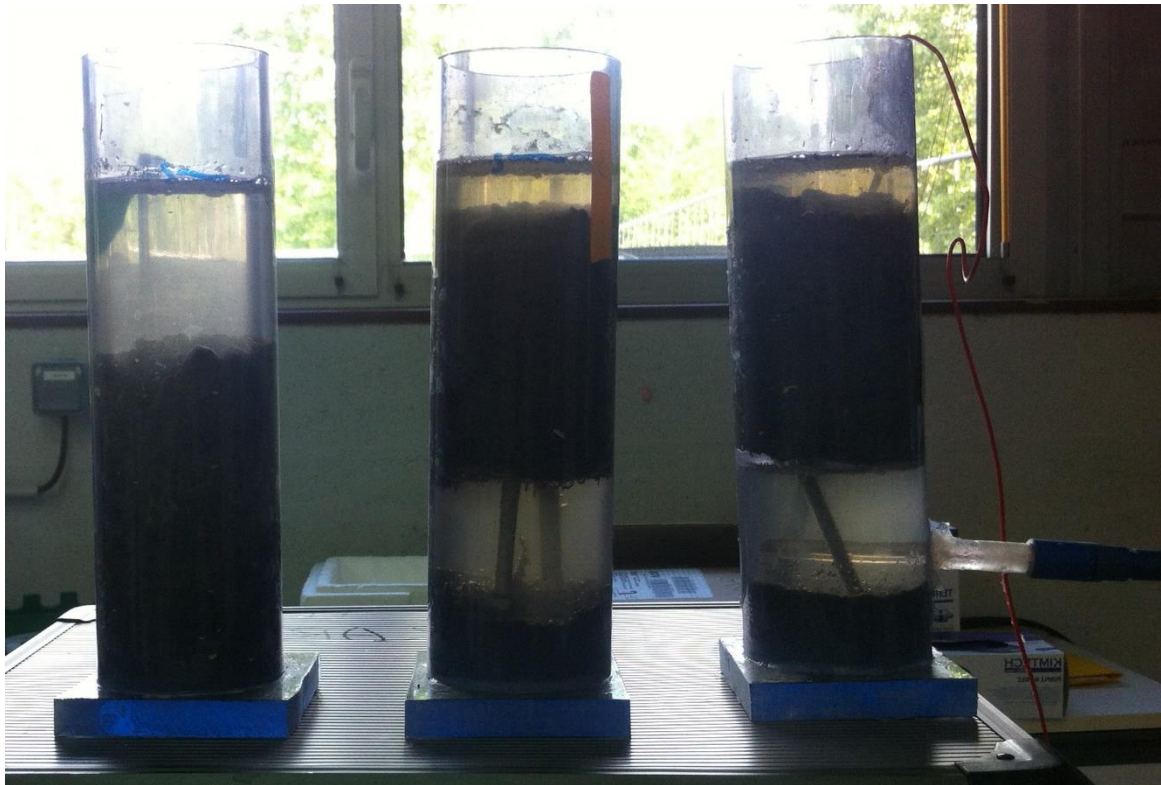


Figure 4 : Photo des trois types de configurations. A gauche, la configuration utilisée pour les pilotes n° 1, 2 et 3. Au milieu la configuration pour les pilotes n° 4, 5 et 6. Enfin à droite la configuration utilisée pour les pilotes n° 7, 8 et 9.

- Description des caractéristiques des pilotes

Une fois les pilotes montés sous leur forme finale, il convient de décrire les différents volumes, masses et surfaces qui constituent les différentes parties des pilotes. En premier lieu, les surfaces des sédiments en contact avec une phase aqueuse : les surfaces n'impliquant pas de structures porteuses ont une surface de contact égale à environ 35 cm^2 si l'on ne prend pas en compte irrégularités des surfaces de contact (disque parfaitement plat). Pour ce qui est des volumes, les trois pilotes sans structures porteuse (pilotes 1 à 3) n'ont qu'une seule phase aqueuse en contact avec l'atmosphère dont le volume est d'environ 300 mL. Pour les pilotes 4 à 9 possédant deux phases aqueuses, les volumes de ces deux phases sont respectivement d'environ 225 mL pour celle entre les deux disques des structures porteuses (pas de contact direct avec l'atmosphère) et d'environ 100 mL pour la phase supérieure en contact avec l'atmosphère. Les caractéristiques sont résumées Figure 5.

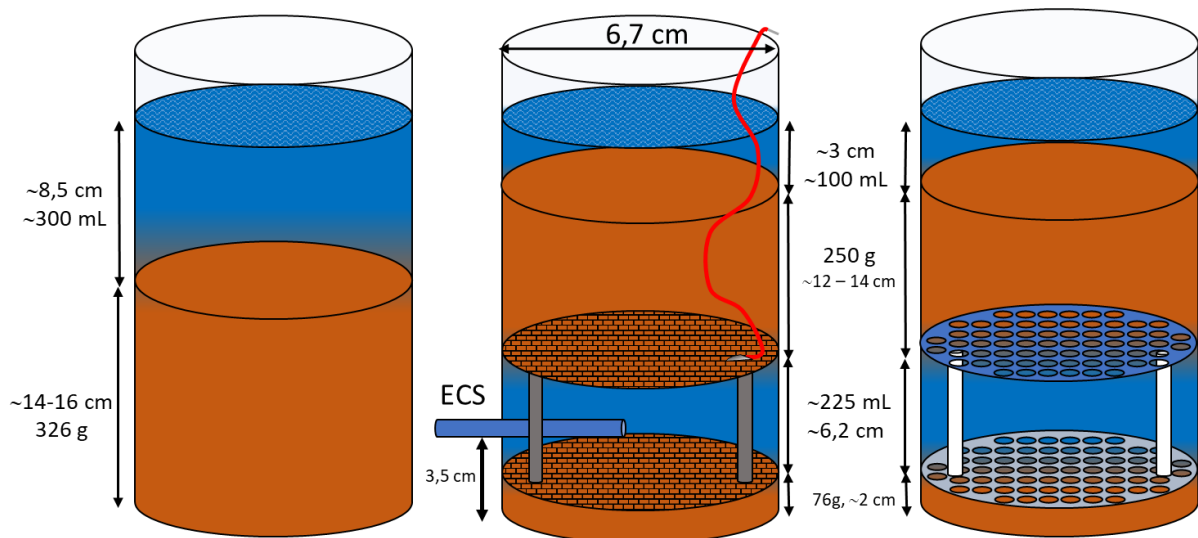


Figure 5 : Schéma détaillant les volumes des différents compartiments des pilotes en fonction de leur type : avec ou sans structures porteuses permettant l'obtention d'une phase aqueuse au sein même des sédiments.

Il faut néanmoins garder à l'esprit que toutes ces valeurs restent des approximations, que les sédiments ont été broyés seulement à l'aide d'un marteau afin de ne pas obtenir un grain trop fin qui aurait pu passer au travers des mailles des grilles des structures porteuses. De fait, les particules composants les sédiments ne sont pas de taille homogène, ce qui peut altérer légèrement les valeurs listées précédemment aussi bien les volumes que les surfaces via des irrégularités.

- Suivi des concentrations en nitrate

Comme expliqué dans l'introduction, la dénitrification a lieu très majoritairement au niveau de l'interface entre les sédiments et l'eau. Ainsi, l'un des objectifs de cette expérience est de comparer les taux de dénitrification entre les phases aqueuses localisées pour l'une sous une couche de sédiments mais sans contact avec l'atmosphère par rapport à celles localisées au-dessus des sédiments et donc en contact avec l'air ambiant. Pour cette raison, le choix a été fait de ne pas prendre comme valeurs de comparaison les concentrations (mole.L^{-1}) mais plutôt la quantité de nitrates (en mg de NO_3^- ou de mg N- NO_3^- mais pourrait aussi être utilisée l'unité mole) par unité de surface de sédiments en contact avec la phase aqueuse concernée (unité très utilisée en écologie). Afin d'obtenir ces valeurs de quantité de nitrate présents dans les différentes phases aqueuses, des prélèvements d'eau dans les deux phases aqueuses (via l'utilisation d'une seringue dotée d'une longue aiguille) sont effectués puis la concentration sera estimée par chromatographie ionique et la valeur en mg.L^{-1} sera ensuite divisée par le volume estimé de la phase aqueuse en question (décrit Figure 5) afin d'obtenir une quantité de

nitrate présente dans la phase aqueuse concernée. Le volume prélevé est de 3 mL et celui-ci est divisé en deux pour deux passages de 1,5 mL en chromatographie ionique. Cette dernière est réalisée sur un 881 Compact IC pro (Metrohm®). Une solution contrôle à 50 mg.L⁻¹ a au préalable été passée dix fois dans la colonne afin d'estimer une marge d'erreur pour la mesure et cette dernière n'a jamais dépassé 5% (entre 48,7 et 51,1 mg.L⁻¹ après report sur la courbe de calibration).

- Relevé des potentiels

Le potentiel de chaque structure porteuse conductrice (pilotes 7 à 9) est relevé régulièrement via l'utilisation d'un multimètre contre l'électrode de référence (ECS, + 0,242 V vs ENH) insérée dans la phase aqueuse se trouvant entre les deux grilles de la structure.

- Conditions d'incubation des pilotes

Les pilotes ont été laissés à incuber à température contrôlée (23°C en permanence) et la structure cylindrique transparente a été recouverte de papier aluminium avec un niveau d'exposition à la lumière d'environ 9 heures par jour.

- Etude de la composition des gaz par micro-chromatographie en phase gazeuse

Au cours de l'expérience des échantillons gazeux seront prélevés et la composition relative analysée. Pour cela, une seringue étanche spécialement conçue pour le prélèvement de gaz a été utilisée. La seringue est alors branchée à un Micro Chromatographe à phase gazeuse CP-4900 du fabricant Agilent Technologies® dont la calibration a été réalisée par un technicien de l'INRAe d'Antony. Il est important de noter que ce type d'analyse a permis de déterminer la composition relative (en %) des gaz injectés mais pas la concentration des différents éléments chimiques (en mole par unité de volume).

- Etude des communautés bactériennes présentes sur les grilles des structures porteuses

L'étude des communautés bactériennes a été faite sur chaque grille des structures porteuses (deux par pilote, douze en tout) à la fin de l'incubation, soit à 26 jours. Chaque grille a été rincée des sédiments déposés à sa surface en étant immergée dans l'eau pure et remuée afin de ne conserver que les biofilms fixés à sa surface. Après une nuit laissées immergées dans l'eau, elles ont ensuite été grattées via un scalpel et les particules obtenues ont été placées dans des tubes Eppendorf ensuite placés à -20°C en attendant la phase d'extraction.

En effet, après grattage des grilles une fois l'incubation terminée, la phase d'extraction d'ADN a été faite cette fois-ci via un kit d'extraction différent de celui utilisé lors de l'expérience

décrite dans le chapitre précédent (Chapitre II) à savoir le kit commercial DNeasy[®] PowerSoil[®] Kit du fabricant Qiagen[®].

Sur les trois étapes importantes du séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S (extraction, séquençage et traitement bio-informatique), deux de ces étapes ont posé problème. La première fut l'extraction qui, après purification de l'ADN, n'a permis d'obtenir que sept échantillons sur douze avec une concentration en ADN pur suffisante pour être envoyés à l'étape de séquençage. La raison de ces concentrations trop basses (moins de 10 ng.µL⁻¹) pour cinq échantillons est très vraisemblablement liée à une colonisation des grilles trop limitée par des bactéries peut-être à cause du temps d'incubation trop court.

Le deuxième problème rencontré est lié à la phase de séquençage et plus particulièrement celle d'élongation des amplicons par PCR. En effet, sur les deux primers (ou amorces) utilisés, l'un d'entre eux semble ne pas s'être lié à sa séquence complémentaire. La conséquence directe de cela est l'obtention d'amplicons de longueur variables. Or, pour que l'analyse bio-informatique puisse se faire, il est nécessaire que les séquences des amplicons soient toutes de même taille. Ainsi, lors de la phase de prétraitement bio-informatique, une grande partie des amplicons ont été raccourcis afin d'obtenir une collection d'amplicons de longueur homogène. La conséquence principale est l'impossibilité d'obtenir une identification des séquences allant jusqu'au genre bactérien et encore moins l'espèce mais seulement jusqu'au niveau taxonomique supérieur : la famille. Cela pose problème car une famille bactérienne peut contenir plusieurs genres différents et des centaines d'espèces, voire plus.

Néanmoins, malgré ces deux soucis, les données seront malgré tout présentées car elles peuvent s'avérer intéressantes.

III) Résultats

1. Etude préliminaire

Avant de décrire les résultats obtenus lors de l'expérience principale (neuf pilotes, trois réplicats pour chacune des trois configurations décrites dans la Figure 5), il est nécessaire de lancer une brève étude préliminaire. En effet, l'un des points clés de cette étude est de comparer l'évolution des quantités en nitrate au cours du temps au sein des phases aqueuses d'un même pilote : celle se trouvant piégée entre les sédiments et celle du dessus en contact avec l'air ambiant. Néanmoins, pour que cette comparaison soit pertinente, il est indispensable de vérifier au préalable si la capacité de diffusion des ions nitrate dans les sédiments leur permet ou non de passer d'une phase aqueuse à l'autre au cours du temps.

Dans cette optique, deux pilotes identiques dans la même configuration que celle des pilotes 4 à 6 (soit avec une structure porteuse en PVC) ont été utilisés avec la même quantité d'eau et de sédiments que décrit précédemment. Au début de l'incubation, 340 mg de NaNO_3 (soit 250 mg de NO_3^-) ont été ajoutés dans la phase aqueuse supérieure uniquement. Pendant 3 jours d'incubation, un suivi des concentrations en nitrate des deux phases aqueuses pour chacun des deux pilotes a été fait.

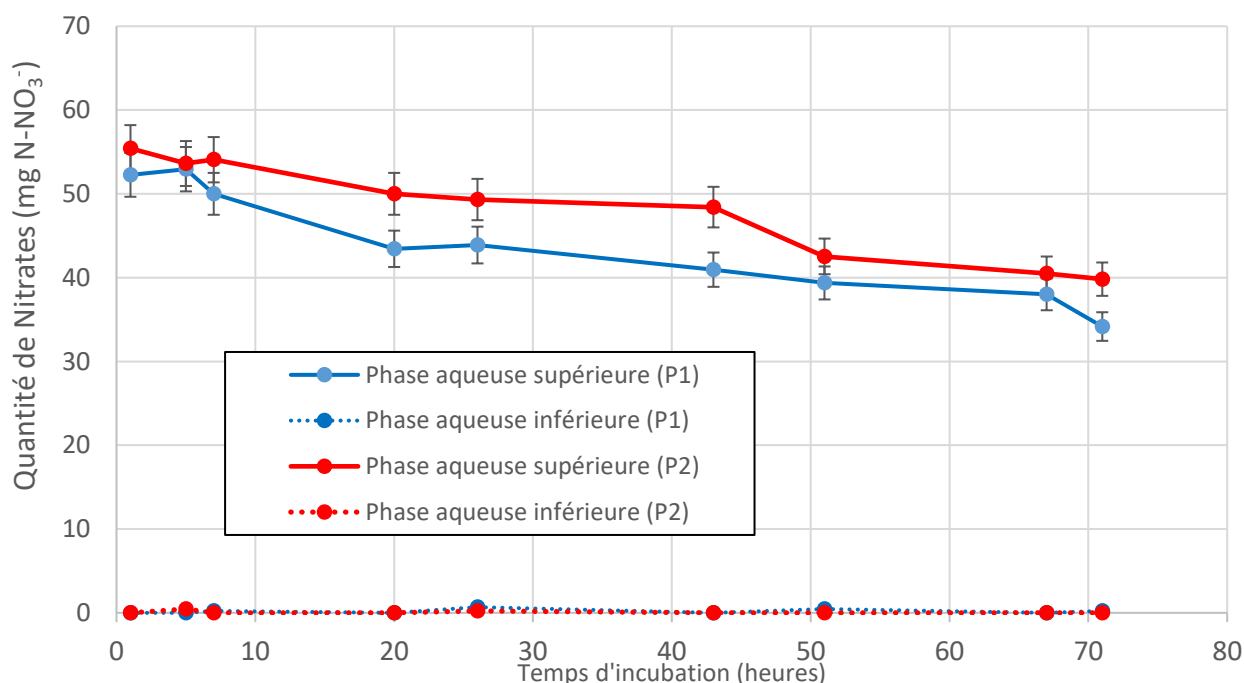


Figure 6 : Evolution des concentrations en nitrate dans les différentes phases aqueuses des deux pilotes identiques (réplicats) pendant les 3 jours d'incubation.

Via la Figure 6, il est possible de suivre l'évolution des quantités de nitrate au sein des phases aqueuses des deux pilotes utilisés pour cette expérience préliminaire. Comme expliqué auparavant, l'objectif de cette étude préliminaire est de vérifier que les ions nitrate ne peuvent pas passer d'une phase aqueuse à l'autre. Au vu des résultats, il est clair que cela est indubitablement le cas, la quantité de nitrate étant globalement nulle pour les phases inférieures sur toute la durée de l'incubation alors que les phases aqueuses localisées au-dessus contiennent des ions nitrate sur toute la durée d'incubation. Ainsi on peut affirmer que les ions nitrate ne peuvent pas diffuser au travers de la phase sédimentaire (d'une hauteur d'environ 12 à 14 cm) pour une période équivalente à plusieurs jours.

Cette information confirmée, la comparaison de l'évolution des quantités de nitrate entre ces deux compartiments au sein d'un même pilote est alors pertinente car il est certain que la concentration dans une des phases aqueuses ne sera pas altérée par la diffusion des ions localisés dans la deuxième phase au sein du même pilote, les sédiments jouant le rôle d'une barrière naturelle efficace.

2. Etude principale

Il convient en premier lieu de décrire la chronologie générale de l'incubation. Le premier jour d'incubation, un ajout de 500 mg en nitrate sous forme de nitrate de sodium (soit 680 mg de NaNO_3) a été fait dans chacun des 9 pilotes. Pour les trois premiers pilotes servant de témoins négatifs (une seule phase aqueuse au-dessus d'une couche de sédiments), les 680 mg de NaNO_3 (500 mg NO_3^- , 113 mg N-NO_3^-) ont été entièrement ajoutés dans la phase aqueuse supérieure alors que dans le cas des pilotes 4 à 9, possédant chacun deux phases aqueuses distinctes, les 680 mg ont été répartis entre les deux phases avec 340 mg de NaNO_3 (pour 250 mg de NO_3^- , 56 mg N-NO_3^-) dans chacune d'entre elles.

Les concentrations en nitrate sont alors relevées tous les deux ou trois jours puis un deuxième ajout en nitrate avec les mêmes quantités ajoutées dans chaque pilote, avec la même répartition est fait au seizième jour d'incubation.

Il est à noter qu'à partir du deuxième jour, plusieurs bulles de gaz commencent à apparaître dans la partie supérieure des phases aqueuses enterrées des pilotes 4 à 9, sans exception. Le nombre de ces bulles ne fera qu'augmenter au cours de l'incubation jusqu'à l'apparition d'une véritable phase gazeuse continue et localisée sous la première couche de sédiments.

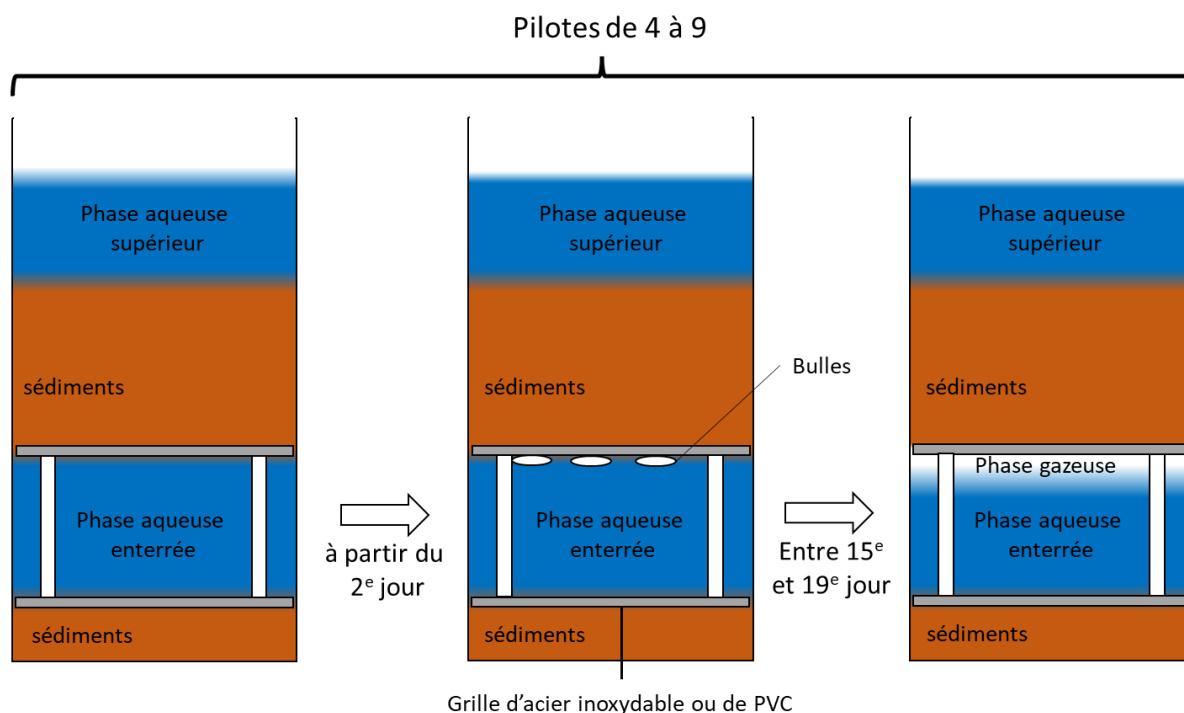


Figure 7 : Schéma montrant l'apparition des bulles au niveau de la phase aqueuse enterrée pour les pilotes de 4 à 9 (aussi bien avec une structure en PVC qu'en acier inoxydable).

Comme expliqué Figure 7 c'est au 22^e jour et peu avant l'arrêt de l'incubation que le gaz apparu au niveau de cette phase aqueuse profonde a été prélevé et étudié via micro-chromatographie en phase gazeuse comme décrit dans la partie Matériel et Méthodes afin de connaître sa composition relative. L'incubation est ensuite stoppée à 25 jours. A noter qu'entre le premier et dernier jour d'incubation le pH a été mesuré tous les 5 jours (indépendamment pour les phases aqueuses supérieures et inférieures pour les pilotes de 4 à 9) pour des valeurs toujours comprises entre 6,5 et 7,7 sans variations importantes entre les pilotes.

Trois grands axes d'analyse seront étudiés durant cette expérience :

- ▶ En premier lieu la comparaison de l'évolution des concentrations en nitrates au cours du temps d'incubation aussi bien entre les différents pilotes qu'entre les deux compartiments aqueux d'un même pilote.
- ▶ Une étude de la composition relative de la phase gazeuse apparue tout au long de l'incubation pour les six pilotes contenant une structure porteuse (4 à 9) via des prélèvements faits à 22 jours d'incubation.
- ▶ Le suivi des potentiels d'abandon de chacune des trois structures porteuses en acier inoxydables pour les pilotes 7 à 9 (mesurés versus une Electrode Calomel Saturée, ECS).

Enfin l'étude des communautés bactériennes présentes sur les grilles des structures porteuses sera présentée malgré les problèmes survenus durant cette analyse.

- Suivi des quantités en nitrate

L'évolution des quantités en nitrate dans les compartiments des différents pilotes est disponible en Annexes mais ne sera pas commentée ici directement sous cette forme (évolution des concentrations de NO_3^- en mg.L^{-1} au cours du temps). En effet, le fait que les volumes des différents compartiments ainsi que les concentrations initiales en nitrates ne soient pas les mêmes nécessite de traiter les résultats sous une autre forme.

Afin de mieux saisir les nuances de ces données, il convient ainsi de les traiter à la manière des écologistes : en mettant en relation l'efficacité de la dénitrification (dans le sens réduction des nitrates uniquement) avec la surface de sédiments en contact avec la phase aqueuse concernée (sans prise en compte du volume de celle-ci). Ainsi, l'une des unités la plus utilisée pour définir cette efficacité de dénitrification au cours du temps est la quantité de nitrate transformée par unité de temps et par unité de surface de sédiments en contact avec la phase aqueuse étudiée [9][10], ce qui dans notre cas donnera l'unité suivante : $\text{g N-NO}_3^- \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{j}^{-1}$, soit g de N- NO_3^- par m^2 de sédiments et par jour. L'utilisation de cette unité dans le cadre de notre expérience mérite deux précisions :

► Premièrement, l'unité de masse azote en nitrate (mg N-NO_3^- , incluse dans l'unité de l'efficacité de la dénitrification), très utilisée également en écologie, consiste à ne prendre en compte que la masse de l'azote au sein de la molécule de nitrate. Afin de passer de l'un à l'autre, il suffit simplement de diviser la valeur en mg de NO_3^- par 4,42 (soit la masse molaire du nitrate divisée par celle de l'azote) pour obtenir celle de la masse azote du nitrate.

► Ensuite, dans le cas des phases aqueuses « enterrées », la valeur de surface de sédiments (m^2) est multipliée par deux. En effet, malgré une surface ouverte (espace entre les fils des mailles des grilles) d'environ 40 % aussi bien pour le PVC que pour l'acier inoxydable, les mailles sont très rapidement recouvertes d'une très fine couche de sédiments durant l'incubation, raison pour laquelle la surface de contact avec la phase aqueuse est assimilée à celle des phases aqueuses en contact avec l'atmosphère à savoir 0.0037 m^2 .

Pour rappel, les volumes ainsi que les quantités de nitrates ajoutées sont les suivants :

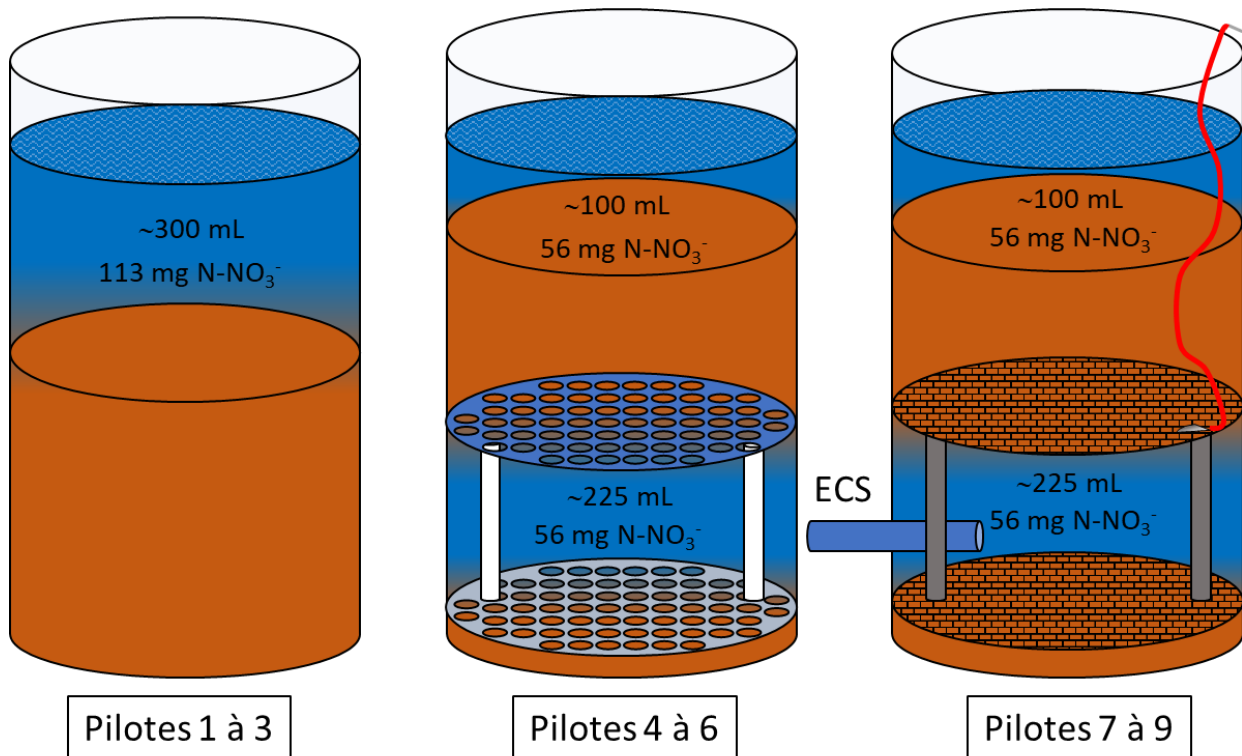


Figure 8 : Schéma détaillant les volumes ainsi que les quantités de nitrates (en mg de N-NO₃⁻) ajoutés dans chacun des compartiments en fonction des types de pilotes à t = 0 jours. Les mêmes quantités sont ajoutées à nouveau à t = 16 jours dans tous les compartiments.

Deux périodes distinctes sont alors définies afin de calculer une valeur de l'efficacité de la dénitrification : celle allant du jour 1 à 4 puis celle allant du jour 16 (juste après le deuxième ajout) à 21. La raison de ce choix est que passé le jour 4, dans le cas de la phase aqueuse « enterrée » de certains pilotes, la quantité de nitrate devient tellement faible qu'elle devient indétectable par chromatographie ionique, ce qui est également le cas après le jour 21. On obtient alors :

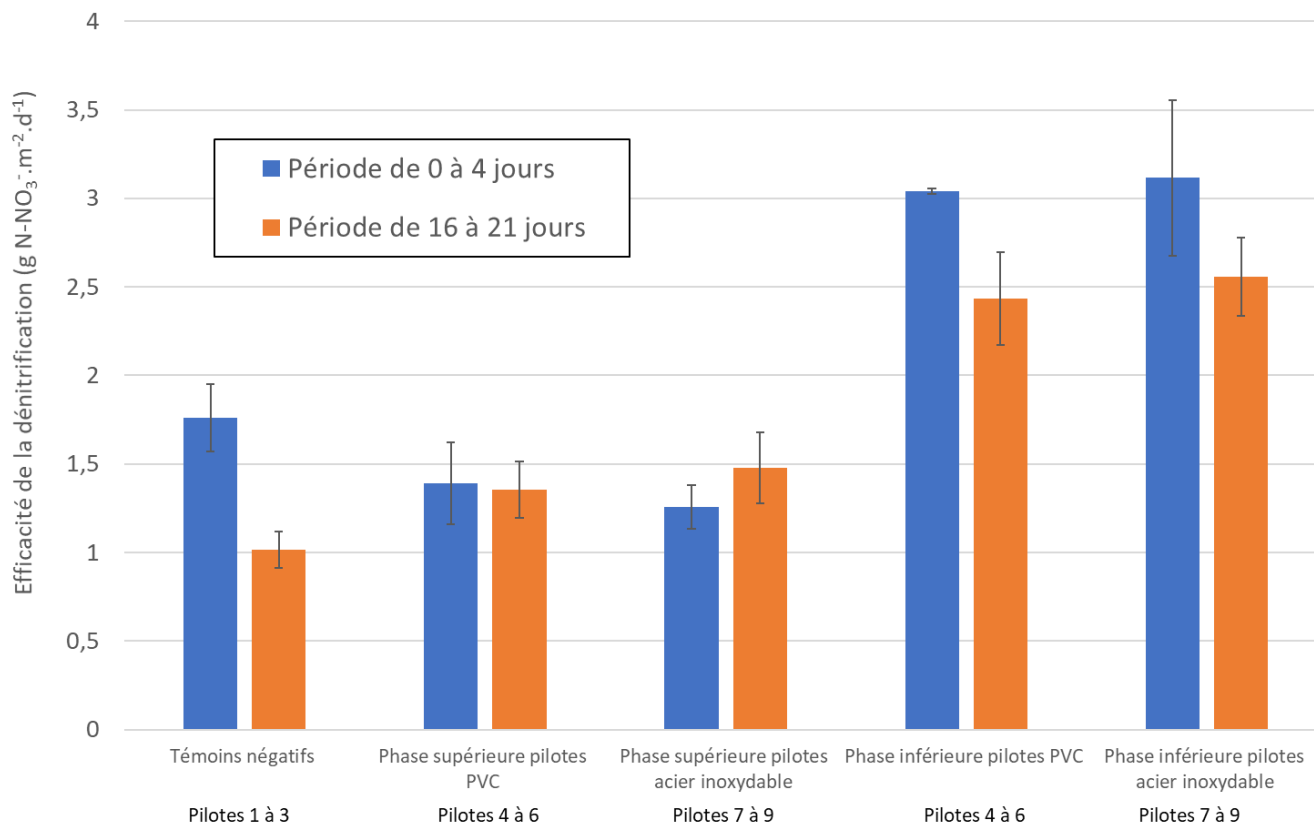


Figure 9 : Synthèse des moyennes de l'efficacité de la dénitrification en fonction des compartiments des différents pilotes et de la période. Les valeurs montrées sont les moyennes des trois réplicats de chaque condition. Les barres d'erreurs sont obtenues via le calcul des déviations standard sur les trois réplicats.

De nombreuses observations peuvent ressortir de la synthèse de l'efficacité de la dénitrification présentée sur la Figure 9 :

- a) Comparaison de la dénitrification entre les phases aqueuses en contact avec l'air des différents pilotes

En premier lieu et pour la phase aqueuse supérieure en contact avec l'air on peut observer une légère différence d'efficacité de la dénitrification entre les témoins négatifs (1 à 3) et ceux ayant une phase aqueuse possédant des structures porteuses en PVC ou acier inoxydable (de plus, on ne note pas de différence notable entre PVC et acier inoxydable) visibles dans la partie gauche de la Figure 9.

En effet, lors de la première période (jours 0 à 4), on peut observer une efficacité de la dénitrification légèrement plus importante pour les témoins négatifs que pour les pilotes avec structures porteuses (environ 1,7 et 1,4 g N-NO₃⁻.m⁻².j⁻¹ respectivement, soit une efficacité de dénitrification environ 30 % plus performante pour les témoins négatifs). A l'inverse, il semble

que pour la deuxième période (jours 16 à 21) on observe une diminution dans le cas des témoins négatifs par rapport à la première période (passage de 1,7 à 1,0 g N-NO₃⁻.m⁻².j⁻¹) alors que cette diminution n'est pas présente dans le cas des pilotes de 4 à 9 pour leur phase aqueuse supérieure. Il faut néanmoins relativiser cette différence d'efficacité de la dénitrification entre pilotes car elle reste relativement faible, n'étant que de 30% entre les contrôles négatifs (1,7 g N-NO₃⁻.m⁻².d⁻¹) et ceux possédant une structure porteuse (1,4 g N-NO₃⁻.m⁻².d⁻¹). De plus, cette différence de 30 % diminue encore si l'on prend en compte la déviation standard (barre d'erreur sur la Figure 9) des valeurs de l'efficacité de la dénitrification des phases aqueuses supérieures (Témoins négatifs, structure en PVC et acier inoxydable).

Pour ce qui est de la diminution plus notable d'efficacité entre les deux périodes pour les témoins négatifs, on peut en revanche émettre l'hypothèse qu'elle puisse être liée à une diminution de la matière organique fournissant les électrons au fur et à mesure qu'elle est consommée au cours de la dénitrification, point évoqué davantage dans la suite.

b) Comparaison entre les phases aqueuses inférieures et les phases aqueuses supérieures

Le deuxième point le plus visible et le plus important est l'efficacité de la dénitrification bien plus importante dans le cas des phases aqueuses enterrées par rapport à celles en contact avec l'atmosphère. En effet, on peut observer une augmentation extrêmement importante de celle-ci comparée aux phases aqueuses en contact avec l'air allant jusqu'à plus du double : 1,4 à 3,0 g N-NO₃⁻.m⁻².j⁻¹ pour les pilotes avec structures en PVC et 1,25 à 3,1 g N-NO₃⁻.m⁻².j⁻¹ pour les pilotes avec structures en acier inoxydable. Il est bon de rappeler que l'unité utilisée inclue une division par la surface de sédiments en contact avec l'eau et que, comme expliqué plus haut, cette valeur de surface est deux fois plus importante dans le cas des phases aqueuses enterrées, ce qui a été pris en compte lors des calculs.

Ainsi, cette différence très importante de +100 % au moins ne peut en aucun cas être liée à une augmentation de la surface de contact avec les sédiments, indiquant qu'une autre variable est à prendre en compte. L'hypothèse la plus probable reste une possible différence de quantité de dioxygène présent dans ce type de compartiment, qui s'apparenterait alors non pas une simple variable à prendre en compte parmi d'autres mais une caractéristique absolument critique dans l'aboutissement du projet LowNitrate.

c) Comparaison entre les deux périodes (de 0 à 4 jours et de 16 à 21 jours)

La dernière observation la plus visible est la légère diminution de l'efficacité de la dénitrification lors de la deuxième période par rapport à la première au sein des phases aqueuses

profondes avec une perte d'environ 20 % aussi bien pour les pilotes avec des structures en PVC que pour ceux possédant des structures en acier inoxydable.

Ce ralentissement peut possiblement s'expliquer par une diminution de la matière organique disponible au bout de 16 jours d'incubation par rapport au début de l'expérience. En effet, si l'on compare les quantités totales de nitrate transformées (vraisemblablement par réduction, et impliquant donc une oxydation d'un autre composé dans le métabolisme bactérien), on se rend compte qu'à 21 jours d'incubation il y a une véritable différence entre les témoins négatifs (dont les quantités de nitrate en mg étaient plus importantes), les phases aqueuses enterrées (dont la vitesse de dénitrification est plus importante) et les phases aqueuses supérieures des pilotes avec structures en PVC (4 à 9).

Quantité totale de NO₃⁻ transformée sur les 21 premiers jours d'incubation	mg NO₃⁻	mg N-NO₃⁻
Pilote 1 (Témoin négatif)	488	110
Pilote 2 (Témoin négatif)	475	107
Pilote 3 (Témoin négatif)	473	107
Phase aqueuse supérieure (P4) (PVC)	337	76
Phase aqueuse inférieure (P4) (PVC)	412	93
Phase aqueuse supérieure (P5) (PVC)	374	85
Phase aqueuse inférieure (P5) (PVC)	451	102
Phase aqueuse supérieure (P6) (PVC)	360	81
Phase aqueuse inférieure (P6) (PVC)	455	103
Phase aqueuse supérieure (P7) (Acier inoxydable)	367	83
Phase aqueuse inférieure (P7) (Acier inoxydable)	450	102
Phase aqueuse supérieure (P8) (Acier inoxydable)	363	82
Phase aqueuse inférieure (P8) (Acier inoxydable)	422	95
Phase aqueuse supérieure (P9) (Acier inoxydable)	341	77
Phase aqueuse inférieure (P9) (Acier inoxydable)	473	107

Tableau 1 : Quantité totale en mg de NO₃⁻ et de mg N-NO₃⁻ transformée dans chacune des phases aqueuses de l'expérience à 21 jours d'incubation. En gras, les phases pour lesquelles on observe une diminution de l'efficacité de la dénitrification entre la première et deuxième période.

Comme confirmé à la vue du Tableau 1, il existe une différence de près de 100 mg de nitrate transformé (vraisemblablement réduit par couplage avec l'oxydation de la matière organique), ce qui rend plausible notre hypothèse de la diminution de la vitesse de dénitrification à partir de 16 jours dû à un manque de matière organique disponible.

L'un des aspects avantageux de l'objectif du projet LowNitrate est justement de permettre aux bactéries d'utiliser les électrons obtenus par oxydation de la matière organique localisée plus en profondeur grâce à la présence de l'électrode conductrice (voir Chapitre I : Introduction) et

donc d'augmenter la quantité d'électrons fournis. Néanmoins pour que cela puisse fonctionner, il faut que le potentiel de cette électrode soit thermodynamiquement favorable pour l'oxydation de la matière organique par des bactéries exo-électrogènes, soit un potentiel supérieur ou égal à environ -0.5 V versus ECS d'après l'abondante littérature sur les bio-anodes enrichies en bactéries exo-électrogènes du genre *Geobacter*. L'étude du potentiel des structures porteuses en acier inoxydable des pilotes 7 à 9 est discutée ci-après.

- Suivi des potentiels des structures porteuses en acier inoxydable

Pour rappel, les structures en acier inoxydable sont laissées enterrées dans les sédiments des pilotes 7 à 9 permettant la présence d'une phase aqueuse entre leurs deux grilles. Il est à noter que ces structures sont faites d'un seul bloc d'un point de vue électrochimique (une seule électrode) avec une résistance mesurée entre les deux grilles inférieures à 50 Ω . Ces structures ont ensuite été laissées telles quelles dans leur milieu d'incubation sans imposition externe de potentiel, permettant d'obtenir une estimation du potentiel d'abandon de l'électrode sur le temps d'incubation mesuré par rapport à une électrode de référence au calomel saturée en chlorure ($E = + 0,242 \text{ V vs ENH à } 25^\circ\text{C}$).

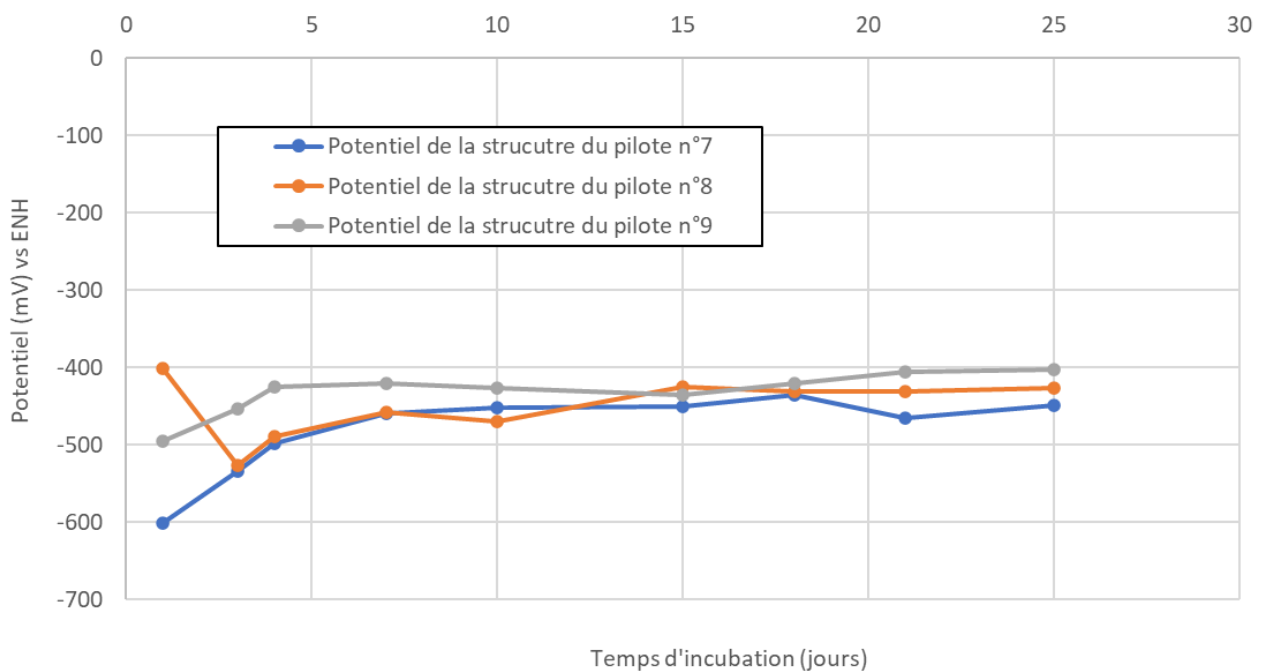


Figure 10: Suivi du potentiel des trois structures en acier inoxydable des pilotes 7, 8 et 9 au cours des 25 jours d'incubation. Les potentiels ont été remis par rapport au potentiel d'équilibre de l'oxydo-réduction de l'hydrogène ($2\text{H}^+/\text{H}_2$) à $\text{pH} = 0$ et 25°C , soit contre une électrode normale à hydrogène.

Sur la Figure 10 on peut observer de façon claire que sur les 5 premiers jours les potentiels des trois structures varient de manière différente selon les pilotes. Par la suite, on observe une stabilisation des potentiels pour les trois pilotes autour d'un potentiel qui reste globalement entre -500 mV et -400 mV vs ENH.

Ces valeurs de potentiel sont à la limite de la gamme de potentiels permettant une oxydation thermodynamiquement favorable de la matière organique en général. En effet, si la matière organique peut entrer dans le métabolisme sous de nombreuses formes, les potentiels thermodynamiques des substrats les plus courants du catabolisme ont des potentiels d'équilibre d'oxydoréduction à $\text{pH} = 7$ moins négatifs que ceux obtenus ici, à avoir $-0,42$ vs ENH à $\text{pH} = 7$ pour le couple Glucose/ CO_2 et $-0,28$ V vs ENH à $\text{pH} = 7$ pour le couple Acétate/ CO_2 d'après le Prescott's Microbiology [11].

Si la valeurs théorique de ces potentiels restent une estimation (le glucose comme l'acétate vont subir toute une gamme de réactions intermédiaires avant l'obtention du CO_2), plusieurs études semblent confirmer que le potentiel d'oxydation de la matière organique à $\text{pH} = 7$ par des bactéries exo-électrogènes tourne autour de $-0,3$ V vs ENH [12] soit une différence faible mais non négligeable et défavorable d'au moins $0,1$ V par rapport aux potentiels observés pour notre structure porteuse. Or, comme expliqué auparavant (Chapitre I : Introduction), afin qu'un transfert d'électron puisse avoir lieu au niveau de l'électrode, il est nécessaire que le potentiel d'abandon de l'électrode soit supérieur à celui du potentiel d'équilibre du couple subissant l'oxydation et inférieur au potentiel d'équilibre du couple de subissant la réduction.

Ainsi, dans notre cas où le potentiel d'oxydation auquel la matière organique est oxydée par les bactéries tourne aux alentours de $-0,3$ V vs ENH à $\text{pH} = 7$ et où la tension de seuil de la réduction des nitrates est observée autour de $-0,1$ V vs ENH à $\text{pH} = 7$, le potentiel d'abandon idéal serait entre les deux. Ainsi, le potentiel d'abandon des structures enterrées est légèrement trop bas pour permettre l'oxydation efficace de la matière organique couplée à une réduction des nitrates.

Néanmoins, il faut relativiser l'importance de cet obstacle en premier lieu car l'incubation dans notre cas est relativement courte (25 jours). Il n'est pas impossible que sur le long terme les potentiels reviennent à des valeurs moins négatives. En effet, la différence d'environ $0,1$ V entre ceux mesurés et ceux observés auxquels la matière organique est oxydée par les bactéries exo-électrogènes à $\text{pH} = 7$ est relativement faible et une diminution de cette différence sur le long terme n'est pas exclue. Il faut aussi garder à l'esprit que les variables agissant sur la valeur du

potentiel d'abandon d'une électrode incubée dans un milieu naturel comme ici sont extrêmement nombreuses et peuvent changer au cours du temps en fonction des conditions physiques, chimiques et biologiques. Incidemment, des changements ont été notés pour cette expérience d'incubation de seulement 25 jours, notamment l'apparition d'une phase gazeuse dans les phases aqueuses profondes des pilotes 4 à 9.

La composition de cette phase gazeuse est une information importante car elle peut nous renseigner sur les métabolismes à l'œuvre dans ces phases aqueuses enterrées et peut nous permettre de corréler la différence d'efficacité de la dénitrification avec les phases supérieures à des conditions physico-chimiques spécifiques.

- Etude de la composition relative des phases gazeuses

Comme expliqué précédemment, dès le deuxième jour d'incubation, l'apparition de bulles statiques a pu être observée au niveau des phases aqueuses enterrées des pilotes 4 à 9. Ces bulles resteront « coincées » dans cette phase sans pouvoir traverser la couche supérieure des sédiments. Le nombre de ces bulles va augmenter de jours en jours jusqu'à l'apparition d'une phase gazeuse continue entre le 15^e et le 19^e jour selon les pilotes. Par Micro-GC, la composition relative (en %) a été mesurée pour chacune des phases gazeuses de chacun des 6 pilotes avec structures porteuses à 22 jours d'incubation.

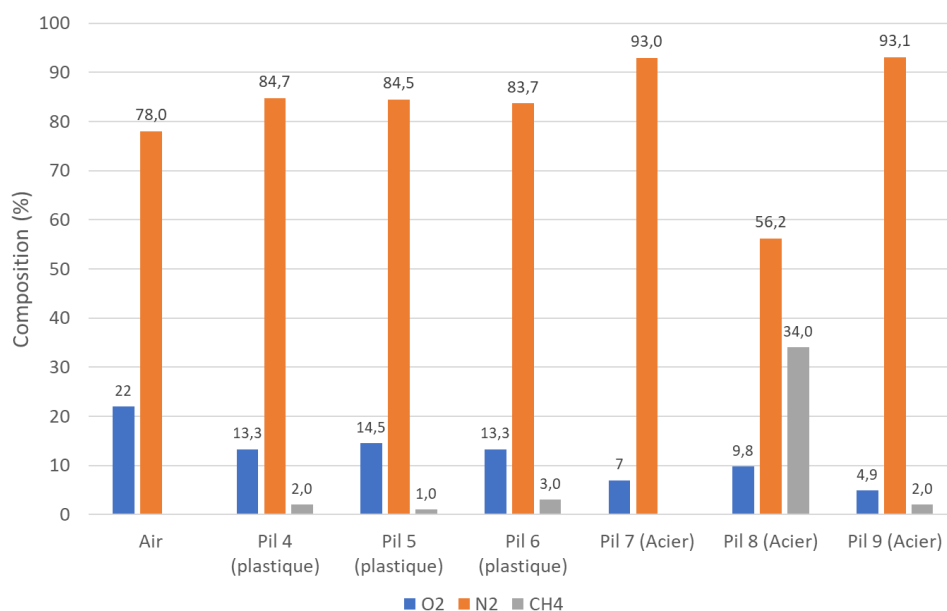


Figure 11 : Mesure de la composition en % des phases gazeuses apparues pendant l'incubation des pilotes 4 à 9 à 22 jours d'incubation. Sur toute la gamme de composés détectables par l'appareil, seuls trois composés ont été détectés en proportion relative significative par le CP-4900 : l'oxygène (O₂), le diazote (N₂) et le méthane (CH₄).

Plusieurs observations peuvent être faites via les données de la Figure 11 :

- ▶ Lorsque l'on compare la proportion en oxygène de ces phases à celle de l'air ambiant, on remarque une quantité relative en oxygène moins importante allant jusqu'à moins de 5 % pour le dernier pilote. Cela semble confirmer que la phase supérieure des sédiments est hermétique.
- ▶ On note également une différence entre les pilotes 4 à 6 incluant une structure porteuse en PVC par rapport à ceux incluant une structure en acier inoxydable. En effet, dans le premier cas, on observe une proportion en oxygène entre 13 et 15 %. En revanche, pour ce qui est des trois pilotes avec une structure en acier inoxydable, celle-ci va de 5 à 10 %. Cette différence semble indiquer qu'il existe un véritable effet de l'acier inoxydable sur la quantité d'oxygène dans ces phases aqueuses enterrées. Cet effet peut globalement s'expliquer de deux manières : soit le dioxygène se réduit de lui-même sur l'acier inoxydable, ce qui est possible thermodynamiquement au vu du potentiel de l'électrode (entre -0,4 et -0,5 V vs ENH, voir Figure 10). En effet, l'oxygène peut se réduire sur acier inoxydable selon deux voies : celle à 2 électrons et celle à 4 électrons :



Néanmoins, il s'avère que sur l'acier inoxydable la réduction de l'oxygène montre une surtension importante, celle-ci variant énormément en fonction des conditions mais surtout en fonction du traitement de l'acier inoxydable lui-même. Néanmoins on peut observer un début de réduction de l'oxygène dès -0,4 V vs ECS [13] à pH neutre, soit un potentiel compatible avec ceux des structures en acier inoxydable relevés et détaillés sur la Figure 9.

L'autre possibilité est que la réduction du dioxygène soit catalysée par des bactéries exo-électrogènes fixées sous forme de biofilms aux grilles d'acier inoxydable, cas déjà documentée [14]. Néanmoins, la quantité très limitée d'ADN obtenue via le protocole d'extraction tend à infirmer cette deuxième hypothèse.

Malgré cette différence en termes de quantité relative en oxygène entre les phases gazeuses des pilotes avec des structures porteuses en acier inoxydable et celles des pilotes avec des structures en PVC, on peut noter qu'aucune différence significative en termes d'efficacité de la dénitrification (voir Figure 9) n'est visible sur 25 jours d'incubation au sein des phases aqueuses profondes. De plus, il semble que l'efficacité de la dénitrification est corrélée avec la quantité en oxygène lorsque l'on compare la vitesse de dénitrification dans les phases aqueuses enterrées

avec celle des phases aqueuses en contact avec l'atmosphère. En effet, si l'on excepte la taille de la surface de contact avec les sédiments deux fois plus importante (pris en compte dans les calculs de la vitesse de dénitrification), l'autre élément majeur différenciant les phases aqueuses enterrées des phases supérieures est l'absence de contact avec l'atmosphère et donc l'impossibilité pour le dioxygène de pénétrer dans cette phase, générant une quantité en oxygène après 22 jours d'incubation inférieure à celle des phases aqueuses supérieures nous permettant d'affirmer que la présence de dioxygène est un facteur critique influant négativement sur la vitesse de dénitrification.

► Enfin, un autre point intéressant est le cas particulier du pilote n°8. En effet, la composition de la phase gazeuse apparue au-dessus de la phase aqueuse enterrée de ce pilote se distingue par une quantité relativement importante de méthane (CH_4) à environ 34 %. Cette observation n'est pas fondamentalement étonnante car il existe toute une gamme de voies métaboliques bactériennes rassemblées sous le terme de « méthanogènes » et les micro-organismes les pratiquants sont, eux, désignés sous le terme d'organismes « méthanogènes ». Ces organismes vont permettre la synthèse du méthane (méthanisation) à partir de toute une gamme de précurseurs allant de l'acétate (acétotrophe) à l'hydrogène (hydrogénotrophe). A noter que par ailleurs, ce métabolisme méthanogène est inhibé par la présence d'oxygène [15].

On peut donc en déduire que dans le cas du pilote n°8, ce type de métabolisme est plus présent que dans le cas des 5 autres pilotes incluant une phase aqueuse enterrée. La raison est difficile à définir, les conditions d'incubation et les inocula naturels étant les mêmes que les deux autres répliquats avec une structure porteuse en acier inoxydable et qui ne montre pourtant pas une proportion de méthane plus importante dans leur poche gazeuse que les pilotes avec structures en PVC. De plus, on remarque également en observant la vitesse de dénitrification dans le détail, pilote par pilote (Figure Annexe 3) que la vitesse de dénitrification au sein de la phase aqueuse profonde du pilote 8 est légèrement inférieure à celle pilotes 7 et 9, aussi bien sur la première période (jours 1 à 16) que sur la deuxième (jour 16 à 25 après second ajout de nitrates).

Cette information est importante car elle nous indique que la pratique d'un métabolisme lié à la méthanogénèse par les micro-organismes va avoir, comme la présence du dioxygène, une influence négative sur l'efficacité de la dénitrification.

Enfin, la dernière analyse liée à cette expérience est l'étude des communautés bactériennes présentes sur les grilles des structures porteuses.

- Analyse des communautés bactériennes

Pour des raisons déjà évoquées dans la partie Matériel et Méthodes, cette analyse ne permettra d'obtenir les communautés des grilles que des pilotes 4, 5 (avec grilles en PVC) et 7 (grilles en acier inoxydable) avec une caractérisation allant uniquement jusqu'au niveau de la *famille* bactérienne (les niveaux de la taxonomie bactérienne sont montrés Figure 12)

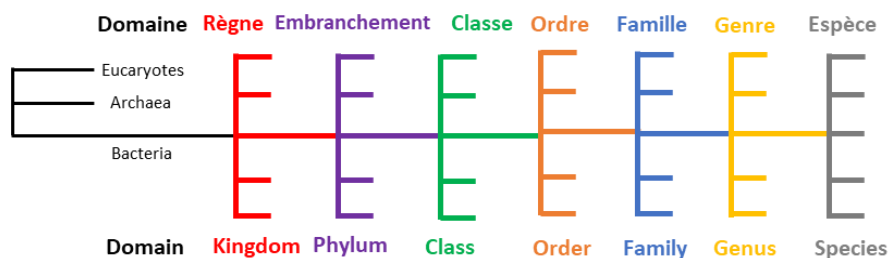


Figure 12 : Représentation schématique des différents niveaux taxonomiques de l'arbre du vivant des bactéries. Traditionnellement, lors de l'analyse d'un Krona pie obtenu après séquençage du gène de l'ARNr 16S, tous les niveaux ne sont pas représentés sur le Krona pour des raisons de lisibilité.

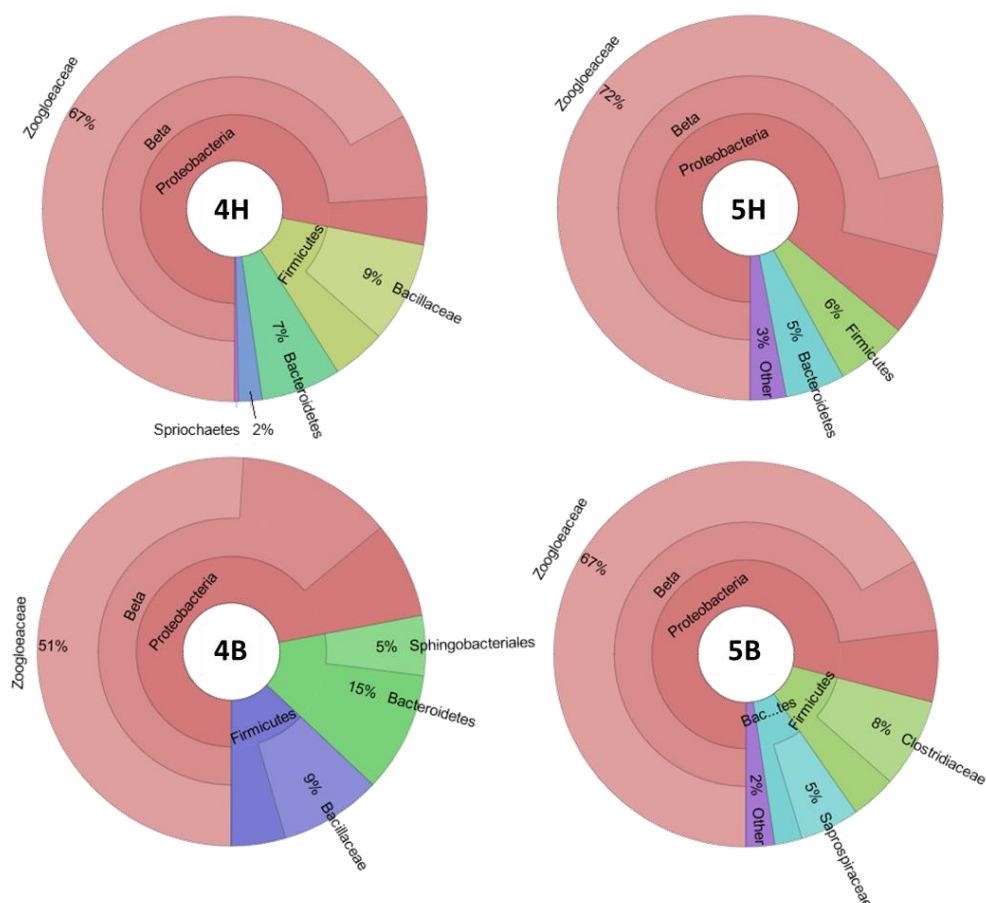


Figure 13 : Krona pie représentant les communautés bactériennes présentes sur les grilles en PVC des structures porteuses des pilotes 4 et 5 séparées selon la position de la grilles, juste au dessus de la phase aqueuse enterrée (H) ou à la base de cette phase (B). Seules les *familles* bactériennes avec plus 5% d'abondance relative sont montrées ici.

A la vue de ces quatre Krona pie visibles Figure 13, deux points majeurs sont à noter :

► En premier lieu, on peut noter la très large domination du phylum des proteobacteria (bactéries de type Gram négative) par rapport aux autres avec jusqu'à 86% pour les communautés localisées sur la grille inférieure du pilote 5. Il faut noter que les protéobactéries regroupent une grande partie des bactéries exo-électrogènes documentées à ce jour [16]. Au sein de ce phylum on peut alors observer une très large prédominance de la famille bactérienne *Zoogloeaceae*. Cette famille inclut les genres bactériens suivant : *Zoogloea*, *Thauera*, *Uliginosibacterium* et *Azoarcus*.

► En plus de cela, on peut observer que les deux phylums observables en quantité significative en plus des protéobacteria sont les Firmicutes (un phylum de bactéries Gram positive) et les Bacteroidetes (un phylum de bactéries Gram négative). Au sein de ces deux phylums, on peut noter la présence de deux familles avec une abondance relative notable que l'on retrouve à plusieurs occurrence : la famille *Bacillaceae* appartenant au phylum des Firmicutes qui contient une très grande quantité de genres bactériens différents (plus de 60) et cette famille est considérée comme incluant les bactéries les plus résistantes qui soient, notamment de par la capacité de beaucoup d'entre elles à sporuler et donc à résister à des conditions physico-chimiques très spécifiques [17]. La deuxième famille visible est celle des *Clostridiaceae* appartenant au phylum des Bacteroidetes qui contient elle aussi un très grand nombre de genres différents trop nombreux pour être détaillés ou pour en sortir des caractéristiques communes.

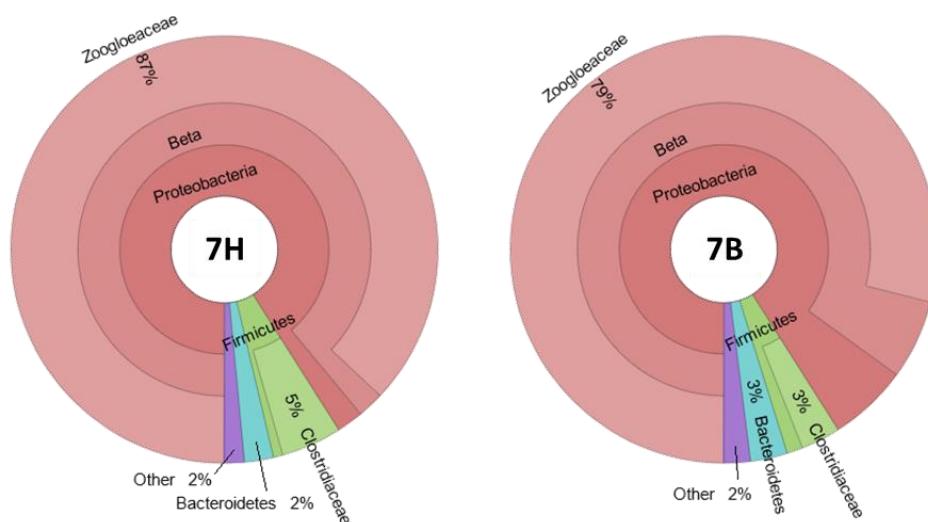


Figure 14 : Krona pie représentant les communautés bactériennes présentes sur les grilles en acier inoxydable des structures porteuses du pilote 7 selon la position des grilles, juste au dessus de la phase aqueuse enterrée (7H) ou à la base de cette phase (7B). Seules les familles bactériennes avec plus 5% d'abondance relative sont montrées ici.

Via la Figure 14, on peut observer que dans le cas des grilles en acier inoxydable, on observe une très grande similarité dans la composition des communautés bactériennes présentes sur les parties supérieures ou inférieures ou de la structure porteuse du pilote 7.

► Ainsi on observe là encore une très large prédominance de la famille bactérienne *Zoogloeaceae* mais avec cette fois-ci une abondance relative encore plus importante avec près de 80% pour les deux grilles du pilote. Il est à noter qu'au sein de cette famille est notamment inclu le genre *Thaurea* dont certaines espèces ont été démontrées comme exo-électrogènes, notamment *Thaurea humireducens* qui a même été isolée à l'origine depuis une pile microbienne [18]. Néanmoins à cause de l'impossibilité de déterminer quels genres de la famille *Zoogloeaceae* sont présents au sein du pilote, on ne peut affirmer avec certitude que la présence d'une grille en acier inoxydable a véritablement permis le développement d'espèces exo-électrogènes en plus grande quantité par rapport aux grilles de PVC.

Après la description des résultats de chacune des ces analyses, une synthèse des résultats s'impose :

► Sur les 25 jours d'incubation, on a pu observer une efficacité de la dénitrification bien plus importante dans les phases aqueuses enterrées sous une couche de sédiments avec +100 % par rapport aux phases supérieures. Or, cette augmentation de l'efficacité n'est pas liée uniquement à l'augmentation de la surface de contact entre les sédiments et la phase aqueuse en question, signifiant qu'une autre variable entre en jeu.

► L'apparition d'une fine phase gazeuse (quelques cm d'épaisseur à la fin de l'expérience) juste au dessus des phases aqueuses enterrées nous a permis de mettre en évidence une teneur en dioxygène inférieure au sein de ces phases par rapport à l'air ambiant. Cela nous a permis d'émettre deux conclusions : premièrement que la couche de sédiments supérieure joue efficacement le rôle de barrière hermétique à l'oxygène et deuxièmement qu'il est très probable que cette teneur en dioxygène plus faible est directement lié à cette augmentation de l'efficacité de la dénitrification au sein de ces phases.

► Le suivi des potentiels des différentes structures en acier inoxydable des trois derniers pilotes nous a donné des valeurs cohérentes entre elles avec stabilisation durant l'incubation entre -400 mV et -500 mV contre ENH. Ces valeurs sont légèrement trop négatives pour espérer une oxydation de la matière organique (observée autour de -0,3 V vs ENH) par un biofilm anodique de type *Geobacter*, sans exclure une évolution favorable possible sur des temps d'incubation plus longs.

► L'étude des communautés bactériennes a permis la mise en lumière d'une très large prédominance de la famille *Zoogloeaceae*, aussi bien sur les structures en PVC que sur celles en acier inoxydable avec une augmentation de cette prédominance dans ce dernier cas.

4) Conclusions

Au vu des résultats obtenus à la fois via cette expérience mais également des résultats de la partie précédente, il est clair que la problématique de la présence du dioxygène est un problème qu'il faut considérer afin de poursuivre cette étude.

En effet, il s'avère que l'augmentation de plus de 100 % de l'efficacité de dénitrification est directement liée à la quantité plus faible d'oxygène dans les phases entérées. Ainsi, la présence d'oxygène n'est pas une simple variable à prendre en compte comme peuvent l'être le pH, la température...etc mais véritablement une caractéristique critique. Cela signifie qu'il est nécessaire de considérer cette problématique dans l'optique de développer des bio-cathodes dénitrifiantes en milieu naturel. Or, comme la quantité d'oxygène dissout dans les eaux naturelles ne peut être contrôlée, il devient essentiel de régler cette problématique à l'échelle de l'électrode elle-même via la mise au point d'un montage permettant de créer des conditions pseudo-anoxiques.

La première perspective et la plus évidente est de tenter de développer une électrode spécifique qui permettrait de limiter la présence d'oxygène tout en permettant une dénitrification exo-électrogène. En effet, dans notre cas, nous nous sommes servi des sédiments comme barrière hermétique contre la pénétration de l'oxygène dans les phases aqueuses profondes. Néanmoins, comme l'étude préliminaire l'a confirmé, cette couche de sédiments empêche également le passage des nitrates. L'idéal serait donc d'identifier un moyen d'obtenir un juste milieu à savoir une méthode permettant d'empêcher le passage de l'oxygène tout en permettant celui des nitrates jusqu'à la zone de l'électrode sur laquelle la dénitrification exo-électrogène aura lieu.

V) Références

- [1] L. Denis, C. Grenz, Spatial variability in oxygen and nutrient fluxes at the sediment-water interface on the continental shelf in the Gulf of Lions (NW Mediterranean), *Oceanol. Acta.* 26 (2003) 373–389. [https://doi.org/10.1016/S0399-1784\(03\)00017-3](https://doi.org/10.1016/S0399-1784(03)00017-3).
- [2] M. Sayama, Presence of Nitrate-Accumulating Sulfur Bacteria and Their Influence on Nitrogen Cycling in a Shallow Coastal Marine Sediment, *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (2001) 3481–3487. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.8.3481-3487.2001>.
- [3] D. de Beer, J.-P.R.A. Sweerts, Measurement of nitrate gradients with an ion-selective microelectrode, *Anal. Chim. Acta.* 219 (1989) 351–356. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)80369-4](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)80369-4).
- [4] Seasonality and depth distribution of the abundance and activity of ammonia oxidizing microorganisms in marine coastal sediments (North Sea), *Front. Microbiol.* (2014). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00472>.
- [5] R.N. Glud, Oxygen dynamics of marine sediments, *Mar. Biol. Res.* 4 (2008) 243–289. <https://doi.org/10.1080/17451000801888726>.
- [6] W.-J. Cai, F.L. Sayles, Oxygen penetration depths and fluxes in marine sediments, *Mar. Chem.* 52 (1996) 123–131. [https://doi.org/10.1016/0304-4203\(95\)00081-X](https://doi.org/10.1016/0304-4203(95)00081-X).
- [7] E. Kristensen, Organic matter diagenesis at the oxic/anoxic interface in coastal marine sediments, with emphasis on the role of burrowing animals., *Hydrobiologia.* 426 (2000) 1–24. <https://doi.org/https://doi.org/10.1023/A:1003980226194>.
- [8] R.P. North, R.L. North, D.M. Livingstone, O. Köster, R. Kipfer, Long-term changes in hypoxia and soluble reactive phosphorus in the hypolimnion of a large temperate lake: consequences of a climate regime shift, *Glob. Chang. Biol.* 20 (2014) 811–823. <https://doi.org/10.1111/gcb.12371>.
- [9] H.L. Leverenz, K. Haunschild, G. Hopes, G. Tchobanoglous, J.L. Darby, Anoxic treatment wetlands for denitrification, *Ecol. Eng.* 36 (2010) 1544–1551. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2010.03.014>.
- [10] Ü. Mander, J. Tournebize, M. Espenberg, C. Chaumont, R. Torga, J. Garnier, M. Muhel, M. Maddison, J.D. Lebrun, E. Uher, K. Remm, J. Pärn, K. Soosaar, High

- denitrification potential but low nitrous oxide emission in a constructed wetland treating nitrate-polluted agricultural run-off, *Sci. Total Environ.* 779 (2021) 146614. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146614>.
- [11] J.M. Willey, L.M. Sherwood, C.J. Woolverton, Electron Transport and Oxidative Phosphorylation, in: Prescott's Microbiol., 9th ed., McGraw-Hill, 2013: pp. 239–248.
- [12] A.S. Commault, G. Lear, M.A. Packer, R.J. Weld, Influence of anode potentials on selection of *Geobacter* strains in microbial electrolysis cells, *Bioresour. Technol.* 139 (2013) 226–234. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.04.047>.
- [13] N. Le Bozec, C. Compère, M. L'Her, A. Laouenan, D. Costa, P. Marcus, Influence of stainless steel surface treatment on the oxygen reduction reaction in seawater, *Corros. Sci.* 43 (2001) 765–786. [https://doi.org/10.1016/S0010-938X\(00\)00113-X](https://doi.org/10.1016/S0010-938X(00)00113-X).
- [14] B. Erable, I. Vandecandelaere, M. Faimali, M.-L. Delia, L. Etcheverry, P. Vandamme, A. Bergel, Marine aerobic biofilm as biocathode catalyst, *Bioelectrochemistry.* 78 (2010) 51–56. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2009.06.006>.
- [15] R.K. Thauer, Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson:1998 Marjory Stephenson Prize Lecture, *Microbiology.* 144 (1998) 2377–2406. <https://doi.org/10.1099/00221287-144-9-2377>.
- [16] B.E. Logan, R. Rossi, A. Ragab, P.E. Saikaly, Electroactive microorganisms in bioelectrochemical systems, *Nat. Rev. Microbiol.* 17 (2019) 307–319. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0173-x>.
- [17] I. Mandic-Mulec, P. Stefanic, J.D. van Elsas, Ecology of Bacillaceae, *Microbiol. Spectr.* 3 (2015). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.TBS-0017-2013>.
- [18] G.-Q. Yang, J. Zhang, S.-W. Kwon, S.-G. Zhou, L.-C. Han, M. Chen, C. Ma, L. Zhuang, *Thauera humireducens* sp. nov., a humus-reducing bacterium isolated from a microbial fuel cell, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63 (2013) 873–878. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.040956-0>.

VI) Annexes

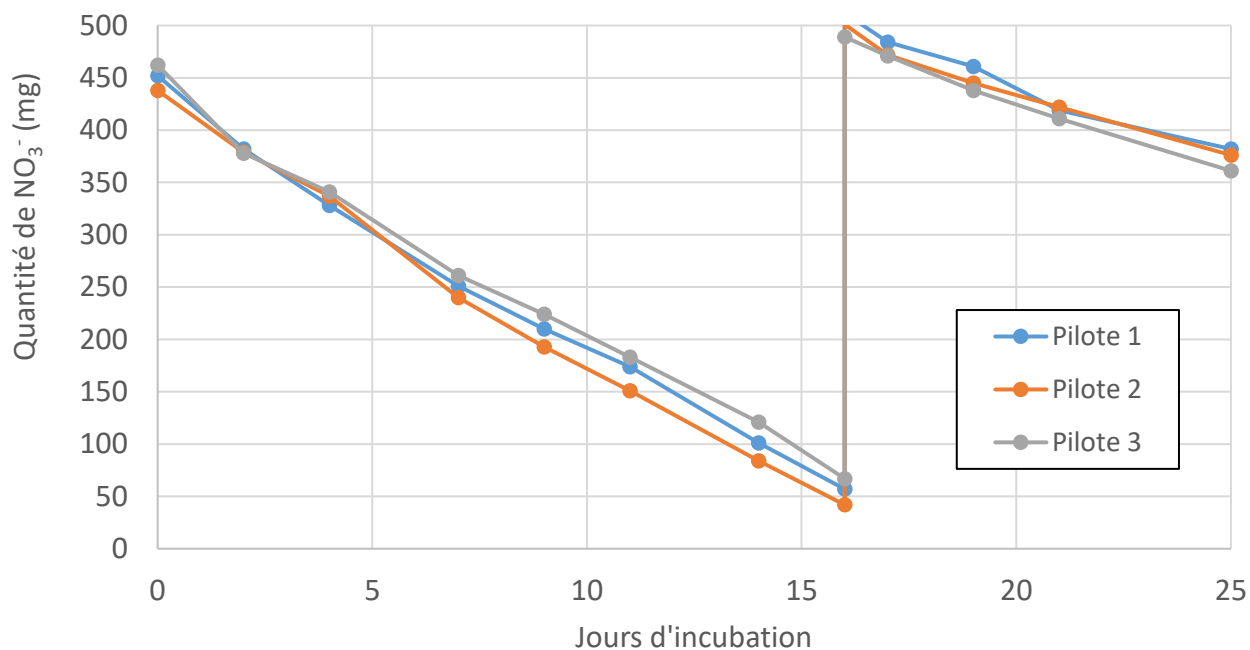


Figure Annexe 1 : Evolution des quantités de nitrate dans les phases aqueuses des pilotes 1, 2 et 3

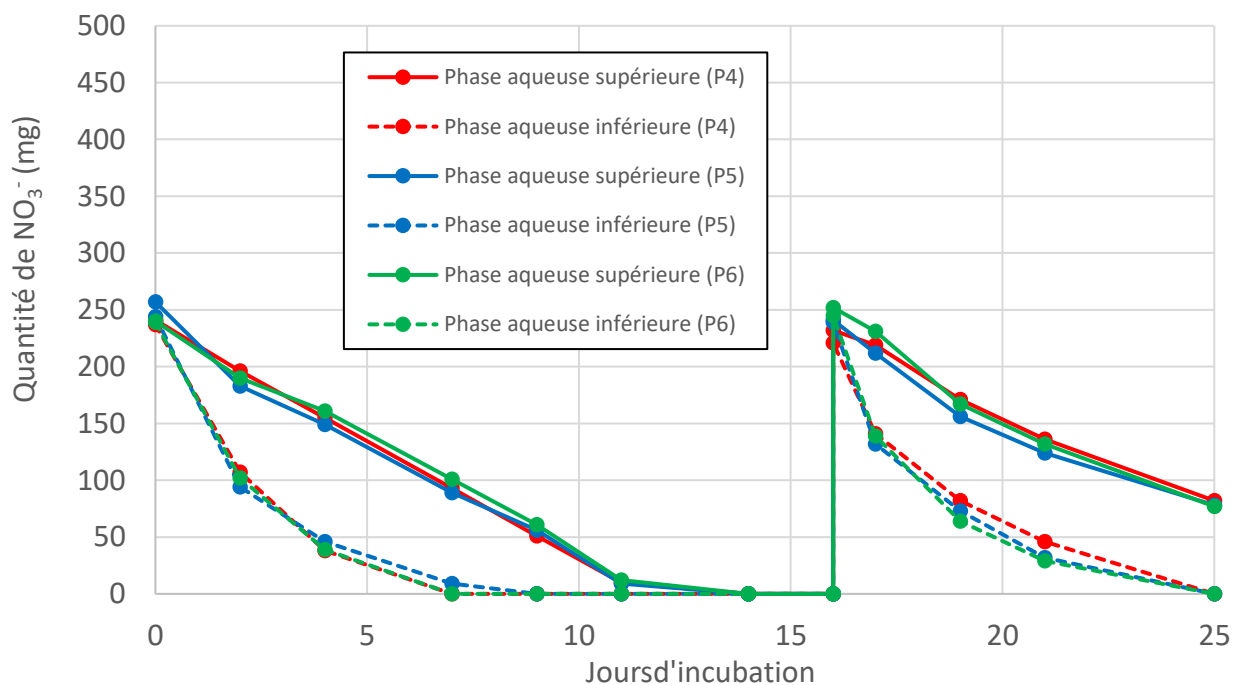


Figure Annexe 2 : Evolution des quantités de nitrate selon les phases aqueuses des différents pilotes 4, 5 et 6 possédant une structure porteuse en PVC.

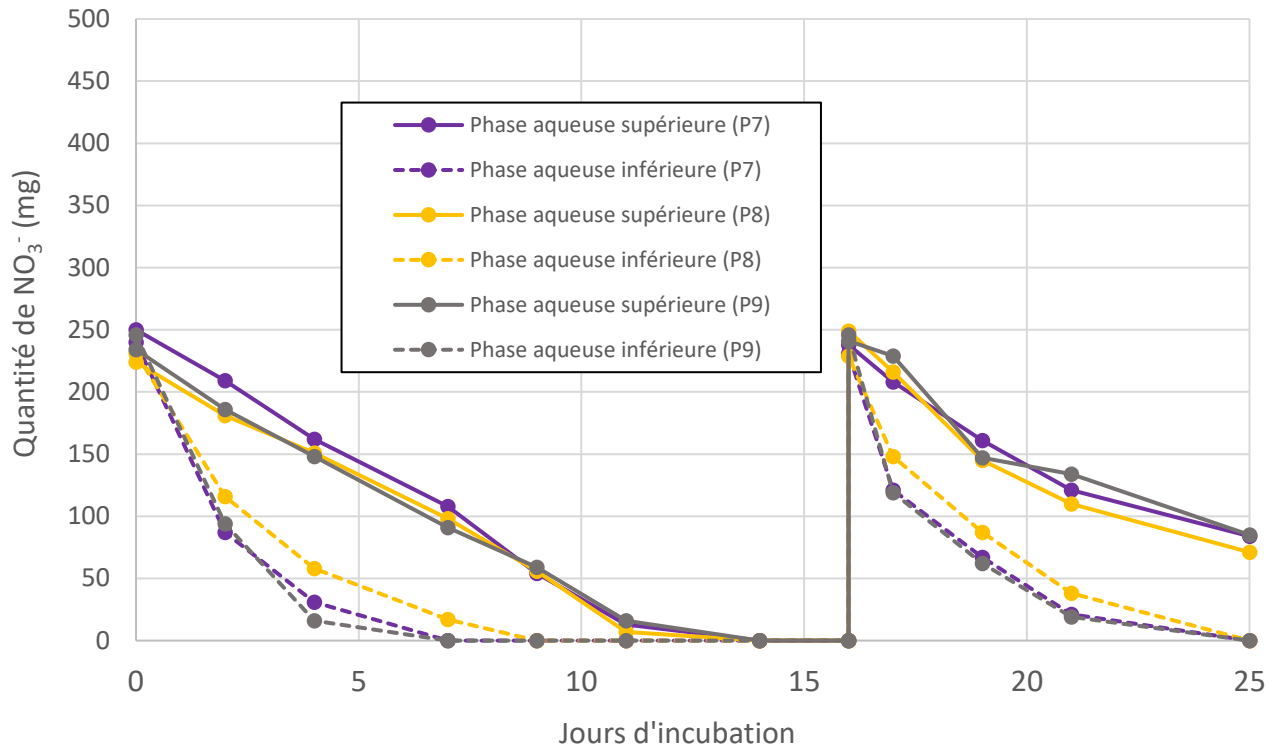


Figure Annexe 3 : Evolution des quantités de nitrate selon les phases aqueuses des différents pilotes 7, 8 et 9 possédants une structure porteuse en acier inoxydable.

Chapitre IV – Développement de bio-cathodes à nitrates sous polarisation constante

Résultats publiés [1]

Table des Matières

I) Introduction	144
II) Matériel et Méthodes	146
III) Résultats	150
• Chronoampérométrie	150
• Comparaison de l'efficacité de la dénitrification	152
• Etudes des communautés bactériennes	154
▶ Communautés bactériennes des sédiments des six pilotes	154
▶ Communautés bactériennes dans les compartiments des trois électrodes	156
▶ Synthèse de l'étude des communautés bactériennes des électrodes	160
IV) Synthèse et Conclusion	162
V) Références	164

I) Introduction

Grâce à l'obtention des résultats des expériences précédentes, une nouvelle tentative de développement de bio-cathodes dénitrifiantes peut désormais être tentée en incluant les informations obtenues précédemment. Le point le plus important à considérer durant cette nouvelle tentative est bien évidemment le cas de la compétition entre l'oxygène et le nitrate comme accepteur terminal d'électron. La mise au point d'un montage permettant la création d'une zone pseudo-anoxique via l'utilisation de granules de graphite a été fait mais n'est pas détaillé dans cette thèse. Ce montage sera exploité ici dans l'optique d'obtenir une dénitrification optimale, qu'elle soit de nature exo-électrogène ou non.

Au-delà de la tentative d'optimisation de la dénitrification, d'autres informations importantes seront collectées, notamment l'identification de la (ou les) localisations possibles de la dénitrification exo-électrogène (via captation d'électrons depuis une électrode) en zone pseudo-anoxique. En effet, il est admis que la dénitrification classique (réduction du nitrate via un électron obtenu par oxydation de la matière organique) a lieu à la surface des sédiments. On peut lister trois raisons principales à cette localisation : tout d'abord l'absence d'oxygène dans les premiers centimètres de sédiments.

Deuxièmement, vient la présence de matière organique à oxyder et donc une source d'électrons permettant la réduction des nitrates.

Enfin la présence de source de carbone destiné à l'anabolisme bactérien. En effet, comme expliqué dans l'introduction, le métabolisme bactérien se divise en trois caractéristiques fondamentales : les sources d'énergie (ici elle sera chimique car non lumineuse), la source d'électrons (dans notre montage l'électrode doit permettre de fournir ces électrons aux bactéries exo-électrogènes) et enfin la source de carbone permettant la synthèse de tous les composants de la cellule (anabolisme). Pour cette troisième caractéristique, on trouve alors deux types d'organismes : ceux ne pouvant utiliser que le carbone organique (hétérotrophes) et ceux capables d'utiliser le carbone inorganique comme source de carbone (autotrophe).

Or, si un montage basé sur des granules de graphite nous permet bel et bien de générer une zone pseudo-anoxique locale au niveau de l'électrode sur un long temps d'incubation alors la première condition (absence d'oxygène) est obtenue au niveau de l'électrode. De plus, si l'ajout d'une polarisation de cette dernière via un potentiostat couplé à une contre électrode permet également l'acheminement d'électrons depuis cette contre-électrode on peut ainsi résoudre le

besoin en électrons lié à la dénitrification, et donc la deuxième condition. Pour la troisième condition, un ajout de carbone inorganique (pouvant être anabolisé via réduction par les organismes autotrophes mais non oxydé pour obtenir des électrons) est effectué. Ainsi, les trois caractéristiques physico-chimiques responsables de la localisation de la dénitrification dans les sédiments de surface sont réunies.

De fait, il est envisageable qu'il soit possible d'obtenir une dénitrification exo-électrogène localisée à d'autres endroits clés de la niche écologique qu'est une zone humide.

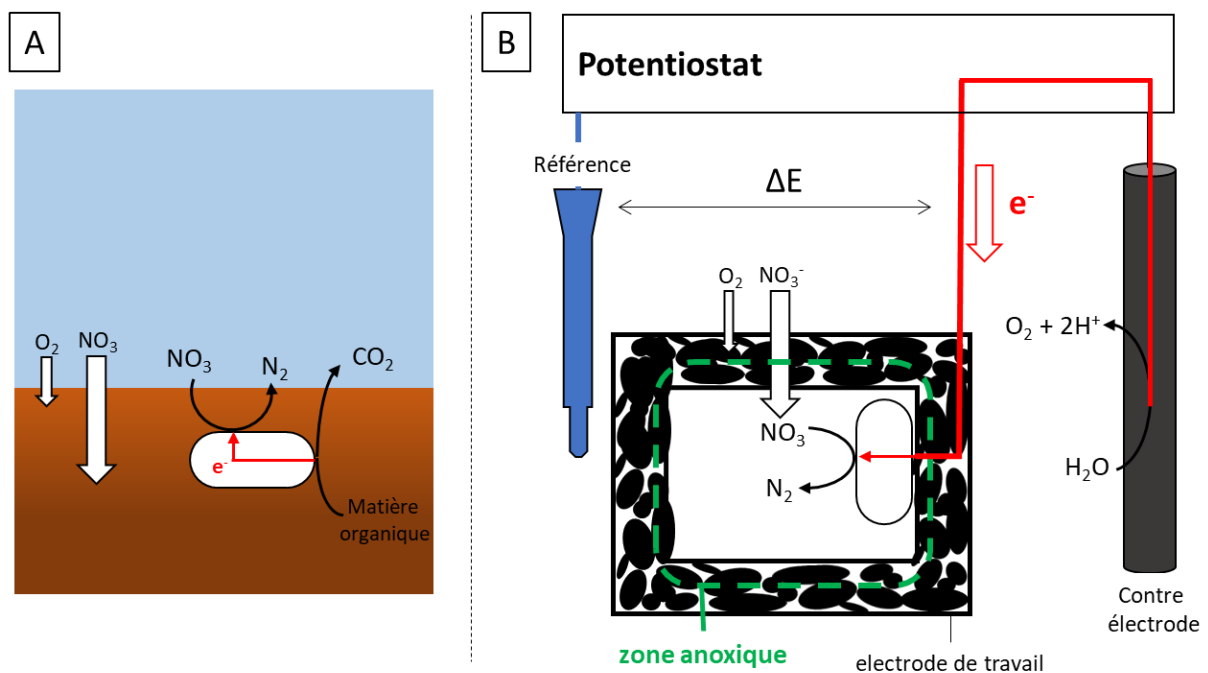


Figure 1 : Comparaison des conditions permettant la dénitrification, (A) dans un contexte naturel et (B) via une dénitrification exo-électrogène au sein du montage de cette expérience. Dans les deux cas, l'absence d'oxygène et l'apport d'électrons sont présents. Si le montage (B) est couplé à l'ajout d'une source de carbone inorganique anabolisable comme le carbonate, alors la dénitrification telle que décrite ici doit théoriquement pouvoir se faire hors des sédiments.

Comme montré sur la Figure 1, l'électrode utilisée sera alors conçue de telle sorte qu'elle contienne trois compartiments séparés permettant des prélèvements biologiques distincts selon leur localisation durant l'incubation. Comme évoqué précédemment, la polarisation constante de l'électrode est un point central du montage. En effet, durant les tests concernant les granules de graphite (non détaillés ici), nous avons mis en évidence qu'une barrière de granules de graphite n'empêche pas totalement la diffusion de l'oxygène mais la ralentit uniquement. Il est donc nécessaire que l'oxygène soit consommé au niveau de l'électrode plus rapidement qu'il ne diffuse à travers le graphite. Il est donc essentiel que le potentiel appliqué à l'électrode dans son entièreté permette à la fois la réduction du dioxygène sur graphite mais doit également

permettre la réduction du nitrate par des bactéries exo-électrogènes. Le potentiel qui a ainsi été choisi est $-0,5 \text{ V vs ECS}$ soit $-0,256 \text{ V vs NHE}$. En effet, on sait qu'à ce potentiel le dioxygène peut se réduire sur graphite (voir Figure 18 et 19 du Chapitre II, page 96 et 97) mais également que certaines espèces bactériennes exo-électrogènes sont capables de réduire le nitrate par captation d'électrons depuis une électrode aux alentours de ce potentiel [2][3][4][5] à $\text{pH} = 7$. Dans cette configuration incluant une polarisation externe via un potentiostat, la partie anodique du Snorkel bactérien où des bactéries sont censées fournir les électrons via oxydation de la matière organique et les transférer à l'électrode est remplacée par la contre électrode.

II) Matériel et Méthodes

- Montage des électrodes

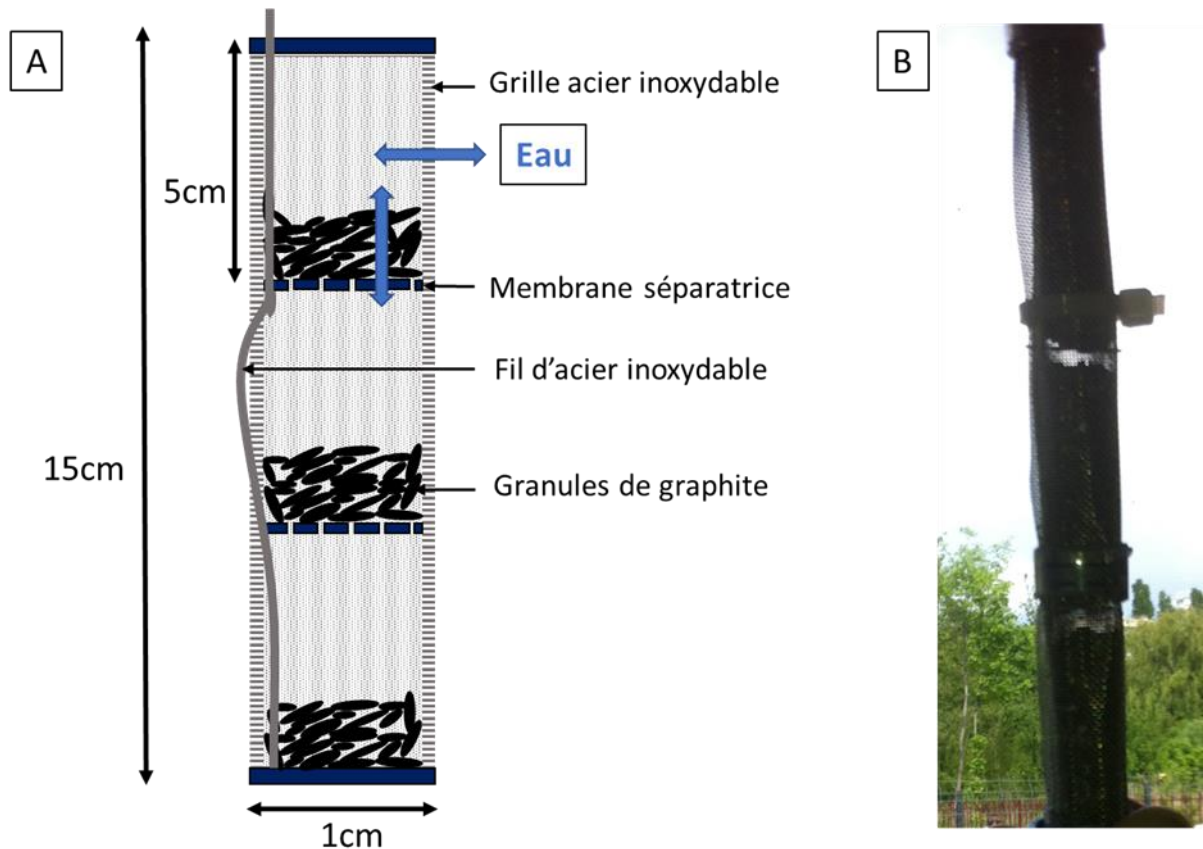


Figure 2 : (A) Schéma du montage des électrodes utilisées pour cette expérience (B) Photographie de l'une des électrodes.

Trois électrodes ont été montées selon plan spécifiques comme montré Figure 2 et de la façon suivante : Une grille d'acier inoxydable (entre 16 et 18 % de chrome, 37 % d'ouverture, des pores de 0,38 mm de diamètre, et des filaments de 0,2 mm d'épaisseur) a été utilisée afin de créer des cylindres d'acier inoxydable de 15 cm de haut de 1 cm de diamètre. A l'intérieur du

cylindre ont été placés des petites membranes de plastique percées afin de créer trois compartiments séparés au sein même de l'électrode où ont été placés 2 g de granules de graphite. Ces membranes séparatrices ont été percées d'une douzaine de trous de 1 mm de diamètre afin de pouvoir laisser passer d'un compartiment à l'autre l'eau et les bactéries mais pas les granules de graphite. Un fil d'acier inoxydable a ensuite été insérée dans le montage en s'assurant que ce fil traverse bien les trois compartiments en étant en contact avec les granules de graphite comme le cylindre en acier inoxydable. Plusieurs mesures de résistance entre différents endroits de l'électrodes ont été effectués avec toujours une valeur inférieure à 10 Ω .

- Structures des pilotes

Six cylindres en PVC transparent de 7,5 cm de diamètre ont été bâtis et fixés à des plaques de PVC. Dans ces réacteurs, 500 g de sédiments secs broyés de Rampillon (collectés au mois d'avril) ont été mélangés avec 600 mL d'eau collectés également à Rampillon avec une concentration initiale en nitrate et nitrite (avant le début de l'expérience) quasiment nulle. A cette eau a été ajouté du carbonate de sodium (NaCO_3) pour une concentration finale de 1 g.L⁻¹. Les parois des cylindres ont été couvertes par du papier aluminium durant toute l'incubation afin d'empêcher la lumière de pénétrer par les côtés, ce qui n'est pas le cas du haut des cylindres afin de permettre à la lumière de pénétrer par le haut du pilote dans l'optique de mimer au mieux les conditions naturelles.

Dans trois de ces six pilotes, une des électrodes compartimentées précédemment décrites a été partiellement enfoncée dans les sédiments afin que le compartiment du haut soit localisé dans l'eau, que celui du milieu soit localisé à l'interface entre l'eau et les sédiments et que celui du milieu soit uniquement localisé dans les sédiments (montré Figure 3). Pour la contre électrode, un compartiment en verre rempli de tampon phosphate (0,1 M de K_2HPO_4 et 0,1 M KH_2PO_4) terminé par une membrane échangeuse de protons a été placé dans trois des six pilotes à côté de l'électrode compartimentée. Dans ce compartiment en verre a ensuite été placé un fil de platine comme contre-électrode. En plus de l'électrode de travail (électrode compartimentée) et de la contre-électrode, une électrode de référence ECS (+ 0,242 V vs NHE à 25°C) a également été placée dans ces trois premiers pilotes. Les trois autres pilotes ont été laissés avec simplement des sédiments et de l'eau sans ajout autre que le carbonate de sodium.

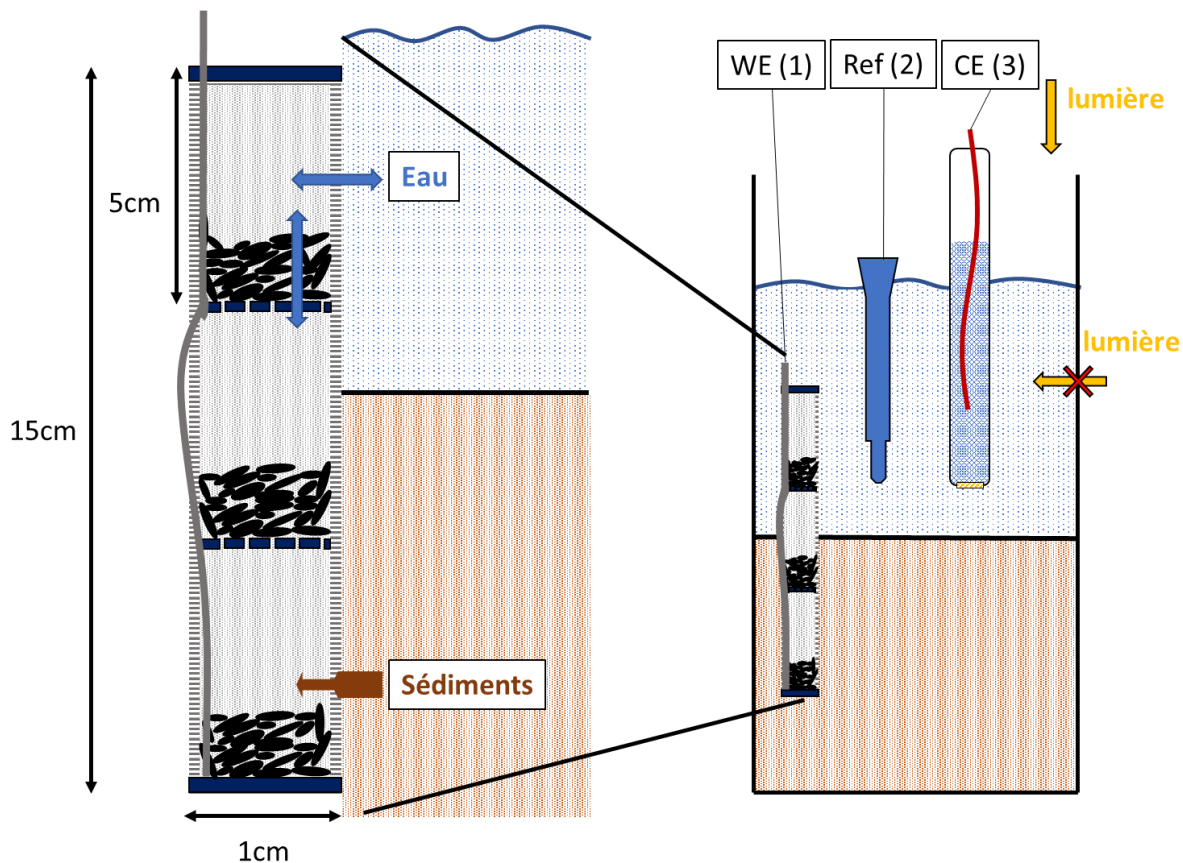


Figure 3 : Schéma représentant le montage général des trois premiers pilotes avec (1) l'électrode de travail compartimentée (WE), (2) l'électrode de référence de type ECS (Ref), et (3) le compartiment en verre contenant la contre électrode en platine (CE).

- Chronologie de l'expérience globale

Les trois pilotes contenant un montage à trois électrodes sont nommés pilotes n°1, 2 et 3 et les trois pilotes avec uniquement des sédiments et de l'eau de Rampillon sont nommés pilotes 4, 5 et 6. Tous les pilotes ont été incubés dans une pièce à température contrôlée à 23°C en permanence avec 9 heures de lumière artificielle par jours pendant une durée totale de 26 jours (623 h). Le pH a été mesuré tous les deux jours et ce dernier a toujours été compris entre 6 et 8 pour les six pilotes. Des échantillons d'eau (1,5 mL) ont été prélevés tous les 2 jours ainsi qu'avant et après chaque addition en nitrate de sodium. Les trois électrodes de travail ont été laissées sans polarisation pendant les 4 premiers jours d'incubation (102 heures) avant d'être toutes les trois polarisées à -0,5 V vs ECS avec enregistrement de l'évolution de courant pour le reste de l'incubation. L'ajout initial (à t=0 de l'incubation) en nitrate a été fixé à 400 mg.L⁻¹ (90 mg N-NO₃.L⁻¹). Trois additions supplémentaire de nitrate de sodium ont été ensuite effectuée durant l'incubation (+ 500 mg.L⁻¹ de NO₃⁻ ou + 113 mg N-NO₃⁻.L⁻¹) dans chaque pilotes à 190 h, 336 h et 600 h.

- Chronologie de l'étude électrochimique

Dans un premier temps, afin de vérifier si la présence de l'électrode de travail seule sans polarisation par un potentiostat influe ou non sur la vitesse de dénitrification, les électrodes de travail des trois premiers pilotes ont été laissées sans aucune polarisation pendant les quatre premiers jours. A partir de 102 heures, les électrodes de travail des trois premiers pilotes ont été polarisées à -0,5 V vs ECS via un potentiostat du model VMP3 multivoies du fabricant Biologic® avec enregistrement de l'évolution du courant à ce potentiel durant toute la durée restante de l'incubation. Les données de chronoampérométrie ont été traitées via le logiciel EC-lab du même fabricant que le potentiostat.

- Etude des communautés bactériennes des granules de graphite et des sédiments

Après 26 jours d'incubation, 0,25 g de granules de graphite de chacun des trois compartiments de chacune des trois électrodes (9 échantillons en tout) ont été prélevés. Au même moment, ont également été prélevés 0,25 g de sédiments de surface (en contact avec l'eau) pour les six pilotes, notamment près de l'électrode de travail (1 cm) pour les trois premiers pilotes. L'extraction de l'ADN de ces échantillons a été effectué via le kit d'extraction DNeasy® PowerSoil® de fabricant Quiagen® en suivant les instructions du fabricant. Les amorces 515F et 928R ont ensuite été utilisés afin d'amplifier les régions variables V4-V5 du gène codant pour l'ARNr 16S. Le reste du protocole d'amplification et séquençage est similaire à celui décrit dans le Chapitre II (Matériel et Méthodes, page 81).

- Traitement des données en bio-informatique

Les données sous format FASTQ ont été traitées via Galaxy (comme décrit dans le Chapitre II, Matériel et Méthode, page 87) en utilisant la base de données SILVA 132 16S. Après traitement, 17 % des séquences ont pu être attribuées à une seule espèce bactérienne spécifique, 47 % uniquement à un genre bactérien et 5 % à seulement une famille bactérienne sans pouvoir définir le genre ou l'espèce auquel appartient la séquence amplifiée. Les résultats seront montrés jusqu'au niveau taxonomique du genre bactérien. On peut aussi noter que chacun des 15 échantillons regroupent, après traitement bio-informatique, au moins 20 000 séquences différentes (ou reads), ce qui est considéré comme fiable pour une étude des communautés via amplification du gène de l'ARNr 16S.

- Analyse des concentrations en nitrate

Les concentrations en nitrate ont été déterminées via l'utilisation de la chromatographie ionique sur un modèle 881 Compact IC pro (Metrohm®). Pour cela, une solution contrôle (50 mg.L⁻¹ de NO₃⁻) a été passée 5 fois avec toujours une marge d'erreur en dessous de 5 %. L'efficacité de la dénitrification est donnée en mg de N-NO₃⁻ transformés par jour et par mètres carrés de sédiments en contact avec la colonne d'eau sur une période donnée (0,0044 m² dans le cas de nos six pilotes). Trois périodes ont été choisies : (1) avant polarisation de 0 à 102 h, (2) Première addition de nitrate de sodium de 190 h à 336 h et (3) Deuxième addition de 336 h à 600 h.

- Etude statistique

Les données concernant l'efficacité de la dénitrification ont été traitées statistiquement via une analyse à un facteur de la variance (ANOVA) en utilisant le logiciel libre Rstudio (version 3.6.1). Une différence est considérée comme significative pour une *p-value* < 0,05.

III) Résultats

- Chronoampérométrie

Comme montré Figure 4, les électrodes des trois premiers pilotes (1, 2 et 3) ont été polarisées à -0,5 V vs ECS à partir du 4^e jour (102 h) jusqu'à la fin de la l'incubation (26 jours, 623 h) et l'évolution du courant a été enregistrée sur toute la durée de la polarisation. Pour rappel, le nitrate de sodium (500 mg.L⁻¹ de NO₃⁻ ou 113 mg N-NO₃⁻.L⁻¹) a été ajoutés dans les six pilotes à 190 h, 330 h, 600 h. Les trois électrodes de travail des trois premiers pilotes ont montré un courant de réduction minimum toujours présent durant toute la durée de la polarisation (environ -0,27 mA pour le pilote 1 et -0,2 mA pour les pilotes 2 et 3). Ce courant est très probablement lié à la réduction de l'oxygène qui peut se réduire à ce potentiel de -0,5 V vs ECS sur graphite [6]. Lors de la première addition de nitrate de sodium à 190 h, une claire augmentation du courant de réduction (négatif) est alors observée dans le cas des trois pilotes. Cette augmentation du courant est attribuée à une dénitrification par des bactéries exo-électrogènes localisées sur l'électrode de travail.

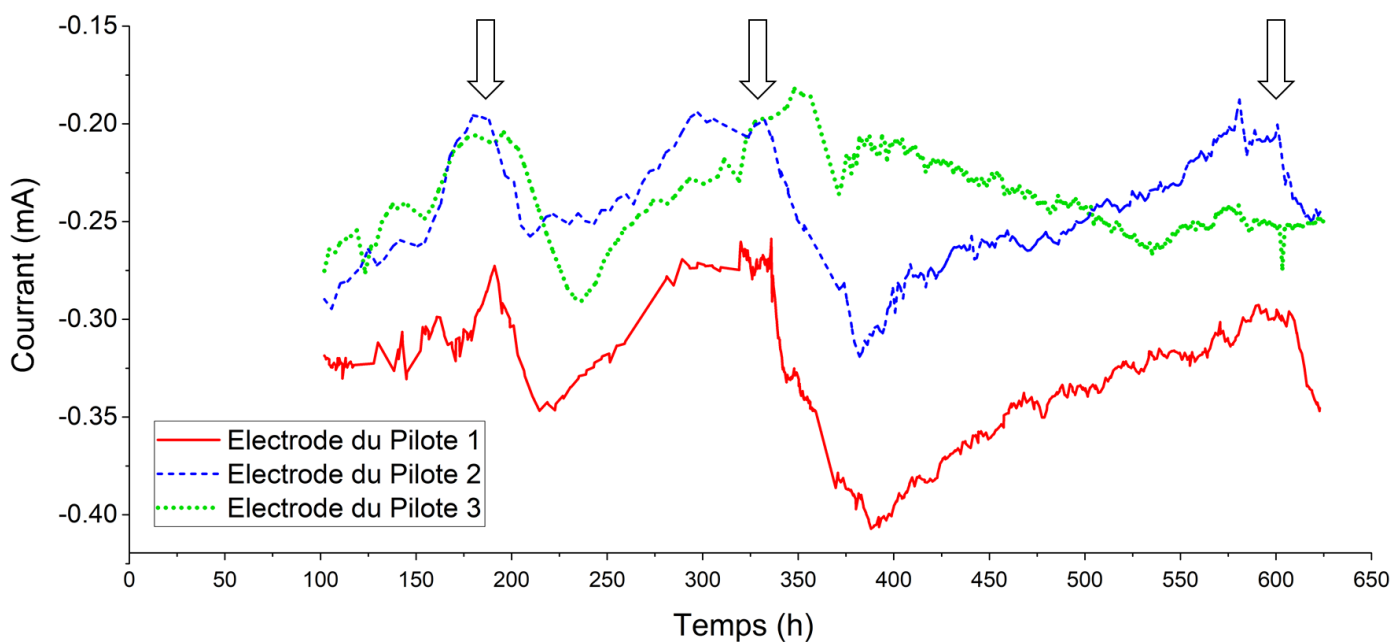


Figure 4 : Evolution du courant au cours du temps pour les électrodes de travail des pilotes 1, 2 et 3. Le potentiel a été fixé à $-0,5$ V vs ECS depuis le jour 4 jusqu'au jour 26 (623 h). Les concentrations initiales en nitrate ($t=0$) ont été fixées à 400 mg.L^{-1} et les trois additions en nitrate de sodium qui ont été effectuées à 190 h, 336 h, et 600 h ($+ 500$ mg.L^{-1} de NO_3^-) sont représentées par des flèches sur la figure.

En effet, comme montré précédemment (Chapitre II, Résultats, première partie), le nitrate ne peut se réduire de façon abiotique sur le graphite ou l'acier inoxydable à ce potentiel et dans ces conditions (23°C , pH entre 6 et 8). Or, une augmentation du courant de réduction telle que visible sur la Figure 4 lors du premier l'ajout de nitrate de sodium démontre que ce courant est lié à leur réduction. On peut néanmoins noter que dans le cas du troisième pilotes (vert, pointillé), l'augmentation du courant de réduction est légèrement différée par rapport aux deux autres pilotes qui, eux, montrent une augmentation du courant de réduction très rapide immédiatement après l'ajout du nitrate de sodium. De plus, alors que ces deux premiers pilotes montrent une réaction similaire aux deux autres ajouts suivants (336 et 600 h) de nitrate de sodium, dans le cas du pilote n°3, on observe cette fois-ci une absence de réaction à ces deux ajouts, à l'exception d'une très légère augmentation du courant de réduction dans le cas du deuxième ajout (à 336 h) et après un temps de latence.

- Comparaison de l'efficacité de la dénitrification

L'efficacité de la dénitrification (comme décrite dans le Chapitre III, page123) est comparée entre les différents pilotes et sur les trois périodes définies précédemment à savoir de 0 à 190 h, de 190 h à 336 h et de 336 à 600 h.

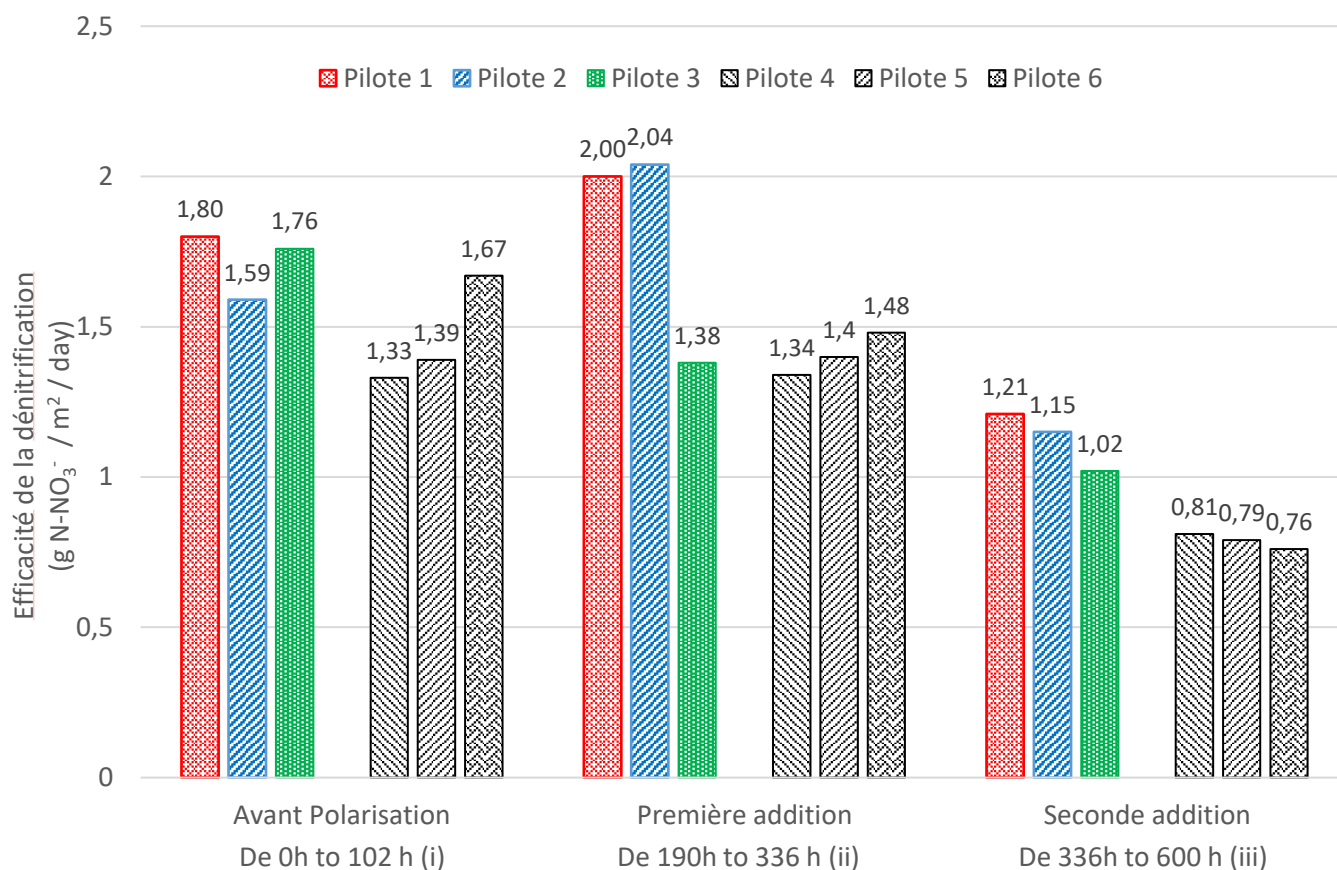


Figure 5 : Efficacité de la dénitrification sur les trois périodes de l'incubation en g de N-NO₃⁻ par jour et par m² de sédiments (la surface pour chaque pilote est de 44,15 cm²). Le temps d'incubation a été divisé en trois périodes différentes : (1) avant polarisation (2) entre le premier et le deuxième ajout en nitrate de sodium et (3) entre le second et le troisième ajout en nitrate de sodium.

Comme visible sur la Figure 5, l'efficacité de la dénitrification est comparable pour les trois pilotes avec électrodes sur la première période (1.80, 1.59 et 1.76 g N-NO₃⁻ / jour / m² pour les pilotes 1, 2 et 3 respectivement). De plus, l'étude par ANOVA donne une *p-value* de 0,108, soit aucune différence significative entre les pilotes avec électrodes et les pilotes sans électrodes pour cette première période sans polarisation allant de 0 à 190 h.

Après le début de la polarisation (période 2), une bien meilleure efficacité en termes de dénitrification est visible dans le cas des pilotes 1 et 2, autrement dit les deux pilotes contenant une électrode réagissent électro-chimiquement (augmentation sensible du courant de réduction) pour les trois additions en nitrate de sodium vraisemblablement lié au développement d'un

biofilm dénitrifiant exo-électrogène (2.00 et 2.04 g N-NO₃⁻ / jour / m² pour les pilotes 1 et 2 respectivement). Si l'on compare l'efficacité de la dénitrification des pilotes 1 et 2 aux pilotes sans électrodes sur cette période (190 h à 336 h) on obtient ainsi une augmentation de l'efficacité + 44 %. A l'inverse, pour le troisième pilote qui ne montre pas de réaction électrochimique significative pour les deux derniers ajouts en nitrate de sodium, on observe une efficacité de dénitrification comparable à celle des pilotes sans électrodes (1.39 g N-NO₃⁻ / jour / m² pour le pilote n°3 avec électrode polarisée et 1.35, 1.40 and 1.49 g N-NO₃⁻ / jour / m² pour les pilotes 4, 5 et 6 respectivement). Le test ANOVA entre les moyennes de l'efficacité de dénitrification des trois pilotes avec électrodes polarisées et celle des pilotes sans électrodes donne une *p-value* de 0,14, autrement dit pas de différence significative. Néanmoins, si l'on enlève la valeur d'efficacité de dénitrification du pilote n°3 de la moyenne des pilotes avec électrodes polarisées (en ne gardant que les pilotes 1 et 2, soit ceux réagissant électrochimiquement à l'ajout de nitrate de sodium), on obtient cette fois-ci une *p-value* de 0,0015, soit une valeur bien inférieure à 0,05 confirmant une différence significative. Ce constat, doublé des résultats obtenus lors de l'analyse en chronoampérométrie tend à confirmer que des biocathodes dénitrifiantes ont bel et bien été développées dans le cas des électrodes des deux premiers pilotes.

Après la seconde addition de nitrate de sodium (soit sur la période 3 allant de 336 h à 600 h), la vitesse de dénitrification reste légèrement plus élevée dans le cas des pilotes avec des électrodes polarisées comparé aux pilotes sans électrodes (1,18 g N-NO₃⁻ / jour / m² en moyenne pour les pilotes 1 et 2 et 1,02 g N-NO₃⁻ / jour / m² pour le troisième, soit une différence de 15 %). Ainsi on observe une vitesse légèrement plus élevée dans le cas des deux premiers pilotes (avec électrodes réagissant électrochimiquement à l'ajout de nitrate de sodium) par rapport au troisième pilote (pas de réaction électrochimique visible à l'ajout de nitrate de sodium). Le test ANOVA comparant les moyennes de l'efficacité de la dénitrification des pilotes avec électrodes contre les contrôles négatifs a donné une *p-value* < 0,05 à la fois si l'on inclue la valeur du troisième pilote (*p-value* = 0,004) ou si on l'exclue (*p-value* = 0,0008), montrant qu'avec ou sans ce troisième pilote, il existe bel et bien une différence significative en termes de vitesse de dénitrification entre les pilotes avec électrodes et ceux sans électrodes. Ainsi si l'on compare l'efficacité de la dénitrification entre les deux premiers pilotes et les témoins négatifs, on obtient + 51 % d'efficacité ou + 44 % en incluant le troisième pilote dans le calcul pour les pilotes incluant une électrode polarisée (pilotes 1 à 3) sur cette troisième période (336 h à 600 h).

Autre point important, on peut constater que sur la durée d'incubation totale, on peut observer une diminution générale de la vitesse de dénitrification pour tous les pilotes, avec ou sans électrodes (en moyenne - 33 % pour les pilotes avec électrodes et - 46 % pour les pilotes sans électrodes).

- Etudes des communautés bactériennes

► Communautés bactériennes des sédiments des six pilotes

Les communautés bactériennes présentes dans les sédiments de surface pour les 6 pilotes sont détaillées dans la Figure 6 :



Figure 6 : Représentation des communautés bactériennes des sédiments de surface près des électrodes (pilotes 1, 2 et 3), et des pilotes sans électrodes (4, 5 et 6) à 26 jours d'incubation. Seuls les genres bactériens avec une abondance relative de plus de 5 % sont représentés.

Comme montré sur la Figure 6, les communautés bactériennes présentes dans les sédiments des six pilotes sont relativement différentes, avec malgré tout des points communs notables. Pour le premier pilote (avec électrodes polarisées réagissant à l'ajout de nitrate de sodium sur chronoampérométrie), on peut observer diverses communautés dont une seule est documentée comme capable de réduire le nitrate, à savoir *Azoarcus* [7]. On peut aussi noter que 13 % des séquences sont affiliées au phylum bactérien *Planctomycetes* dont 6 % affiliées au genre bactérien *Planctomyces*. Le phylum *Planctomycetes* est connu et étudié pour son métabolisme anamox (pour anaerobic ammonium oxidation) qui consiste à oxyder le NH_4^+ avec du NO_2^- afin de produire du N_2 [8]. La présence d'une communauté pratiquant ce métabolisme pourrait être liée à l'augmentation de l'efficacité de la dénitrification grâce aux biofilms exo-électrogènes localisés sur l'électrode capables de réduire le nitrate mais sans forcément pouvoir réduire le nitrite (NO_2^-) qui s'accumulerait alors dans la phase aqueuse du pilote et ce qui pourrait ainsi générer une pression de sélection menant au développement de cette communauté.

Dans le pilote n°2 (avec électrode réagissant au nitrate d'après la chronoampérométrie) ainsi que dans le pilote n°5 (sans électrode), on peut noter la présence d'un genre bactérien largement prédominant : *Azospirillum*. Ce genre bactérien est très connu pour être capable d'effectuer presque toutes les réactions liées au cycle de l'azote depuis la fixation de l'azote atmosphérique (N_2) mais également la réduction du nitrate (NO_3^-) et du nitrite (NO_2^-) [9]. La présence d'*Azospirillum* en quantité importante suggère un métabolisme de l'azote très actif dans les sédiments.

Dans les sédiments du pilote n°3 (avec une électrode polarisée mais sans réaction électrochimique aux 2^{ème} et 3^{ème} ajouts de nitrate de sodium), nous avons une population davantage diversifiée avec la présence notable de trois genres incluant des espèces capables de réduire le nitrate : *Azoarcus* [7], *Stenotrophomonas* [10] et *Pseudomonas* [11][12].

Le pilote n°4 montre, comme les pilotes 2 et 5, la prédominance d'un genre bactérien, à savoir *Bacillus*. Ce genre inclut lui aussi une grande quantité d'espèces capable de dénitrifier notamment en conditions aérobies (présence de O_2), chose rare au sein des bactéries dénitrifiantes qui ont plutôt tendance à utiliser le nitrate comme accepteur terminal d'électrons uniquement quand l'oxygène est absent [13].

Enfin, le pilote n°6 ne montre qu'un seul genre représentant plus de 5 % à savoir *Fusibacter*. Ce genre ne réduit pas les nitrates mais est connu pour son métabolisme de réduction des sulfates et thiosulfates [14][15].

► Communautés bactériennes dans les compartiments des trois électrodes

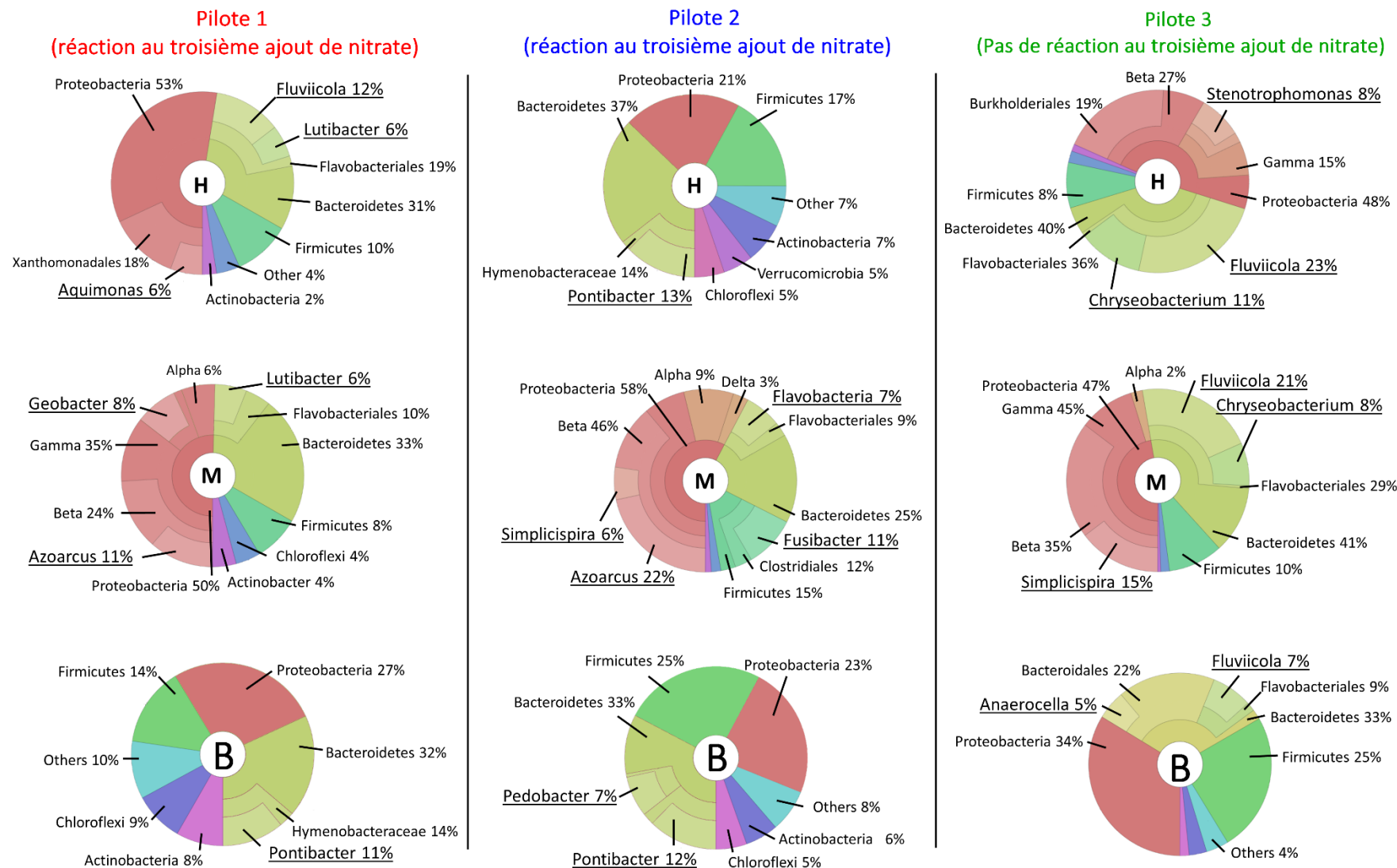


Figure 7 : Représentation des communautés bactériennes après 26 jours d'incubation dans les trois compartiments (H pour Haut, M pour Milieu et B pour Bas) des électrodes 1, 2 (réaction à l'ajout de nitrate de sodium) et 3 (peu ou pas de réaction aux 2^{ème} et 3^{ème} ajouts de nitrate, respectivement). Seuls les genres avec une abondance relative de plus de 5 % sont représentés.

1. Communautés bactériennes de l'électrode du pilote n°1

Dans le compartiment supérieur de l'électrode (localisée dans l'eau), trois genres bactériens ont une abondance relative significative : *Fluviicola* (12 %), *Lutibacter* (6 %), et *Aquimonas* (6 %). *Fluviicola* est un genre ne comprenant à ce jour que quelques espèces connues et documentées dont la majorité n'est pas capable de réduire les nitrates. Ce genre a été identifié maintes fois durant des expériences de bio-électrochimie, mais rarement à des abondances relatives supérieures à 5 % et surtout au sein de biocathodes à oxygène [16][17]. Le deuxième, *Lutibacter*, ne contient également que peu d'espèces capables de réduire le nitrate et n'a été identifié dans des systèmes bio-électrochimiques qu'en très faible abondance [18][19]. Le troisième est le genre *Aquimonas* qui ne contient à ce jour qu'une seule espèce documentée : *Aquimonas voraii* [20] (ne signifiant pas pour autant qu'elle est la seule espèce existante). Bien que cette espèce ne puisse pas réduire le nitrate, il reste difficile d'émettre des hypothèses sur la capacité à réduire le nitrate du genre *Aquimonas* en général avec une seule espèce décrite.

Le compartiment du milieu de l'électrode (localisé à l'interface entre les sédiments et l'eau) montre une prédominance de trois genres bactériens : *Azoarcus* (11 %), *Geobacter* (8 %) et *Lutibacter* (6 %). *Azoarcus* se montre particulièrement intéressante au sein de notre étude pour deux raisons majeures : En premier lieu, une majorité des espèces décrites appartenant à ce genre sont capables de réduire le nitrate et le nitrite [7]. L'autre raison est que ce genre bactérien a été retrouvé à de nombreuses occasions avec une abondance relative significative au sein de systèmes bio-électrochimiques [21][22][23][24][25] laissant penser que ce genre pourrait inclure des espèces exo-électrogènes. A cela s'ajoute le fait important que le genre *Azoarcus* appartient à la famille bactérienne *Zoogloeaceae*, famille déjà identifiée dans la précédente expérience lors de l'étude des communautés bactériennes ayant colonisé les grilles des structures porteuses des pilotes avec une phase aqueuse enterrée. Le deuxième genre relativement abondant est *Geobacter*, un, si ce n'est le genre le plus documenté parmi les espèces exo-électrogènes les plus performantes dans le transfert d'électrons extra-cellulaire, notamment *Geobacter sulfurreducens* et *Geobacter metallireducens* [26]. Il est également à noter qu'au sein de ce genre, il semble exister des espèces capable de pratiquer la réduction des nitrates de façon exo-électrogène via captation d'électrons depuis une surface solide [27].

Enfin le compartiment inférieur de l'électrode (enterré dans les sédiments) ne montre qu'un seul genre présent significativement : Le genre *Pontibacter*. Seulement une minorité des espèces incluses dans ce genre bactérien sont capables de réduire le nitrate. De plus, peu d'études bio-électrochimiques [28][29] mettent en évidence ce genre. Néanmoins, sa présence au sein

des deux premières électrodes réagissant à tous les ajouts en nitrate sur chronoampérométrie et son absence dans la troisième électrode ne réagissant pas au deuxième et troisième ajout pourrait indiquer un rôle dans la dénitrification exo-électrogène.

2. Communautés bactériennes de l'électrode du pilote n°2

Comme montré sur la Figure 7, le compartiment supérieur de l'électrode incubée dans le deuxième pilote (répondant aux trois ajouts de nitrate sodium sur chronoampérométrie), ne contient que le genre *Pontibacter* avec une abondance relative significative. Ce genre a déjà été commenté précédemment (compartiment du bas de la première électrode).

Le compartiment intermédiaire comprend lui les genres bactériens suivant : *Azoarcus* (22 %), *Fusibacter* (9 %), *Flavobacteria* (7 %) et *Simplicispira* (6 %). L'abondance relative du genre *Azoarcus* est ici très élevée. On peut alors noter que ce genre est bien présent dans le compartiment intermédiaire des deux électrodes répondant à chaque ajout de nitrate de sodium sur chronoampérométrie (Figure 4) mais également au sein des pilotes dont l'efficacité de la dénitrification est plus importante une fois la polarisation enclenchée (Figure 5). Cette observation semble renforcer l'hypothèse selon laquelle le genre *Azoarcus* inclurait des espèces capables de pratiquer la réduction exo-électrogène du nitrate, c'est-à-dire via captation d'électrons depuis une surface solide. Le genre *Fusibacter* ne contient que quelques espèces décrites et leur métabolisme des composés azotés reste peu défini. Ce genre est surtout étudié et connu pour le métabolisme de réduction des sulfate et thiosulfate par plusieurs de ses espèces. Ce genre a néanmoins été retrouvé dans plusieurs expériences bio-électrochimiques avec une abondance relative notable [30][31][32]. Pour ce qui est du genre *Flavobacteria*, il contient plusieurs centaines d'espèces différentes dont une bonne partie se révèle capable de réduire le nitrate et dont la présence a été citée dans quelques études bio-électrochimiques [24][33][34].

Le compartiment inférieur ne montre que deux genres bactériens : *Pontibacter* (12 %, déjà trouvé dans le compartiment inférieur de la première électrode) et *Pedobacter* (7 %). Le genre *Pedobacter* inclut plus de 65 espèces bactériennes documentées dont la large majorité n'est pas capable de réduire le nitrate ou le nitrite. Aucune étude de bio-électrochimie ne décrit ce genre bactérien.

3. Communautés bactériennes de l'électrode du pilote n°3

Via la Figure 7, on peut lister trois genres bactériens présents dans le compartiment supérieur de l'électrode du pilote 3 (pas de réponse aux deuxièmes et troisièmes ajouts de nitrate de sodium sur chronoampérométrie) : *Fluviicola* (23 %), *Chryseobacterium* (11 %) et *Stenotrophomonas* (8 %). Le genre *Fluviicola* a déjà été évoqué précédemment (compartiment du haut de la première électrode). Le genre *Chryseobacterium* inclut plusieurs espèces capables de réduire le nitrate mais aucune étude bio-électrochimique ne semble pointer son importance dans les biofilms exo-électrogènes. Le troisième genre est le genre *Stenotrophomonas*, un genre bactérien incluant également plusieurs espèces réduisant le nitrate. En plus de cela, ce genre est relativement connu dans le domaine des piles microbiennes et de la bio-électrochimie en général [35] et notamment pour la capacité de certaines espèces appartenant à ce genre à dégrader les colorants azoïques via des voies métaboliques exo-électrogènes [36][37].

Le compartiment intermédiaire de la troisième électrode montre trois genres déjà détaillés auparavant : *Fluviicola* (21 %, observé dans le compartiment supérieur au sein de l'électrode du pilote 1), *Simplicispira* (15%, observé dans le compartiment du milieu de l'électrode du pilote 2) et enfin *Chryseobacterium* (8 %, observé dans le compartiment supérieur de l'électrode du pilote 3).

Pour conclure, le compartiment inférieur de cette électrode n°3 montre la présence du genre bactérien *Fluviicola* (7 %) et *Anaerocella* (5 %). Ce dernier genre ne comprend qu'une seule espèce décrite et documentée : *Anaerocella delicata*. Cette espèce n'est pas capable de réduire le nitrate [38] et n'a, à ce jour et à notre connaissance, pas été identifiée au sein de systèmes bio-électrochimiques.

► Synthèse de l'étude des communautés bactériennes des électrodes

Après cette description détaillée des communautés bactériennes de chaque électrode, une synthèse globale s'impose :

Cell Number	Localisation du compartiment									Réduction des nitrates pour les espèces documentées	Etudes Bio électrochimiques trouvées
	Bas			Milieu			Haut				
	Cell 1	Cell 2	Cell 3	Cell 1	Cell 2	Cell 3	Cell 1	Cell 2	Cell 3		
<i>Pontibacter</i>	11 %	12 %						13 %		Aucune	Aucune ou peu
<i>Geobacter</i>					8 %					Aucune	Nombreuses
<i>Lutibacter</i>				6 %			6 %			Aucune	Aucune ou peu
<i>Azoarcus</i>				11 %	22 %					Majorité	Nombreuses
<i>Aquimonas</i>							6 %			Aucune	Aucune ou peu
<i>Fluviicola</i>			7 %			21 %	12 %		23 %	Rare	Aucune ou peu
<i>Pedobacter</i>		7 %								Rare	Aucune ou peu
<i>Fusibacter</i>					9 %					-	Aucune ou peu
<i>Flavobacteria</i>					7 %					Variée	Nombreuses
<i>Simplicispira</i>					6 %	15 %				Majorité	Aucune ou peu
<i>Anaerocella</i>			5 %							Aucune	Aucune ou peu
<i>Chryseobacterium</i>						8 %			11 %	Variée	Aucune ou peu
<i>Stenotrophomonas</i>									8 %	Variée	Nombreuses

Table 1 : Synthèse des genres bactériens identifiés au sein des trois compartiments des électrodes des trois premiers pilotes avec leur pourcentage d'abondance relative. Pour chaque genre on indique si le métabolisme documenté permet la réduction des nitrates et si ce genre est décrit dans certaines études de bio-électrochimie microbienne. En bleu, les électrodes des pilotes 1 et 2 réagissant à tous les ajouts en nitrate de sodium sur chronoampérométrie et en rouge, l'électrode du pilote 3 ne réagissant qu'au premier ajout et non aux deux suivants.

La Table 1 détaille les genres bactériens identifiés avec une abondance relative notable en fonction des compartiments et des pilotes dans lesquels ont été incubées les électrodes. Pour rappel, l'extraction d'ADN a été faite à 26 jours d'incubation, soit quelques jours seulement après le troisième ajout de nitrate de sodium (600 h, soit 25 jours). Pour cet ajout, seules les électrodes des pilotes n°1 et 2 réagissent électrochimiquement, contrairement à l'électrode du pilote 3. Or, si l'on recherche les genres abondants et communs aux deux électrodes des pilotes 1 et 2 mais absents de l'électrode du pilote 3, on peut alors mettre en évidence les genres *Azoarcus* et *Pontibacter*. En effet au sein des électrodes des pilotes 1 et 2, ces deux genres sont présents à 11 % et 22 % dans le compartiment du milieu pour *Azoarcus* et 11 % et 12 % dans le compartiment du bas pour *Pontibacter*.

Le genre *Pontibacter* est majoritairement présent dans les compartiments inférieurs, autrement dit ceux enterrés dans les sédiments. Bien que la plupart des espèces documentées appartenant à ce genre ne puissent pas réduire les nitrates et qu'il n'est que peu cité dans les études bio-électrochimiques, il reste possible que celui-ci joue un rôle clé dans la dénitrification accrue au sein des pilotes 1 et 2, exo-électrogène ou non. De plus, son absence au sein des sédiments pourrait indiquer que les conditions spécifiques au sein des électrodes génèrent une pression de sélection favorable pour ce genre bactérien en particulier. Ainsi, il est possible que ce soit l'environnement particulier qu'est l'électrode qui permette son développement ce qui pourrait indiquer que ce genre bactérien est impliqué dans le métabolisme exo-électrogène du biofilm en général.

Le deuxième genre présent sur les électrodes des deux premiers pilotes et absent du troisième est le genre bactérien *Azoarcus* au niveau des compartiments intermédiaires (interface eau/sédiments). Comme expliqué auparavant ce genre est relativement commun au sein des études bio-électrochimiques comme le développement de piles microbiennes suggérant que certaines espèces appartenant à ce genre possèdent un métabolisme de type exo-électrogène. A cela s'ajoute le fait qu'une large majorité des espèces décrites sont capables de réduire le nitrate. On note également qu'*Azoarcus* est présent avec une abondance relative assez élevée (11 % et 22 %) au sein des électrodes répondant électro-chimiquement sur chronoampérométrie à tous les ajouts de nitrate de sodium et, comme *Pontibacter*, totalement absent de la troisième laissant clairement penser que ce genre joue un rôle clé dans la dénitrification exo-électrogène.

Néanmoins, les chemins métaboliques spécifiques que certaines espèces des genres *Azoarcus* et *Pontibacter* utilisent potentiellement afin d'augmenter l'efficacité de la dénitrification par voie exo-électrogènes des biofilms mixtes restent incertains. Cela peut être de manière directe par captation d'électrons servant à la réduction du nitrate ou encore via des effets synergiques tels que l'électro-assistance à d'autres espèces ou sein du biofilm. En effet, au sein d'un biofilm, les espèces présentes sont capables d'interagir entre elles et de s'organiser afin d'optimiser le développement et la survie du biofilm. Il est ainsi parfaitement envisageable que le métabolisme exo-électrogène d'une bactérie soit favorisé par la présence au sein du biofilm d'une autre espèce bactérienne, ou encore que deux bactéries n'expriment les gènes liés à ce métabolisme exo-électrogène qu'en présence l'une de l'autre pour des raisons d'interdépendance.

IV) Synthèse et Conclusion

Pour rappel cette expérience avait été lancée avec plusieurs objectifs, le premier étant de parvenir à développer des bio-cathodes dénitrifiantes permettant une augmentation notable de l'efficacité de la dénitrification au sein des pilotes avec des électrodes polarisées. Cet objectif a été atteint avec une claire réponse électrochimique aux nitrates visibles sur chronoampérométrie dans le cas des deux premiers pilotes. De plus, une augmentation de l'efficacité est également notable avec toujours plus de 40 % d'augmentation après polarisation, toujours pour les deux premiers pilotes par rapport aux témoins sans électrodes.

L'autre objectif était d'essayer de visualiser une différence dans la localisation de la dénitrification exo-électrogène via la mise en place de conditions similaires à celles des sédiments (zone anoxique, apport d'électrons et de carbone inorganique). Il s'est avéré que les compartiments qui semblent concernés par la dénitrification de type exo-électrogène sont localisés soit à l'interface sédiments/eau, soit dans les premiers centimètres des sédiments, autrement dit une localisation similaire à celle de la dénitrification classique. Cela peut s'expliquer de deux façons : il est possible que les organismes pratiquant la dénitrification exo-électrogène ne soient pas autotrophe pour leur source de carbone, signifiant qu'elles ont besoin d'un minimum de carbone sous forme organique pour alimenter leur anabolisme et que donc l'ajout de carbonate n'a pas suffi à leur développement dans la zone aqueuse. L'autre possibilité est que des communautés spécifiques et mieux adaptés à cette zone aqueuse aient colonisé les compartiments supérieurs, rendant impossible le développement de biofilms exo-électrogènes réduisant le nitrate.

Cette expérience nous a également permis d'identifier deux genres bactériens d'intérêt : *Pontibacter* et *Azoarcus*. En effet, le fait que la troisième électrode n'ai pas permis le développement de biofilms exo-électrogènes dénitrifiants s'est révélé être un atout. Cela nous a permis d'utiliser celle-ci comme outil de comparaison afin d'identifier les genres présents sur les électrodes des deux premiers pilotes. Les deux genres bactériens identifiés comme d'intérêt sont, en premier lieu *Pontibacter*, peu documenté en bio-électrochimie mais aussi et surtout *Azoarcus*. Ce genre est régulièrement identifié au sein de systèmes bio-électrochimiques microbiens indiquant que certaines espèces possèdent un rôle clé dans le métabolisme exo-électrogène d'un biofilm. De plus, la capacité d'une majorité de ces espèces à réduire le nitrate rend ce genre bactérien particulièrement intéressant au sein du projet LowNitrate et dans le développement de futures bio-cathodes dénitrifiantes [1]. Après avoir développé avec succès

des bio-cathodes dénitrifiantes, la suite logique serait donc une tentative d'optimisation de l'efficacité de la dénitrification mais également de comprendre l'effet de la polarisation sur les communautés bactériennes. En effet, la présence d'une polarisation externe et donc d'un apport d'électrons peut potentiellement influencer sur la pression de sélection et la comparaison avec un modèle d'électrode similaire mais non polarisée peut s'avérer intéressant.

V) Références

- [1] T. Philippon, J. Tian, C. Bureau, C. Chaumont, C. Midoux, J. Tournebize, T. Bouchez, F. Barrière, Denitrifying bio-cathodes developed from constructed wetland sediments exhibit electroactive nitrate reducing biofilms dominated by the genera *Azoarcus* and *Pontibacter*, *Bioelectrochemistry*. 140 (2021) 107819. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2021.107819>.
- [2] L. Yu, Y. Yuan, S. Chen, L. Zhuang, S. Zhou, Direct uptake of electrode electrons for autotrophic denitrification by *Thiobacillus denitrificans*, *Electrochem. Commun.* 60 (2015) 126–130. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2015.08.025>.
- [3] N. Pous, A.A. Carmona-Martínez, A. Vilajeliu-Pons, E. Fiset, L. Bañeras, E. Trably, M.D. Balaguer, J. Colprim, N. Bernet, S. Puig, Bidirectional microbial electron transfer: Switching an acetate oxidizing biofilm to nitrate reducing conditions, *Biosens. Bioelectron.* 75 (2016) 352–358. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.08.035>.
- [4] N. Pous, C. Koch, J. Colprim, S. Puig, F. Harnisch, Extracellular electron transfer of biocathodes: Revealing the potentials for nitrate and nitrite reduction of denitrifying microbiomes dominated by *Thiobacillus* sp., *Electrochem. Commun.* 49 (2014) 93–97. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2014.10.011>.
- [5] K.B. Gregory, D.R. Bond, D.R. Lovley, Graphite electrodes as electron donors for anaerobic respiration, *Environ. Microbiol.* 6 (2004) 596–604. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00593.x>.
- [6] B. Lovreček, M. Batinic, J. Čaja, The electrochemical oxygen reduction on the graphite electrode, *Electrochim. Acta.* 28 (1983) 685–690. [https://doi.org/10.1016/0013-4686\(83\)85065-8](https://doi.org/10.1016/0013-4686(83)85065-8).
- [7] T. Mechichi, E. Stackebrandt, N. Gad'on, G. Fuchs, Phylogenetic and metabolic diversity of bacteria degrading aromatic compounds under denitrifying conditions, and description of *Thauera phenylacetica* sp. nov., *Thauera aminoaromatica* sp. nov., and *Azoarcus buckelii* sp. nov., *Arch. Microbiol.* 178 (2002) 26–35. <https://doi.org/10.1007/s00203-002-0422-6>.
- [8] H.J.M. Op den Camp, M.S.M. Jetten, M. Strous, Anammox, in: *Biol. Nitrogen Cycle*, Elsevier, 2007: pp. 245–262. <https://doi.org/10.1016/B978-044452857-5.50017-5>.

- [9] H. Bothe, B. Klein, M.P. Stephan, J. Döbereiner, Transformations of inorganic nitrogen by *Azospirillum* spp., *Arch. Microbiol.* 130 (1981) 96–100. <https://doi.org/10.1007/BF00411058>.
- [10] K. Heylen, B. Vanparys, F. Peirsegaële, L. Lebbe, P. De Vos, *Stenotrophomonas terrae* sp. nov. and *Stenotrophomonas humi* sp. nov., two nitrate-reducing bacteria isolated from soil, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57 (2007) 2056–2061. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.65044-0>.
- [11] D. Frasson, M. Opoku, T. Picozzi, T. Torossi, S. Balada, T.H.M. Smits, U. Hilber, *Pseudomonas wadenswilerensis* sp. nov. and *Pseudomonas reidholzensis* sp. nov., two novel species within the *Pseudomonas putida* group isolated from forest soil, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 67 (2017) 2853–2861. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002035>.
- [12] A. Hameed, M. Shahina, S.-Y. Lin, Y.-C. Liu, C.-C. Young, *Pseudomonas hussainii* sp. nov., isolated from droppings of a seashore bird, and emended descriptions of *Pseudomonas pohangensis*, *Pseudomonas benzenivorans* and *Pseudomonas segetis*, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64 (2014) 2330–2337. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.060319-0>.
- [13] T. Yang, Y. Xin, L. Zhang, Z. Gu, Y. Li, Z. Ding, G. Shi, Characterization on the aerobic denitrification process of *Bacillus* strains, *Biomass and Bioenergy.* 140 (2020) 105677. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105677>.
- [14] K. Fadhlaoui, W. Ben Hania, A. Postec, G. Fauque, M. Hamdi, B. Ollivier, M.-L. Fardeau, *Fusibacter fontis* sp. nov., a sulfur-reducing, anaerobic bacterium isolated from a mesothermic Tunisian spring, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65 (2015) 3501–3506. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000445>.
- [15] G. Ravot, M. Magot, M.-L. Fardeau, B.K.C. Patel, P. Thomas, J.-L. Garcia, B. Ollivier, *Fusibacter paucivorans* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, thiosulfate-reducing bacterium from an oil-producing well, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 49 (1999) 1141–1147. <https://doi.org/10.1099/00207713-49-3-1141>.
- [16] N. Montpart, L. Rago, J.A. Baeza, A. Guisasola, Oxygen barrier and catalytic effect of the cathodic biofilm in single chamber microbial fuel cells, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 93 (2018) 2199–2207. <https://doi.org/10.1002/jctb.5561>.
- [17] Q. Sun, Z.-L. Li, Y.-Z. Wang, C.-X. Yang, J.S. Chung, A.-J. Wang, Cathodic bacterial community structure applying the different co-substrates for reductive decolorization of

- Alizarin Yellow R, *Bioresour. Technol.* 208 (2016) 64–72.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.02.003>.
- [18] H.Z. Hamdan, D.A. Salam, A.R. Hari, L. Semerjian, P. Saikaly, Assessment of the performance of SMFCs in the bioremediation of PAHs in contaminated marine sediments under different redox conditions and analysis of the associated microbial communities, *Sci. Total Environ.* 575 (2017) 1453–1461.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.09.232>.
- [19] J. Zhao, L. Wang, L. Tang, R. Ren, W. You, R. Farooq, Z. Wang, Y. Zhang, Changes in bacterial community structure and humic acid composition in response to enhanced extracellular electron transfer process in coastal sediment, *Arch. Microbiol.* 201 (2019) 897–906. <https://doi.org/10.1007/s00203-019-01659-3>.
- [20] P. Saha, S. Krishnamurthi, S. Mayilraj, G.S. Prasad, T.C. Bora, T. Chakrabarti, *Aquimonas voraii* gen. nov., sp. nov., a novel gammaproteobacterium isolated from a warm spring of Assam, India, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55 (2005) 1491–1495.
<https://doi.org/10.1099/ijs.0.63552-0>.
- [21] Y. Jiawei, C. Shaoan, Effects of Using Anode Biofilm and Cathode Biofilm Bacteria as Inoculum on the Start-up, Electricity Generation, and Microbial Community of Air-Cathode Single-Chamber Microbial Fuel Cells, *Polish J. Environ. Stud.* 28 (2018) 693–700. <https://doi.org/10.15244/pjoes/81700>.
- [22] J. Myung, W. Yang, P.E. Saikaly, B.E. Logan, Copper current collectors reduce long-term fouling of air cathodes in microbial fuel cells, *Environ. Sci. Water Res. Technol.* 4 (2018) 513–519. <https://doi.org/10.1039/C7EW00518K>.
- [23] J. KIM, S. JUNG, J. REGAN, B. LOGAN, Electricity generation and microbial community analysis of alcohol powered microbial fuel cells, *Bioresour. Technol.* 98 (2007) 2568–2577. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.09.036>.
- [24] X. Mei, C. Guo, B. Liu, Y. Tang, D. Xing, Shaping of bacterial community structure in microbial fuel cells by different inocula, *RSC Adv.* 5 (2015) 78136–78141.
<https://doi.org/10.1039/C5RA16382J>.
- [25] N. Shehab, D. Li, G.L. Amy, B.E. Logan, P.E. Saikaly, Characterization of bacterial and archaeal communities in air-cathode microbial fuel cells, open circuit and sealed-off reactors, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97 (2013) 9885–9895.

- <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5025-4>.
- [26] D.R. Bond, D.R. Lovley, Electricity Production by *Geobacter sulfurreducens* Attached to Electrodes, *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (2003) 1548–1555.
<https://doi.org/10.1128/AEM.69.3.1548-1555.2003>.
- [27] K.B. Gregory, D.R. Bond, D.R. Lovley, Graphite electrodes as electron donors for anaerobic respiration, *Environ. Microbiol.* 6 (2004) 596–604.
<https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00593.x>.
- [28] D. Sasaki, K. Sasaki, Y. Tsuge, A. Kondo, Comparative metabolic state of microflora on the surface of the anode electrode in a microbial fuel cell operated at different pH conditions, *AMB Express.* 6 (2016) 125. <https://doi.org/10.1186/s13568-016-0299-4>.
- [29] Y. Li, X. Li, Y. Sun, X. Zhao, Y. Li, Cathodic microbial community adaptation to the removal of chlorinated herbicide in soil microbial fuel cells, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25 (2018) 16900–16912. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1871-z>.
- [30] K.L. Lesnik, H. Liu, Establishing a core microbiome in acetate-fed microbial fuel cells, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98 (2014) 4187–4196. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5502-9>.
- [31] W. Liu, Z. He, C. Yang, A. Zhou, Z. Guo, B. Liang, C. Varrone, A.-J. Wang, Microbial network for waste activated sludge cascade utilization in an integrated system of microbial electrolysis and anaerobic fermentation, *Biotechnol. Biofuels.* 9 (2016) 83.
<https://doi.org/10.1186/s13068-016-0493-2>.
- [32] V.F. dos Passos, R. Marcilio, S. Aquino-Neto, F.B. Santana, A.C.F. Dias, F.D. Andreote, A.R. de Andrade, V. Reginatto, Hydrogen and electrical energy co-generation by a cooperative fermentation system comprising *Clostridium* and microbial fuel cell inoculated with port drainage sediment, *Bioresour. Technol.* 277 (2019) 94–103. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.01.031>.
- [33] C.-Y. Chen, T.-H. Tsai, P.-S. Wu, S.-E. Tsao, Y.-S. Huang, Y.-C. Chung, Selection of electrogenic bacteria for microbial fuel cell in removing Victoria blue R from wastewater, *J. Environ. Sci. Heal. Part A.* 53 (2018) 108–115.
<https://doi.org/10.1080/10934529.2017.1377580>.
- [34] N. Uria, I. Ferrera, J. Mas, Electrochemical performance and microbial community

- profiles in microbial fuel cells in relation to electron transfer mechanisms, *BMC Microbiol.* 17 (2017) 208. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-1115-2>.
- [35] K. Venkidusamy, M. Megharaj, Identification of Electrode Respiring, Hydrocarbonoclastic Bacterial Strain *Stenotrophomonas maltophilia* MK2 Highlights the Untapped Potential for Environmental Bioremediation, *Front. Microbiol.* 7 (2016). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01965>.
- [36] Y. Yang, O. Luo, G. Kong, B. Wang, X. Li, E. Li, J. Li, F. Liu, M. Xu, Deciphering the Anode-Enhanced Azo Dye Degradation in Anaerobic Baffled Reactors Integrating With Microbial Fuel Cells, *Front. Microbiol.* 9 (2018). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02117>.
- [37] S. Galai, A. Pérez de los Ríos, F.J. Hernández-Fernández, S.H. Kacem, F.M. Ramírez, J. Quesada-Medina, Microbial Fuel Cell Application for Azoic Dye Decolorization with Simultaneous Bioenergy Production Using *Stenotrophomonas* sp., *Chem. Eng. Technol.* 38 (2015) 1511–1518. <https://doi.org/10.1002/ceat.201400608>.
- [38] K. Abe, A. Ueki, Y. Ohtaki, N. Kaku, K. Watanabe, K. Ueki, *Anaerocella delicata* gen. nov., sp. nov., a strictly anaerobic bacterium in the phylum Bacteroidetes isolated from a methanogenic reactor of cattle farms, *J. Gen. Appl. Microbiol.* 58 (2012) 405–412. <https://doi.org/10.2323/jgam.58.405>.

VI) Annexes

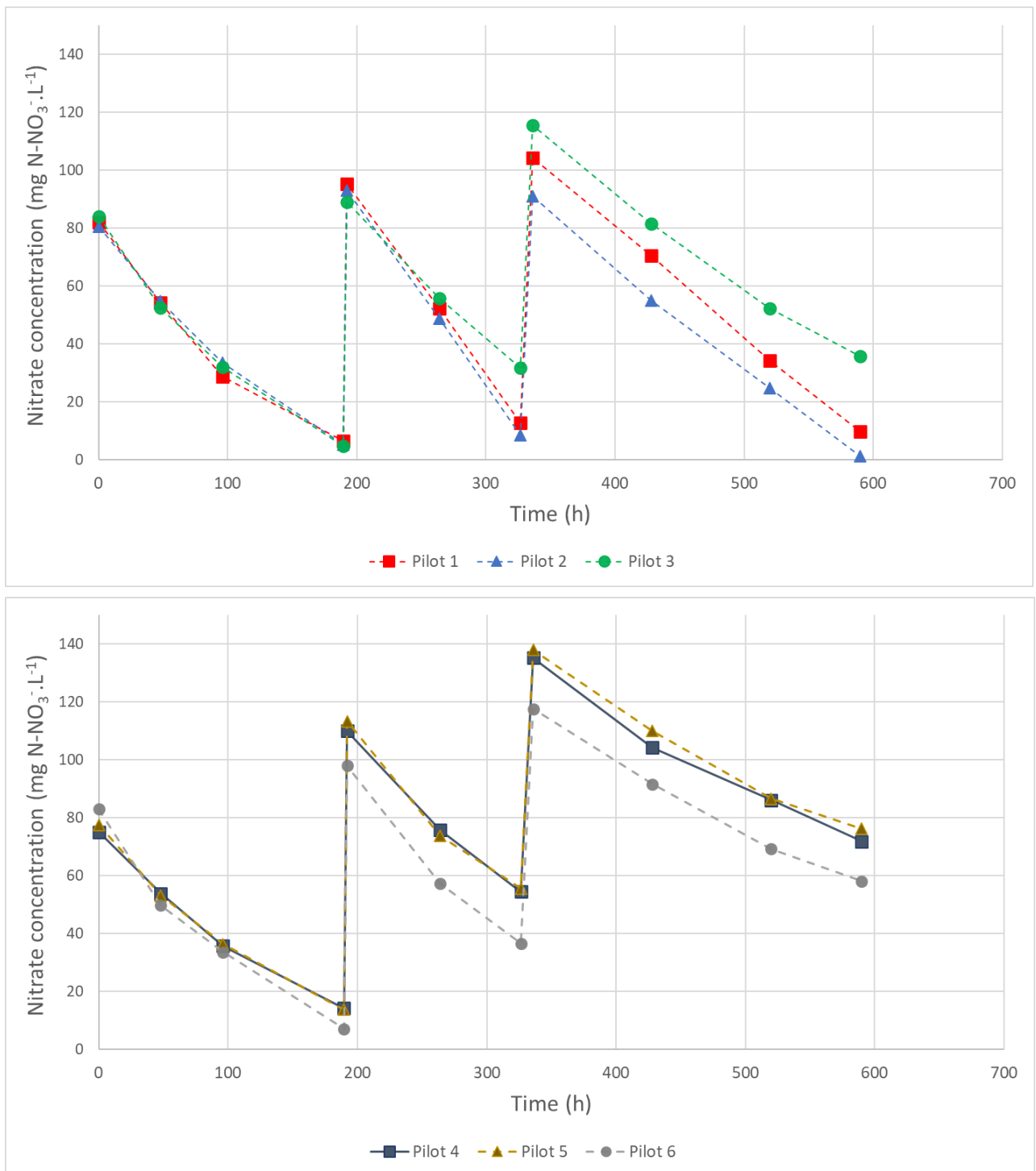


Figure Annexes 1 : Evolution des concentrations en nitrate dans chacun des pilotes au cours des 26 jours d'incubation. Les pilotes 1 à 3 incluent une électrode polarisée et les pilotes 4 à 6 n'incluent que des sédiments.

Chapitre V : Etude de l'effet de la polarisation sur l'évolution des métabolismes bactériens exo-électrogènes

Table des matières

I) Introduction	171
II) Matériel et Méthodes	174
III) Résultats	185
1) Etudes de la chronoampérométrie des pilotes 1 à 6 avec électrodes polarisées	185
a) Chonoampérométrie globale sur les 158 jours d'incubation.....	186
b) Etude comparative entre charge électrique et quantité de nitrate réduit	189
2) Etudes des potentiels d'abandon des électrodes non polarisées pour les pilotes 7 à 12	193
3) Etudes en voltamétrie cyclique des électrodes des pilotes 1 à 12.....	198
a) Etude de la réaction à la présence de nitrates	199
b) Etude de la réaction à la présence d'acétate	204
c) Etude de la réaction à la présence de nitrite	206
d) Synthèse des résultats de l'étude électro-chimique des électrodes des pilotes 1 à 12	208
4) Etudes des communautés bactériennes	212
a) Description des genres bactériens inclus dans l'étude comparative.....	213
b) Description des abondances relatives en fonctions des types d'échantillons dans les pilotes 1 à 6.....	215
c) Description des abondances relatives en fonctions des types d'échantillons dans les pilotes 7 à 12.....	218
IV) Hypothèses et Conclusion	220
V) Références	225
VI) Annexes.....	229

I) Introduction

L'expérience précédente visait à déterminer si le développement de bio-cathodes à nitrate était possible en se servant d'un montage exploitant les granules de graphite. Ainsi, cette expérience s'apparentait surtout à une preuve de faisabilité au sein d'un pilote avec des inocula biologiques et environnementaux provenant de la zone humide de Rampillon (sédiments et eaux).

Les résultats de la précédente expérience ont permis de valider la faisabilité de ce développement de bio-cathodes à nitrate sous polarisation. Néanmoins, plusieurs caractéristiques importantes de celle-ci peuvent être optimisées dans l'optique de rassembler davantage de connaissances, notamment sur l'importance de la polarisation.

Pour rappel, dans le chapitre précédent (Chapitre IV) sur les trois électrodes mises sous polarisation constante, seules deux d'entre elles ont permis le développement de bio-cathodes à nitrate. Ce constat est très important car cela signifie que la colonisation d'une électrode à granules de graphite par des bactéries exo-électrogènes dénitrifiantes n'est pas systématique. Cela peut s'expliquer par l'utilisation d'un inoculum non homogène, à savoir les sédiments. En effet, les sédiments sont une forme d'inoculum hétérogène, notamment car dans le cadre des expériences précédentes où les sédiments ont été simplement broyés et non tamisés ou réduit en poudre fine. Ainsi, il peut exister au sein de ces sédiments des spécificités locales (grains de calcaire, dépôts biologiques locaux...) qui peuvent altérer la pression de sélection des communautés bactériennes. Dans l'optique de solidifier et d'augmenter la fiabilité des résultats, plusieurs points peuvent être ainsi améliorés.

Le premier point à considérer est évidemment le temps d'incubation. Pour rappel, toutes les expériences précédentes (Chapitre 2, 3 et 4) se basaient sur des temps d'incubation à l'échelle de plusieurs semaines. Il est cependant important de déterminer si une incubation plus longue permet le maintien de la dénitrification exo-électrogène discutée dans le chapitre précédent. En effet, il ne faut pas négliger la variabilité de la pression de sélection au sein du monde bactérien en fonction des conditions physico-chimiques de l'environnement. De fait, l'incubation se fera cette fois-ci à l'échelle de plusieurs mois et les pilotes seront incubés dans une pièce à température ambiante et non contrôlée incluant de nombreuses fenêtres afin d'inclure les changements environnementaux (notamment liés au changement de température durant la journée mais aussi des saisons) dans la prise en compte de l'expérience.

Ensuite vient l'optimisation de l'efficacité de la dénitrification. Comme expliqué juste avant, la précédente expérience était majoritairement une preuve de faisabilité du principe. Une fois la preuve que le développement de biofilms exo-électrogènes est possible sur une électrode basée sur un montage à granule de graphite, une optimisation du principe peut être effectuée. Cette optimisation du protocole se décompose en deux axes :

- Le premier est la multiplication du nombre d'électrodes et la suppression des étages les moins utiles. En effet, les électrodes à trois étages ne seront pas réutilisées car nous avons pu constater de façon claire que les deux seuls à avoir une importance pour la dénitrification sont ceux en contact avec les sédiments. Les compartiments supérieurs incubés uniquement dans la phase aqueuse n'ont pas montré la présence de genres bactériens spécifiquement présents dans les deux électrodes identifiées comme des bio-cathodes dénitrifiantes (les deux premiers pilotes) lors de l'expérience précédente. Par conséquent, les électrodes utilisées seront basées sur un seul compartiment à moitié enterré dans les sédiments et à moitié dans l'eau (équivalent du compartiment intermédiaire des électrodes de l'expérience précédente, voir Figure 1). De plus le nombre de ces électrodes par pilote sera augmenté d'une seule à cinq.

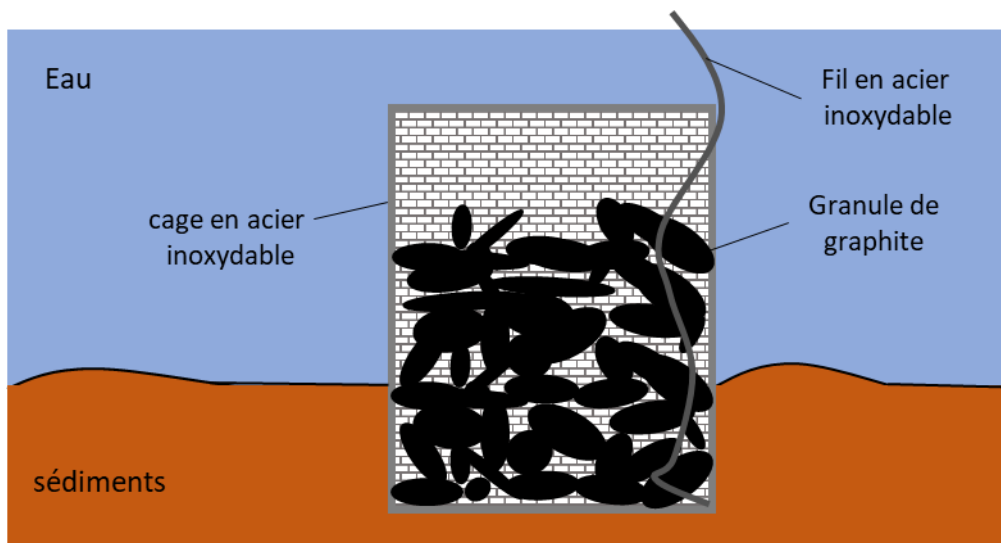


Figure 1 : Schéma type des électrodes qui seront utilisées durant cette étude au sein des pilotes

Le deuxième axe d'optimisation sera une tentative de bio-augmentation au niveau des granules de graphite des électrodes. En effet, deux genres bactériens d'intérêt ont été identifiés auparavant : *Pontibacter* mais surtout le genre *Azoarcus*. Ce dernier est particulièrement intéressant car celui-ci a été identifié dans de nombreuses études bio-électrochimiques et la majorité des espèces bactériennes documentées qu'il contient sont capables de réduire le nitrate (6 espèces sur 7). Pour cette raison, l'utilisation d'une culture pure d'une des espèces

d'*Azoarcus* (capable de réduire le nitrate) sera utilisée et injectée directement dans les granules de graphite afin de déterminer si le développement de bio-cathodes est accéléré et si l'espèce parvient à se maintenir sur le long terme.

Pour ce qui est de la polarisation, le choix a été fait de la conserver à la même valeur (aux alentours de -0,5 V vs Ag/AgCl) car elle a effectivement permis le développement de bio-cathodes dénitrifiantes. Cela est très vraisemblablement dû au fait que ce potentiel est compatible avec ceux de la réduction bio-électrochimique du nitrate présent dans la littérature. De plus, il permet la réduction du dioxygène sur graphite nu, permettant ainsi la génération de la zone pseudo-anoxique identifiée comme indispensable dans les deux premiers chapitres. Néanmoins, afin de s'assurer que la polarisation possède bel et bien un effet sur l'efficacité de la dénitrification, une série de pilotes contenant des électrodes non polarisées sera également étudiée.

En ce qui concerne l'analyse, trois grands axes sont présents : En premier lieu le suivi général des caractéristiques des différents pilotes incluant des relevés variés tels que le pH, les potentiels d'abandon des différentes électrodes non polarisées ou encore l'évolution du courant des électrodes polarisées via chronoampérométrie.

Deuxièmement, une étude électrochimique sera faite sur les électrodes entières et les granules de graphites via la voltamétrie cyclique. De par le nombre important d'électrodes et la grande quantité de profils identifiés, seuls les voltamétries considérées comme d'intérêt seront évoquées et c'est surtout une synthèse générale qui sera commentée.

Enfin, comme pour l'expérience précédente, une étude des communautés bactériennes sera faite via un séquençage du gène de l'ARNr 16S sur les sédiments en début et fin d'incubation mais également sur les granules de graphite ainsi que les grilles d'acier inoxydable des électrodes en fin d'incubation. Le principal objectif de cette étude des communautés est de déterminer si la polarisation va fondamentalement altérer la composition en bactéries en comparant les abondances relatives de certains genres précis entre les électrodes polarisées et non polarisées.

II) Matériel et Méthodes

- Description générale de l'expérience

Cette étude est composée de 15 pilotes différents divisés en 5 conditions différentes incluant chacune 3 réplicats. Chacun des pilotes contient des sédiments provenant de la zone humide de Rampillon ainsi que de l'eau pure. Les 12 premiers pilotes contiennent tous 5 électrodes composées d'une cage en acier inoxydable remplie de granules de graphite. Ces électrodes sont enterrées à moitié dans les sédiments, avec une moitié laissée dans l'eau. Pour les 6 premiers pilotes (décrits Figure 2), la totalité des 5 électrodes de chaque pilote est polarisée via un potentiostat à -0.5 V contre une électrode de référence Ag/AgCl (saturée KCl, $+0,197\text{ mV}$ vs ENH). Ainsi une structure en verre séparée du milieu aqueux via une membrane échangeuse de protons a été placée afin d'y mettre une contre électrode faite d'un fil d'acier inoxydable enroulé sur lui-même afin d'augmenter la surface de contact avec l'électrolyte.

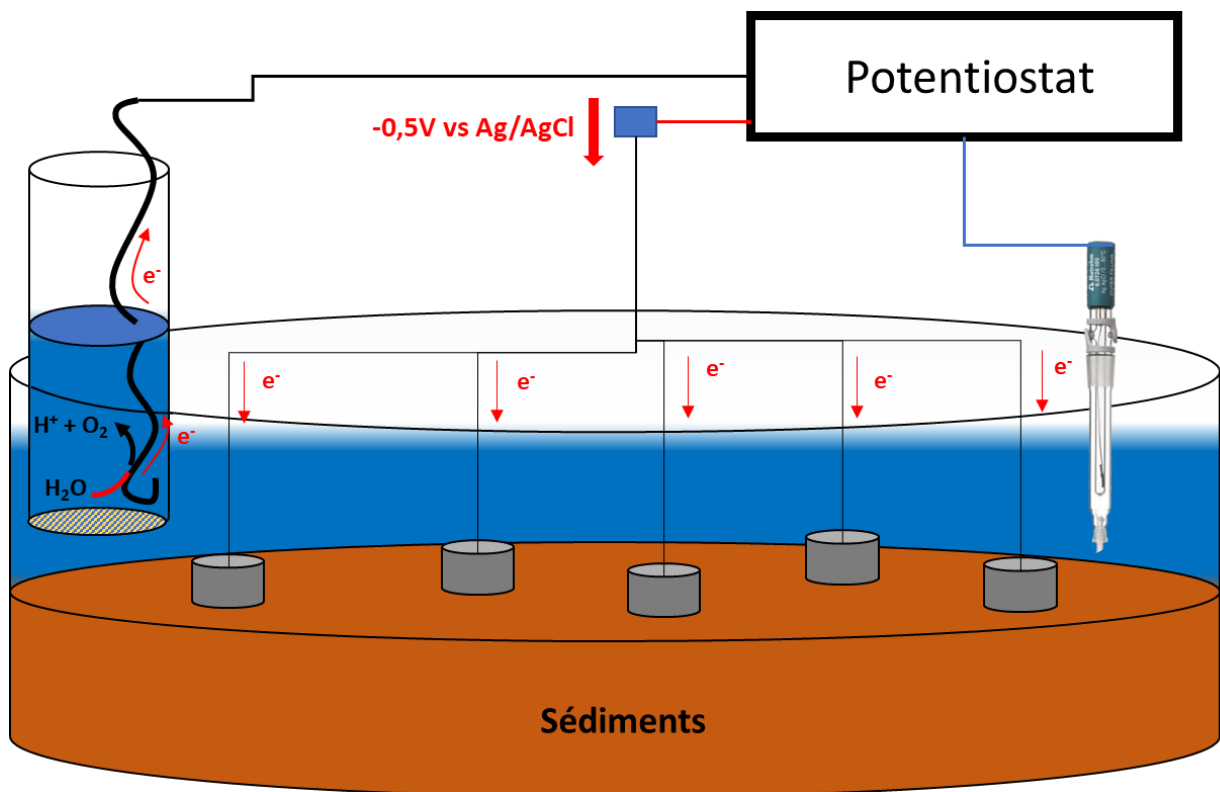


Figure 2 : Schéma d'un des 6 premiers pilotes avec une série de 5 électrodes polarisées contre une électrode de référence Ag/AgCl. Les pilotes 7 à 12 sont similaires mais sans la contre électrode ou la référence (pas de polarisation) et les 3 derniers (13 à 15) incluent simplement les sédiments et l'eau.

En plus de la variable concernant les électrodes (électrodes polarisées, électrodes non polarisées ou pas d'électrodes), la deuxième variable sera l'utilisation d'une culture pure d'*Azoarcus buckelii* qui sera injectée dans les électrodes (autour des granules de graphite) dans l'optique d'une tentative de bio-augmentation. Ainsi sur les 6 pilotes avec électrodes polarisées, 3 verront leur électrode subir cette injection de culture pure, ce qui sera également le cas de 3 des 6 pilotes contenant des électrodes non polarisées.

Ainsi la synthèse des différents pilotes avec leur caractéristiques respectives est la suivante :

	Electrodes	Bio-augmentation
Pilotes 1 à 3	Polarisées à -0,5 V vs Ag/AgCl	Injection culture pure <i>Azoarcus</i>
Pilotes 4 à 6	Polarisées à -0,5 V vs Ag/AgCl	Pas de bio-augmentation
Pilotes 7 à 9	Non polarisées	Injection culture pure <i>Azoarcus</i>
Pilotes 10 à 12	Non polarisées	Pas de bio-augmentation
Pilotes 13 à 15	Pas d'électrodes	Pas de bio-augmentation

Table 1 : Synthèse des différentes conditions d'incubation en fonction des pilotes

La grande différence avec les précédentes expériences est le temps d'incubation bien plus important avec 158 jours d'incubation, soit un peu plus de 5 mois. L'incubation a débuté en août et pris fin au mois de décembre 2020. Sur toute la durée de l'incubation un suivi en chronoampérométrie de l'évolution du courant pour les 6 premiers pilotes est effectué, ainsi qu'un suivi de l'évolution du potentiel d'abandon pour les électrodes des pilotes 7 à 12.

- Montage des électrodes

Les électrodes utilisées dans les 12 premiers pilotes sont toutes similaires et ont été conçues de la même manière. Un cylindre a été bâti à partir d'une grille d'acier inoxydable (entre 16 et 18% de chrome, 37% d'ouverture, des pores de 0,38 mm de diamètre, et des filaments de 0,2 mm d'épaisseur) d'une hauteur de 2 cm avec un diamètre de 1 cm et l'utilisation d'une bague en plastique afin de maintenir sa forme (Figure 3). L'intérieur a ensuite été rempli de granules de graphite dont les dimensions varient d'un granule à l'autre (quelques millimètres en moyenne). Ces cylindres ont ensuite été fermés sur leurs faces inférieures et supérieures via une

autre grille d'acier inoxydable. Cette fois-ci cependant, afin d'assurer une bonne colonisation par les bactéries, le remplissage a été fait au maximum avec des masses de granules allant de 2,5 à 4,2 g par électrodes. Un fil d'acier inoxydable est ensuite inséré dans l'intérieur de la cage, en contact avec les granules et la grille d'acier inoxydable. Une mesure de la résistance entre les extrémités extérieures est faite pour chaque électrode et une résistance de moins de 50 Ω a été considérée comme acceptable.

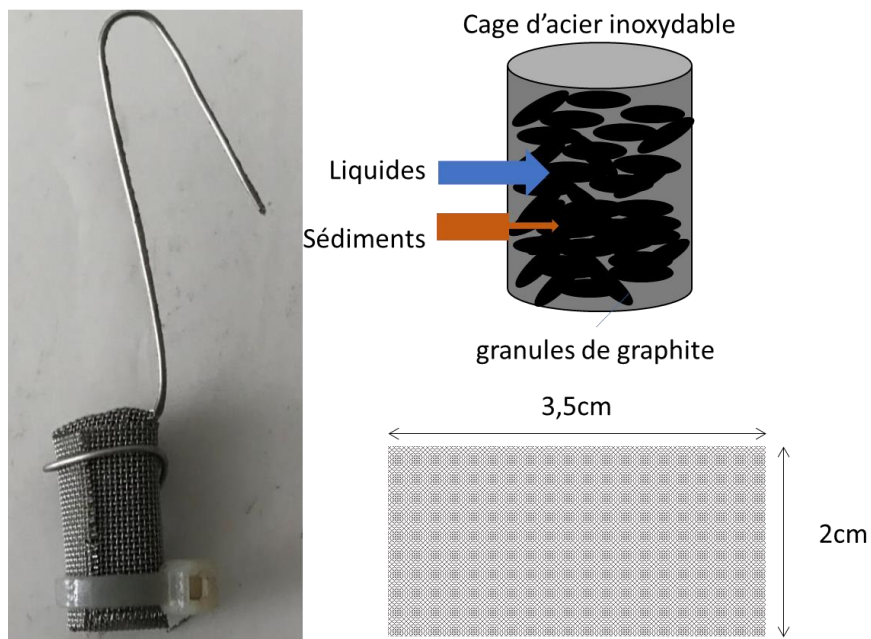


Figure 3 : Schéma des différents composants des électrodes qui seront laissées à incuber dans les 12 premiers pilotes, avec 5 électrodes par pilotes.

- Structure des pilotes

Les 15 pilotes sont composés de petits seaux en plastique transparent. Dans ces derniers sont ajoutés les sédiments. Ces derniers ont été mixés en poudre fine et tamisés afin d'en extraire les éléments les plus volumineux (cailloux, carapace d'escargots...). Cette poudre a ensuite été répartie dans les 15 différents pilotes soit 150 g (équivalent à 160 mL) par pilote. A ces sédiments sont ajoutés 300 mL d'eau pure. Il est à noter qu'hormis les nitrates, aucun autre ajout n'est fait, notamment de carbonate. En effet, lors de notre précédente étude, l'ajout de carbonate de sodium (Na_2CO_3) visait avant tout à permettre le développement des espèces exo-électrogènes autotrophe du carbone au sein des compartiments dénués de matière organique. Or, ces compartiments étaient ceux localisés dans la phase aqueuse uniquement sans contact avec les sédiments, compartiments absents dans cette expérience (un seul compartiment à demi enterré dans les sédiments ici).

Il est à noter que le mixage des sédiments en fine poudre a rendu ces derniers très mobiles. Une simple secousse du pilote génère un nuage de sédiments dans la phase aqueuse ce qui aura pour conséquence que la partie supérieure des électrodes localisée dans l'eau va être recouverte d'une très légère couche de sédiments. Les dimensions approximatives à connaître concernant pilotes sont les suivantes :

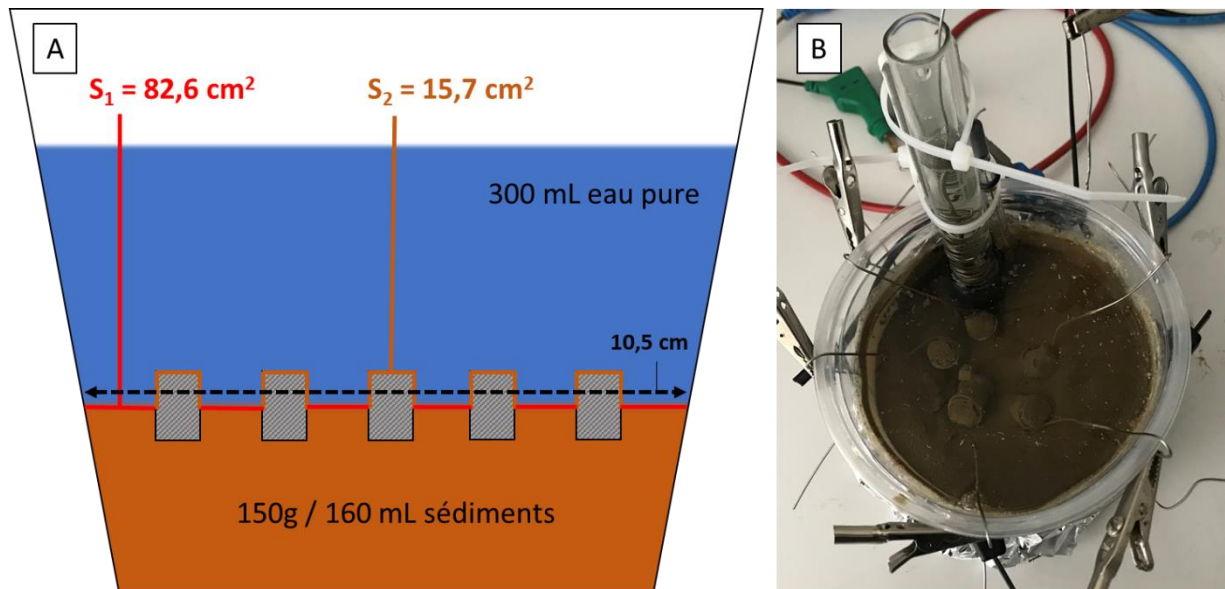


Figure 4 : (A) Schéma des pilotes incluant les dimensions importantes avec S_1 = surface des sédiments en contact avec l'eau, S_2 = surface des électrodes recouverte d'une fine couche de sédiments en contact avec l'eau. (B) Photographie d'un des pilotes vu du dessus avec les 5 électrodes dans le cas d'un pilote incluant la polarisation de ces électrodes (contre-électrode visible dans le tube en verre).

- Polarisation des électrodes

Cette expérience va inclure l'utilisation d'un potentiostat multivoies lors du suivi de l'évolution de courant à $-0,5$ V vs Ag/AgCl (Sat KCl, $0,197$ V vs ENH) pour les 6 premiers pilotes (1 à 3 : pilotes avec électrodes polarisées + bio-augmentation ; 4 à 6 : pilotes avec électrodes polarisées sans bio-augmentation). Afin de permettre cette polarisation des 5 électrodes de chaque pilote, ces électrodes sont alors connectées et utilisées comme une seule électrode de travail. Ainsi, les chronoampérométries (évolution du courant au cours du temps à un potentiel imposé) qui seront montrées dans cette étude concernent la totalité des 5 électrodes pour chaque pilote, sans que ne puisse être détaillée les différences entre électrodes d'un même pilote. Afin de s'assurer que les 5 électrodes étaient bien connectées au lancement de l'expérience, une chronoampérométrie préliminaire a été lancée pour chaque pilote avec électrodes polarisées. Durant cette chronoampérométrie, chacune des 5 électrodes sont déconnectées une à une afin de vérifier qu'une perte de courant (en valeur absolue) est visible lors de la déconnexion d'une des 5 électrodes.

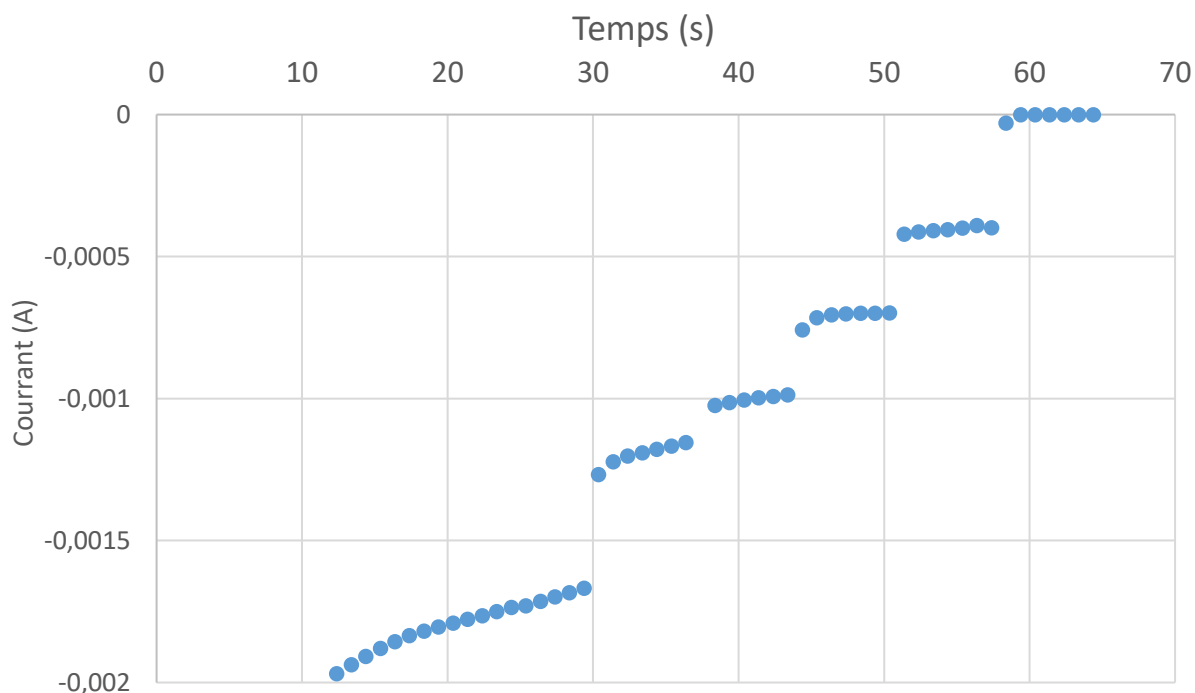


Figure 5 : Chronoampérométrie des cinq électrodes polarisées du pilote 1 à $-0,5$ V vs Ag/AgCl (sat KCl, à $+0,197$ V vs NHE). Les électrodes sont déconnectées une à une à 30 secondes, 36 secondes, 43 secondes, 50 secondes et 57 secondes.

Comme on peut le visualiser sur la Figure 5, la déconnexion successive des électrodes composées d'acier inoxydable et de granules de graphite génère une perte de courant de réduction. Comme l'oxygène peut se réduire à ce potentiel sur graphite nu, il est vraisemblable que ce courant est dû à sa réduction. Ces pertes de courant confirment alors que le courant visible durant les 30 premières secondes s'apparente bel et bien à une addition des courants de réduction de l'oxygène sur les cinq électrodes. Ainsi, cette étude permet d'affirmer que les cinq électrodes sont bien connectées entre elles en tant qu'une seule et même électrode de travail au sein du même pilote. En revanche, on peut noter que la quantité de courant perdue lors de la déconnexion varie en fonction des électrodes déconnectées (avec près de $0,4$ mA pour la première déconnexion à 30 secondes et seulement $0,1$ mA dans le cas de la deuxième à 36 secondes). Cette différence est très probablement liée à l'hétérogénéité des granules de graphite (de taille donc de surface différente). Cette étude a été répétée pour chacun des pilotes incluant des électrodes polarisées.

- Electrodes non polarisées

Dans le cas des pilotes 7 à 12, une série d'électrodes non polarisées sont laissées à incuber dans les sédiments. Dans le cas de ces pilotes, aucune contre-électrode n'est présente et les 5 électrodes (même modèle que pour les précédents pilotes) sont positionnées selon le même principe à savoir à demi enterrées et à demi dans l'eau. A la différence des électrodes des pilotes incluant une polarisation (1 à 6), ces électrodes ne sont pas connectées entre elles. Ces électrodes verront leurs potentiels d'abandon relevés au cours du temps via l'utilisation d'un multimètre couplé à une électrode de référence de type Ag/AgCl (sat KCl, +0,197 V vs ENH). Les valeurs des potentiels des 5 électrodes par pilotes sont ensuite combinées sous forme de moyenne afin de comparer ces valeurs entre les 6 pilotes incluant ces électrodes non polarisées (avec une barre d'erreur équivalentes à la déviation standard entre les 5 électrodes).

- Bio-augmentation par injection de culture pure d'*Azoarcus buckelii*

Dans le cas des pilotes 1 à 3 (électrodes polarisées) et des pilotes 7 à 9 (électrodes non polarisées), une injection de culture pure a été faite dans une tentative d'observer une meilleure efficacité de la dénitrification bio-électrochimique. Lors de l'expérience décrite dans le chapitre précédent, le genre *Azoarcus* avait été identifié comme un genre bactérien d'intérêt dans le cadre de la dénitrification bio-électrochimique. Une étude plus poussée des séquences en question n'avait pas permis de discriminer une espèce bactérienne en particulier au sein de ce genre mais la discrimination d'une espèce bactérienne particulière en général via le séquençage du gène de l'ARNr 16S reste très problématique quoi qu'il arrive. En effet, les bactéries sont capables d'échanger des gènes, voire des métabolismes entiers via des transferts horizontaux (plasmides, îlots de pathogénicités, transposons...) et la pression de sélection peut également générer une adaptation particulière via maintien de mutations, or tous ces processus ne peuvent pas être observés via le séquençage du gène de l'ARNr 16S mais seulement via une étude métagénomique globale (séquençage et reconstitution de l'entièreté du chromosome à partir de l'ADN pur extrait).

Pour cette raison, le choix de l'espèce a été fait en fonction des conditions d'incubation des pilotes. Les deux caractéristiques les plus importantes sont : la présence d'un métabolisme de dénitrification mais également la température optimale de croissance. Pour cette raison, c'est la souche *Azoarcus Buckelii* U120 [1] qui a été choisie puisqu'elle se montre capable de réduire le nitrate mais également le nitrite et qu'elle possède surtout une température de croissance

optimale de 28°C qui est inférieure à celle de la plupart des autres espèces appartenant au genre *Azoarcus* (30°C ou plus [2]). La souche type U120 a été commandée sur le site allemand DSMZ.

Une culture pure de cette souche a été lancée en suivant les recommandations du fournisseur en termes de composition de milieu et de conditions de culture. La culture a été laissée en bain marie à 28°C pendant une semaine à côté d'une solution témoin (soumise au même protocole de préparation et d'incubation mais sans inoculation). Après une semaine, la culture pure s'est troublée (la solution témoin est restée parfaitement claire) et sa densité optique à 600 nm a donné une valeur de 1,9 avec comme témoin négatif la solution restée claire. Aucune information n'est disponible sur la corrélation entre cette valeur de densité et la quantité d'UFC (unité formant colonies) dans la littérature, rendant la quantité de bactéries difficile à estimer. Cette culture pure a ensuite été agitée via l'utilisation d'un vortex puis divisée en plus petits volumes de 1,5 mL qui ont été centrifugés avant que le culot de bactéries ne soit resuspendu dans 800 µL de tampon phosphate.

Après 8 jours d'incubation (voir la partie chronologie de l'expérience dans les pages suivantes), cette culture pure a ensuite été injectée délicatement via une seringue dans chacune des 5 électrodes des pilotes 1 à 3 (avec électrodes polarisées) et des pilotes 7 à 9 (électrodes non polarisées).

- Analyses électrochimiques des électrodes en fin d'incubation

Après les 158 jours d'incubation, les différentes parties des électrodes de chaque pilote ont été étudiées électro-chimiquement, notamment via voltamétrie cyclique. L'un des problèmes liés à ces analyses est le cas des granules de graphite. En effet, de par leur nature, ces granules vont avoir tendance à démultiplier la surface de l'électrode de travail (dont ils font partie) et donc à augmenter le courant capacitif de manière tellement importante que le courant faradique devient difficile à visualiser à moins de se placer à des vitesses de balayage (en $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$) extrêmement faibles. Cette solution de diminuer la vitesse de balayage n'est exploitable qu'en partie, car il est difficile d'étudier la totalité des électrodes incubées (60 électrodes réparties en 12 pilotes) à des vitesses de balayage trop faible car le temps investi serait bien trop important. Pour cette raison, un protocole a été mis au point afin de pouvoir étudier chaque électrode (notamment les granules de graphite seuls) et qui sera utilisé pour toute la partie d'analyse électro-chimique.

Le protocole est le suivant : en premier lieu une étude de l'électrode complète (cage d'acier inoxydable + granules de graphite) comme électrode de travail est effectuée. Par la suite, une petite quantité de graphite est ensuite extrait de la cage et placée dans une structure en plastique

percée dans laquelle est insérée un fil d'acier inoxydable en contact avec cette petite quantité de granules qui seront ensuite étudiés par voltamétrie cyclique. Ce protocole d'étude des granules de graphite a été répété deux fois par électrodes et est résumé Figure 6.

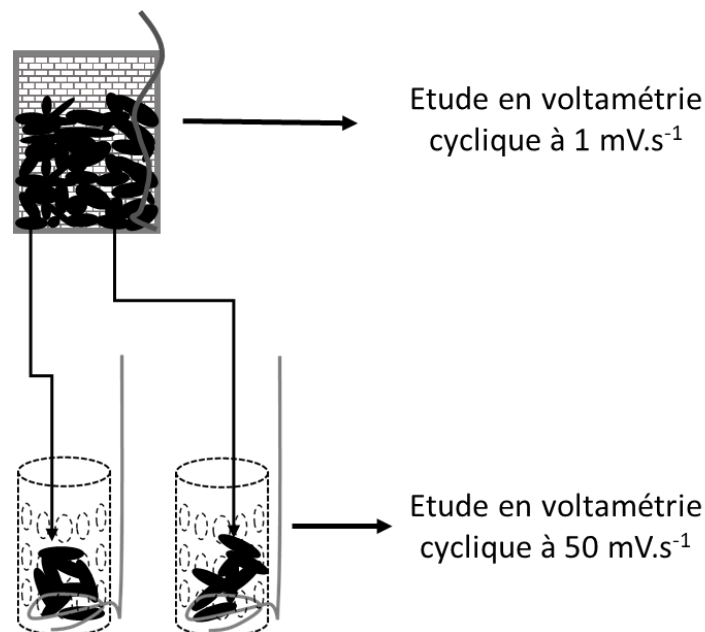


Figure 6 : Schéma expliquant le protocole d'études électrochimiques des électrodes après les 158 jours d'incubation.

Concernant les conditions d'étude, les voltamétries cycliques sont toutes pratiquées contre une électrode de référence de type Ag/AgCl (saturée KCl, + 197 mV vs NHE) dans un tampon phosphate composé de 100 mM de K_2HPO_4 et de 100 mM de KH_2PO_4 . Lors des études sous saturation à l'argon, un dégazage est effectué dans le tampon phosphate pendant 5 à 10 minutes puis l'arrivée d'argon est ensuite laissée ouverte dans l'atmosphère du récipient où les études sont effectuées.

- Etude des communautés bactériennes via séquençage du gène de l'ARNr 16S

Comme dans les expériences décrites dans les chapitres précédents, une étude des communautés bactériennes a été effectuée. La quantité d'échantillons séquencés est cette fois-ci bien plus élevée avec 138 échantillons différents. Ces 138 échantillons seront ainsi soumis à une extraction de l'ADN bactérien via l'utilisation d'un kit d'extraction, le kit d'extraction DNeasy® PowerSoil® du fabricant Qiagen®. Pour les échantillons particuliers (sédiments ou granules de graphite), 0,25 g ont été utilisés alors que les échantillons composés de structures solides (grilles d'acier inoxydable) ont été découpés afin d'obtenir des morceaux pesant entre 0,20 et 0,35 g et soumis au traitement du kit. L'ADN pur a ensuite été expédié à la Plateforme GeT-Biopuces de l'INSA de Toulouse où les étapes d'amplification et de séquençage ont été

effectuées. Comme pour les précédentes expériences, ce sont les régions V4-V5 du gène codant pour l'ARNr 16S via l'utilisation des primers 515F et 928R qui seront amplifiées par PCR.

En revanche, l'étape de séquençage va différer des précédentes par l'utilisation de la technologie Illumina plutôt que celle de l'Ion Torrent. Cette technologie diffère légèrement par son principe, notamment par le fait qu'elle permet le séquençage des deux brins complémentaires pour chaque amplicon. Le fonctionnement de la technologie globale ne sera pas détaillée dans cette thèse mais est décrite dans de nombreux articles et pour de nombreuses applications, incluant l'amplification et le séquençage du gène de l'ARNr 16S [3].

Les différents échantillons (résumés Figure 7) sont tous prélevés à la fin de la période d'incubation de 158 jours et sont au nombre de 138 au total et répartis en 3 catégories différentes : en premier lieu les granules de graphite à l'intérieur de la cage d'acier inoxydable et les grilles en acier inoxydable dont l'extraction a été faite deux fois pour chacune d'entre elles : sur la partie incubée dans l'eau et sur la partie enterrée dans les sédiments. Pour ces deux types d'échantillons, sur les 5 électrodes de chacun des pilotes, seules 3 ont été étudiées. La dernière catégorie est celle des sédiments. Pour les 15 pilotes, les sédiments de surface ont été prélevés en début d'incubation (1^{er} jour) et en fin d'incubation (158^{ème} jour).

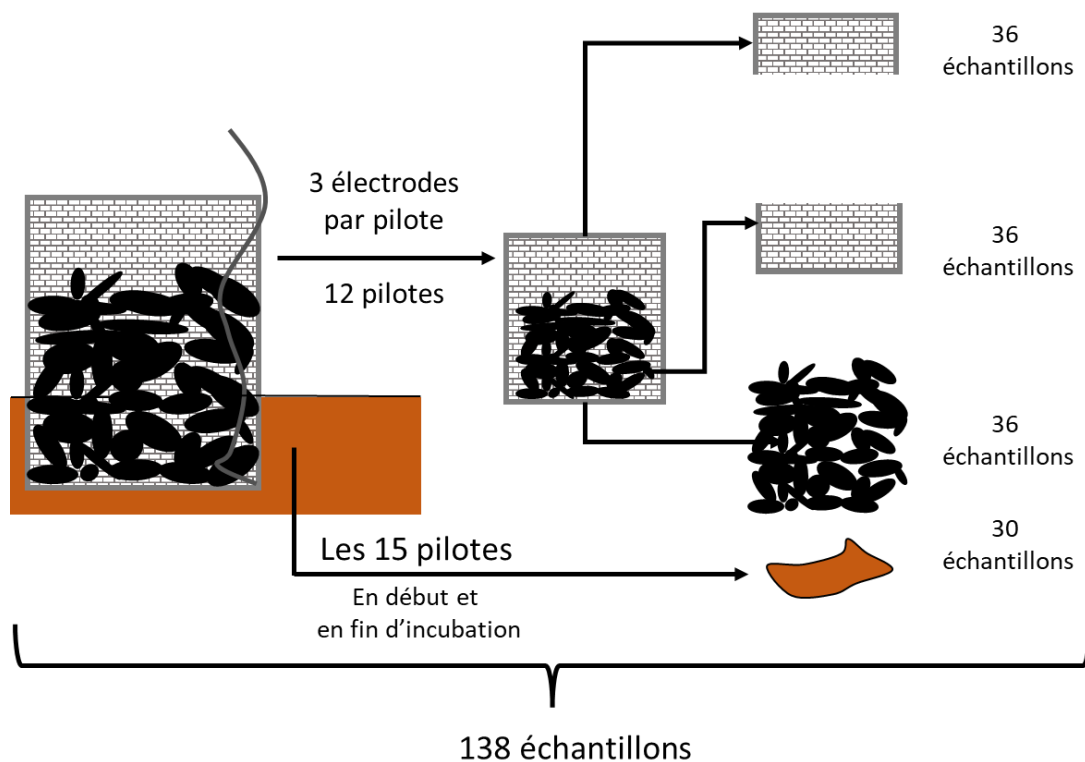


Figure 7 : Schéma synthétisant les différents types d'échantillons dont les communautés bactériennes seront analysées via une extraction de l'ADN, l'amplification et le séquençage du gène de l'ARNr 16S puis le traitement bio-informatique.

- Suivi du pH et des concentrations en nitrates et nitrites

Tous les deux jours, 2 mL d'eau de chaque pilote ont été prélevés dans l'optique d'étudier et de comparer l'évolution des concentrations en nitrates mais également des nitrites au cours du temps. L'estimation des concentrations est prévue pour être effectuée via chromatographie ionique sur un appareil 881 Compact IC pro (Metrohm®). Ce suivi des concentrations en nitrate et nitrite n'est pas encore disponible. Néanmoins, lors du suivi d'incubation une estimation des concentrations en nitrate a été effectuée via l'utilisation de bandelettes colorimétriques semi-quantitative Quantofix®. Si cette méthode ne nous permet de connaître l'évolution des concentrations dans le détail, elle a permis d'effectuer les additions lorsque les concentrations en nitrate dans les différents pilotes étaient relativement faibles (moins de 50 mg.L⁻¹ dans tous les pilotes). Pour ce qui est du pH, ce dernier est relevé tous les trois jours et ce dernier n'est jamais tombé en dessous de 6,7 et n'a jamais dépassé 8,1.

- Chronologie globale de l'expérience

L'expérience est lancée à t = 0 jour. Les pilotes ont été montés avec des sédiments et de l'eau à t = -7 j sans nitrate présents. A t = 0 j, les électrodes ont été mises en place et polarisées à -0,5 V vs Ag/AgCl pour celles des pilotes 1 à 6. A ce même moment (t = 0 j), la première addition de nitrate de sodium est effectuée pour une concentration finale de 400 mg.L⁻¹ de NO₃⁻. Durant les 5 mois d'incubation (158 jours), plusieurs autres ajouts de nitrate de sodium sont effectués.

Jour de l'addition	Concentrations ajoutées dans chaque pilote	
	En mg de NO_3^- par L	En mg de N-NO_3^- par L
0 jours	+ 400 mg.L^{-1}	+ 90,5 $\text{mg N-NO}_3^- .\text{L}^{-1}$
7 jours	+ 400 mg.L^{-1}	+ 90,5 $\text{mg N-NO}_3^- .\text{L}^{-1}$
8 jours	Ajout cultures pures d' <i>Azoarcus Buckelii</i> dans les pilotes 4 à 6 et 9 à 12	
26 jours	+ 400 mg.L^{-1}	+ 90,5 $\text{mg N-NO}_3^- .\text{L}^{-1}$
44 jours	+ 400 mg.L^{-1}	+ 90,5 $\text{mg N-NO}_3^- .\text{L}^{-1}$
75 jours	+ 400 mg.L^{-1}	+ 90,5 $\text{mg N-NO}_3^- .\text{L}^{-1}$
105 jours	+ 10 mg.L^{-1} NaCl dans tous les pilotes	
120 jours	+ 100 mg.L^{-1}	+ 22,6 $\text{mg N-NO}_3^- .\text{L}^{-1}$
138 jours	+ 400 mg.L^{-1}	+ 90,5 $\text{mg N-NO}_3^- .\text{L}^{-1}$

Table 2 : Récapitulatif des différents ajouts effectués au cours de l'expérience sur les 158 jours d'incubation.

Les ajouts en nitrate de sodium ont été effectués lorsque les concentrations en nitrates moyennes pour les 15 pilotes arrivaient à des niveaux relativement bas (moins de 50 mg.L^{-1}) afin d'essayer de maintenir une concentration importante en permanence et de conserver une pression de sélection favorable aux bactéries dénitrifiantes.

A noter, que très régulièrement lors des 5 mois d'incubation, des ajouts d'eau pure ont été faits afin de remplacer celle perdue par évaporation dans l'optique maintenir un volume d'eau constant.

III) Résultats

1) Etudes de la chronoampérométrie des pilotes 1 à 6 avec électrodes polarisées

La chronoampérométrie des 5 électrodes pour chacun des pilotes de 1 à 3 (avec électrodes polarisées et ajouts de culture pure d'*Azoarcus Buckelii*) et pilotes de 4 à 6 (avec électrodes polarisées mais sans ajout de culture pure) est détaillée via la Figure 8. Les électrodes ont été polarisées pendant 158 jours.

a) Chonoampérométrie globale sur les 158 jours d'incubation

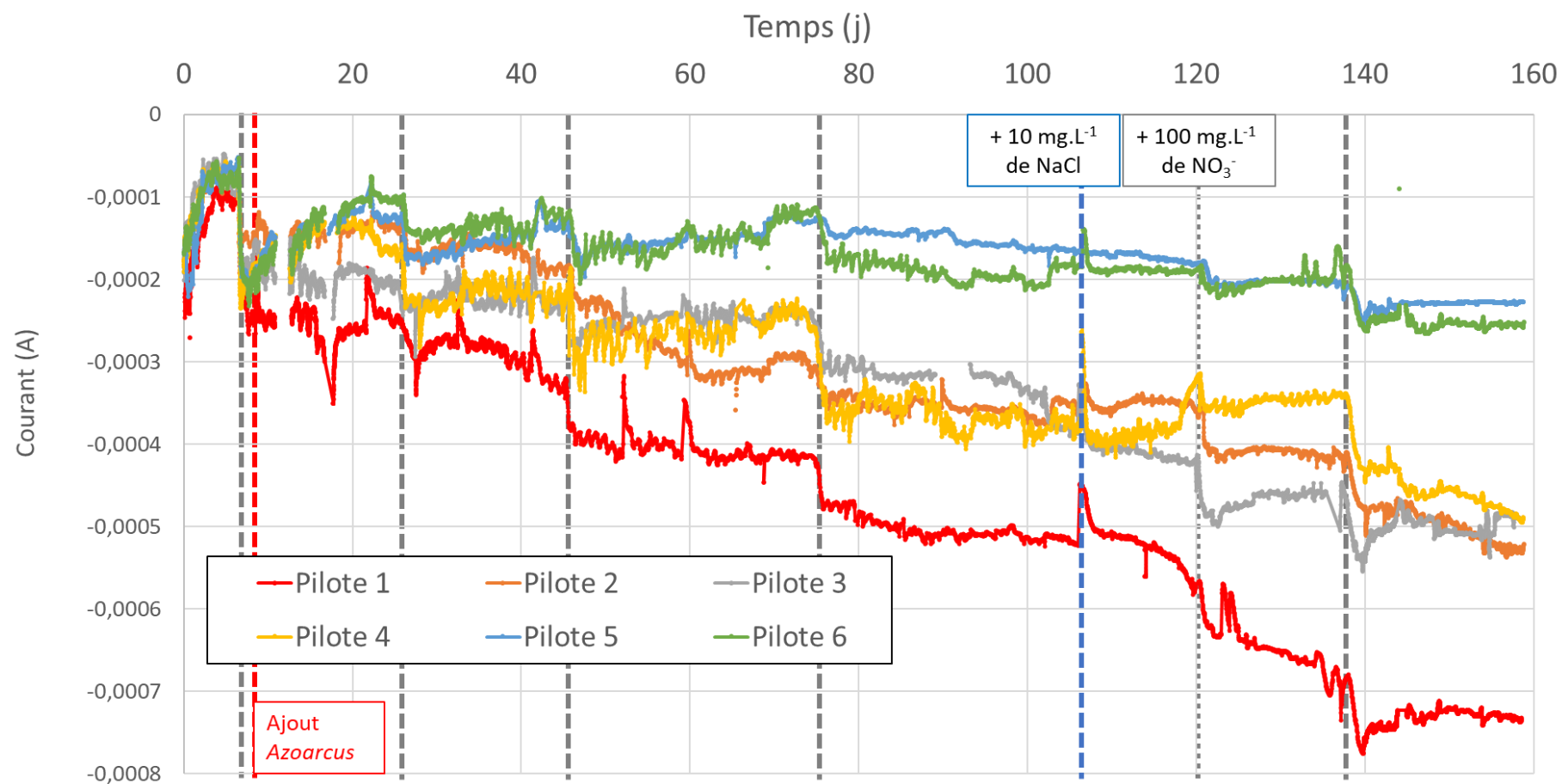


Figure 8 : Chronoampérométrie des 5 électrodes polarisées ensemble à -0,5 V vs Ag/AgCl des pilotes 1 à 6 sur les 158 jours d'incubation. Les traits gris verticaux en pointillés représentent des additions en nitrate de sodium pour une concentration finale ajoutée de 400 mg.L⁻¹ dans chaque pilote sauf mention du contraire. La concentration initiale à t = 0 jour en nitrate est de 400 mg.L⁻¹ et les ajouts de nitrate ont lieu à t = 7 jours, 26 jours, 44 jours, 75 jours, 120 jours (+ 100 mg.L⁻¹), 138 jours.

La Figure 8 nous permet d'obtenir une vue d'ensemble de l'évolution du courant pour les 6 pilotes avec électrodes polarisées sur les 158 jours d'incubation. On peut noter plusieurs points :

► En premier lieu on peut noter une réaction des 6 pilotes sur chronoampérométrie lors des ajouts de nitrate de sodium. Cette réaction se traduit par une augmentation du courant de réduction dans les quelques heures qui suivent l'ajout.

► Par ailleurs, un autre point à noter est qu'à $t = 105$ jours, 10 mg.L^{-1} de NaCl ont été ajoutés afin de s'assurer que les augmentations du courant de réduction soient bien causées par l'ajout de nitrate et non par celle du sodium (couplé au nitrate sous forme de sel lors des ajouts). Lors de cet ajout de NaCl à $t = 105$ j, on observe une diminution brutale du courant de réduction mais celle-ci sera presque immédiatement compensée par une ré-augmentation et le courant reviendra à son niveau initial avant ajout de NaCl. Cette réaction à l'ajout de NaCl distincte de celle à l'ajout de NaNO_3 nous permet d'affirmer que c'est bien l'ion nitrate qui cause les augmentations de courant de réduction et non l'ion sodium.

► Or, cette réaction au NO_3^- va se traduire de deux façons sur chronoampérométrie selon les pilotes. Le premier cas est celui d'une augmentation du courant de réduction doublée d'une diminution progressive sur les jours qui suivent pour revenir à une valeur proche de sa valeur d'origine (avant ajout de nitrate de sodium). On peut par exemple observer cela pour les pilotes 5 et 6 (sans ajout de culture pure) sur les quatre premières additions. En effet, lors des ajouts à $t = 7$ jours, 26 jours et 44 jours, le courant de réduction va augmenter puis décroître progressivement au cours du temps pour revenir à une valeur fixe d'environ $-0,1 \text{ mA}$ pour les deux pilotes.

► L'autre profil observé est celui d'une augmentation du courant de réduction au moment de l'addition mais sans diminution progressive dans les jours suivants celle-ci. C'est notamment le cas pour les pilotes 1, 2 et 3 (avec bio-augmentation en *Azoarcus Buckelii*). Ainsi, on constate une accumulation des augmentations du courant de réduction au fil des ajouts avec comme conséquence un courant de réduction bien plus important en fin d'incubation pour ces pilotes comparés aux pilotes 5 et 6 (pas de bio-augmentation). En effet, sur les derniers jours de mesure, on note un courant d'environ $-0,7 \text{ mA}$ pour le pilote 1 est de seulement $-0,22 \text{ mA}$ pour les pilotes 5 et 6 soit 3 fois moins.

Dans le cas du premier profil montrant une augmentation du courant suivi d'une diminution progressive, on peut envisager que cette diminution est liée à la baisse des concentrations en nitrate au sein des pilotes, ces derniers étant progressivement réduits via la dénitrification,

signifiant que ce courant de réduction est directement lié à la réduction électro-chimique des nitrates.

Néanmoins, pour que nos hypothèses soient envisageables, il est absolument nécessaire de vérifier que les ordres de grandeur sont compatibles entre les valeurs des augmentations de courant de réduction et celles des concentrations de nitrate ajoutées.

b) Etude comparative entre charge électrique et quantité de nitrate réduit

En effet, il est possible de convertir la quantité de courant (en Coulombs) consommée sur un temps donné (soit la charge électrique) en mole d'électrons via la constante de Faraday. La première étape de ce procédé est d'intégrer le courant en fonction du temps pour ce que nous suspectons être lié à la bio-électro-réduction des nitrates sur chronoampérométrie. Notre choix se portera sur la période entre les deux ajouts à $t = 44$ jours et $t = 75$ jours pour les pilotes 4, 5 et 6. Le choix de ces pilotes s'explique par le fait que ces derniers montrent une diminution progressive du courant sur les jours suivant l'augmentation, ce qui peut s'expliquer par une diminution des concentrations en nitrates dû à la dénitrification (sous toutes ses formes). Cela permet ainsi de mieux définir la charge électrique liée à ce que nous suspectons être la réduction bio-électrochimique des nitrates.

A $t = 44$ jours, un ajout de 400 mg.L^{-1} de NO_3^- a été effectué alors que les concentrations en nitrate étaient inférieures à 50 mg.L^{-1} dans tous les pilotes. Après 31 jours, soit à $t = 75$ jours, la concentration en nitrate est également retombée à moins de 50 mg.L^{-1} au sein de tous les pilotes, signifiant que la large majorité des 400 mg.L^{-1} de NO_3^- ajoutés à 44 jours ont été transformés. Cette concentration (400 mg.L^{-1} de NO_3^- ajouté) représente une quantité de matière de **1,9 mmole de NO_3^-** pour chaque pilote.

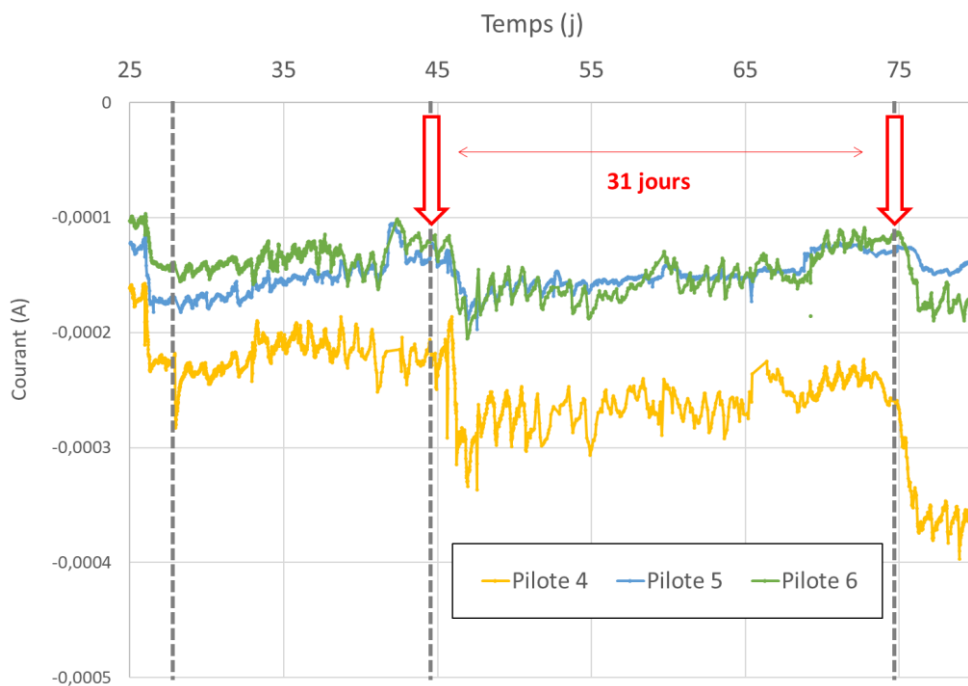


Figure 9 : Chronoampérométrie des pilotes 4 à 6 entre 25 et 80 jours. Durant cette période, trois ajouts en nitrate de sodium ont été effectués à $t = 26$ jours, à $t = 44$ jours et à $t = 75$ jours avec à chaque fois une concentration ajoutée de 400 mg.L^{-1} de NO_3^- . Les 5 électrodes de chaque pilote sont polarisées ensemble à $-0,5 \text{ V}$ vs ECS.

Sur cette même période de 31 jours entre les ajouts à 44 jours et 75 jours, nous allons estimer la charge électrique consommée autrement dit l'intégration du courant en fonction du temps sur la chronoampérométrie afin d'obtenir sa valeur en Coulomb (A.s). Pour cela, nous allons définir une valeur seuil de courant, à savoir la valeur précédant les deux ajouts à 44 et 75 jours lorsque les concentrations en nitrate sont inférieures à 50 mg.L^{-1} . Ainsi, nous pouvons affirmer que le courant de réduction égal à cette valeur seuil n'est pas liée à la réduction des nitrates sur cette période. Ce courant seuil est vraisemblablement lié à la réduction d'autres composés (O_2 , NO_2^- ...) et n'est donc pas inclus dans l'intégration.

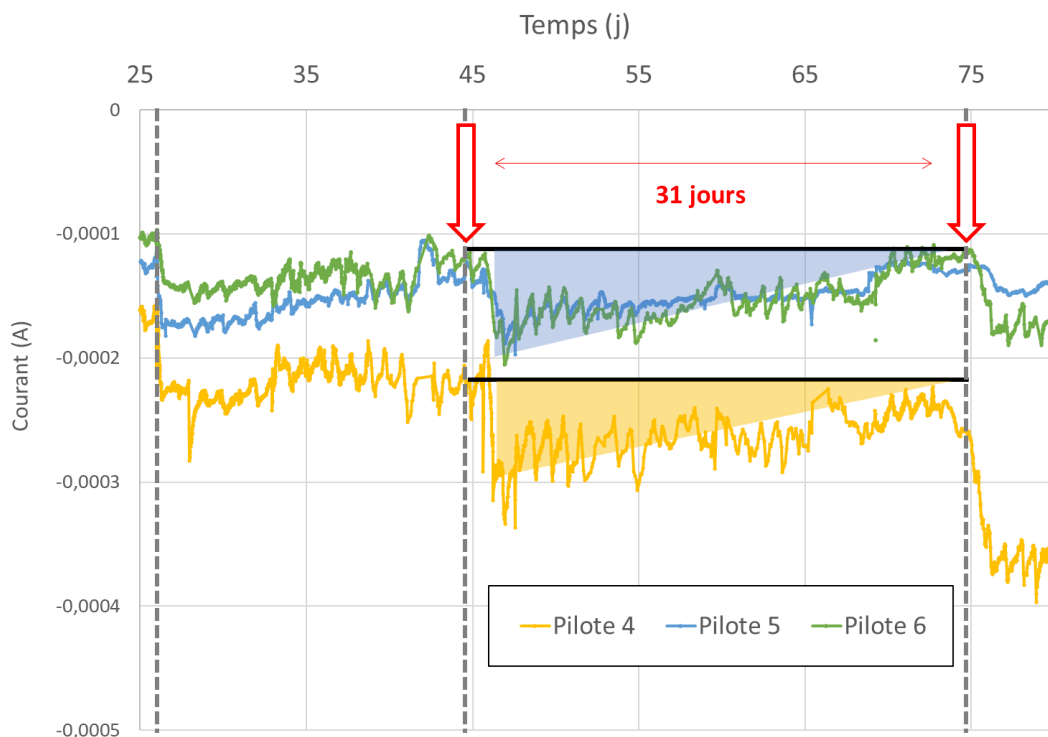


Figure 10 : Chronoampérométrie incluant les surfaces qui seront intégrées afin d'estimer la charge électrique potentiellement liée à la réduction du nitrate ajouté à $t = 44$ jours. Pour cela, on utilise la valeur de courant avant l'ajout de nitrate comme valeur seuil et on intègre le courant en fonction du temps entre cette valeur « seuil » et la courbe de chronoampérométrie. Dans le but de simplifier le processus d'intégration de l'aire, cette surface est assimilée à un triangle rectangle.

Ainsi la charge électrique liée à l'ajout de nitrate de sodium sur cette période est de :

$$\text{Pilote 5 et 6 : } \frac{0,00008 * 2\,678\,4000}{2} = 107 \text{ Coulombs (A.s)}$$

$$\text{Pilote 4 : } \frac{0,00007 * 2\,678\,4000}{2} = 93 \text{ Coulombs (A.s)}$$

avec 0,00008 : la valeur de l'augmentation du courant de réduction lors de l'ajout (en Ampère) et 2 678 400 : le temps en secondes de la période étudiée (31 jours) avec une division par 2 (aire d'un triangle rectangle).

L'étape suivante consiste ensuite à convertir cette charge électrique en quantité d'électrons. En effet, les électrons possèdent tous une charge connue et définie de $1,602 \cdot 10^{-19}$ C. Par l'intermédiaire de la constante de Faraday (96 485 A.s par mole d'électrons), il est ensuite possible d'estimer la quantité d'électrons (en moles) impliquée dans les réactions de réduction ou d'oxydation pour une charge électrique donnée. Dans notre cas, cette valeur représentera la quantité d'électrons captés depuis l'électrode et utilisés pour réduire un composé (que nous supposons ici être le nitrate ajouté à $t = 44$ jours) sur cette période de 31 jours.

Après calcul nous obtenons donc : 1,1 mmole d'électrons pour les pilotes 5 et 6 et 0,96 mmole d'électrons dans le cas du pilote 4.

Or, notre hypothèse se base sur l'idée que la charge définie Figure 10 (la surface intégrée sous la forme d'un triangle rectangle) est bien liée à la bio-électro-réduction des nitrates. Lors du processus de dénitrification, les nitrates sont réduits en nitrite via la réaction suivante :



Cette équation stipule donc que pour une mole de nitrate réduite en nitrite, deux moles d'électrons sont consommées (captées depuis l'électrode dans le cas d'une bio-électro-réduction).

Ainsi, dans le cadre de notre hypothèse, sur la période de 31 jours définie, la charge électrique causée par l'ajout de nitrate de sodium permettrait la réduction de **0,55 mmole** de NO_3^- pour les pilotes 5 et 6 et de **0,48 mmole** de NO_3^- dans le cas du pilote 4.

Or, comme expliqué précédemment, ce sont environ **1,9 mmole de NO_3^-** qui ont été transformées sur cette période, et ce dans chacun des pilotes. Notre estimation de la quantité de nitrate réduit via bio-électro-réduction représente donc environ 25 % de la quantité totale de nitrate réduite sur la période.

Il est nécessaire de conserver à l'esprit que cette étude permettant d'estimer la proportion de nitrate réduite bio-électrochimiquement par rapport au nitrate total se base sur des estimations, et que cette valeur de 25% doit être utilisée avec précaution. En effet, on ne considère ici que la réaction de réduction des nitrates en nitrites, alors que d'autres réactions de réduction peuvent avoir lieu au niveau des électrodes (oxygène, d'autres étapes de la dénitrification...) sur la

période. Néanmoins, l'objectif ici est avant tout de s'assurer que les échelles de grandeur concordent entre la quantité de courant visible sur chronoampérométrie après ajout et la quantité de nitrate ajoutée, ce qui est bien le cas.

Ainsi notre hypothèse qui stipule que les augmentations de courant au moment des ajouts de nitrate de sodium soit directement liée à la bio-électro-réduction des nitrates au niveau des électrodes par des biofilms exo-électrogènes est pertinente. Les études en voltamétrie cyclique des différentes électrodes des pilotes 1 à 6 nous permettront de vérifier si la réduction des nitrates est bien présente. Néanmoins, avant de passer aux études en voltamétrie cyclique, il convient d'étudier les électrodes des pilotes 7 à 12 qui n'ont pas été polarisées.

2) Etudes des potentiels d'abandon des électrodes non polarisées pour les pilotes 7 à 12

Pour ce qui est des pilotes allant de 7 à 12, il est bon de rappeler qu'il n'y a pas de polarisation des électrodes. En effet, les électrodes sont laissées à incuber au sein des pilotes, à demi enterrées dans les sédiments. Parmi les 6 pilotes dans ces conditions, les électrodes des pilotes de 7 à 9 ont reçu une dose de culture pure d'*Azoarcus Buckelii* à $t = 8$ jours alors que les électrodes des pilotes 9 à 12 n'ont reçu aucun ajout de culture pure.

Chaque pilote contient 5 électrodes et un relevé régulier des potentiels d'abandon de chacune des électrodes a été effectué afin de vérifier si ces potentiels sont compatibles avec une bio-électro-réduction des nitrates.

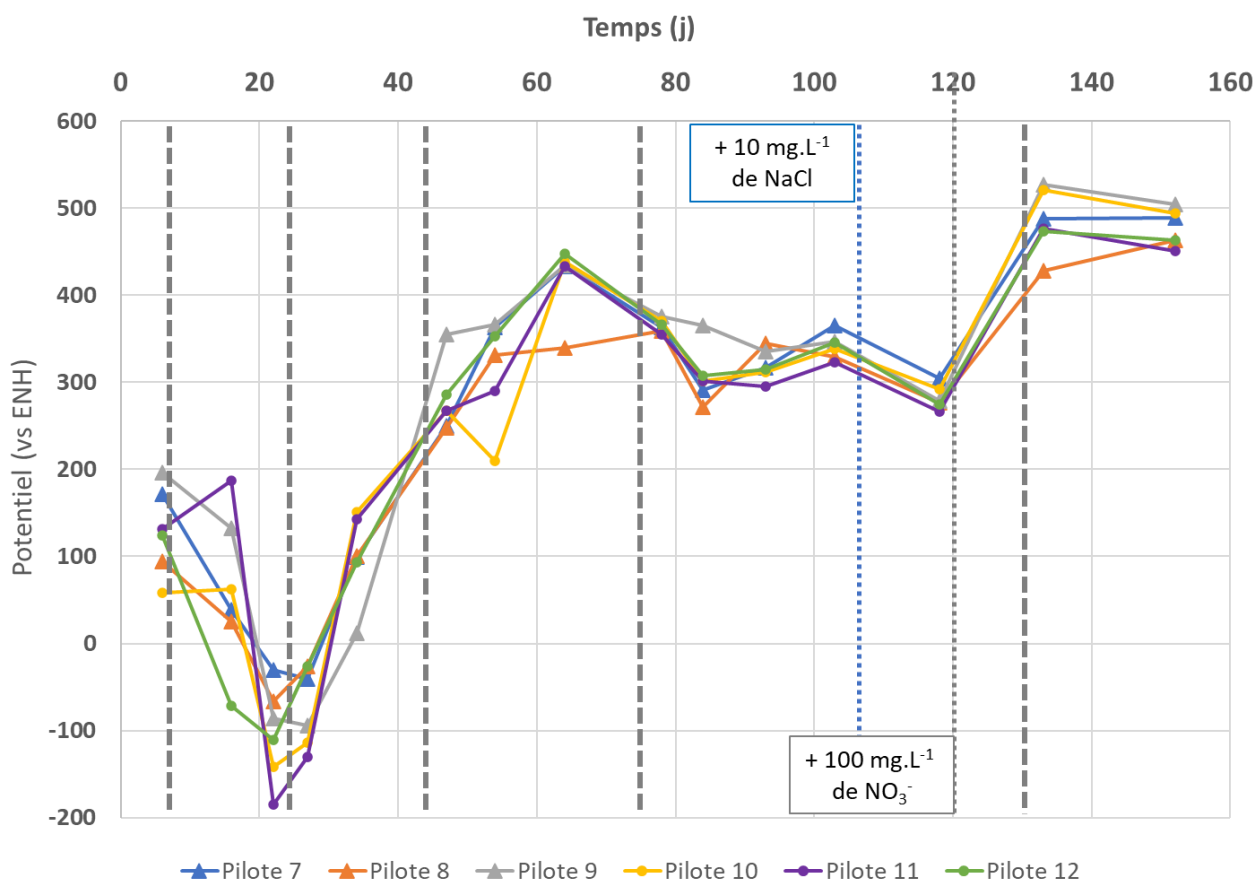


Figure 11 : Evolution de la moyenne des potentiels des 5 électrodes par pilotes au cours du temps contre ENH sur les 158 jours d'incubation. Les potentiels de chaque électrode ont été relevés contre une électrode Ag/AgCl (sat KCl, + 197 mV vs ENH) puis remis contre le potentiel d'une électrode normale à l'hydrogène. Les traits gris en pointillés indiquent les additions de + 400 mg.L⁻¹ de NO₃⁻ sous forme de nitrate de sodium, sauf mention du contraire.

Sur la Figure 11 est détaillée l'évolution des moyennes des potentiels des 5 électrodes pour les pilotes 6 à 12. Plusieurs éléments peuvent être notés :

► Sur les premières mesures (à $t = 6$ jours), les potentiels tournent autour de valeurs positives (entre 200 mV pour le pilote 9 et 70 mV pour le pilote 10, vs ENH). On va ensuite assister à une diminution de ces potentiels pour tous les pilotes à des valeurs négatives allant de -180 mV à -30 mV selon les pilotes avec une moyenne autour de -100 mV vs ENH. On peut noter en particulier la diminution la plus importante pour le pilote 11 avec un passage de +175 mV à 16 jours à -180 mV vs ENH à 22 jours. Par ailleurs, on peut également observer que les valeurs de potentiel les plus négatives à ce moment ($t = 22$ j) sont les trois pilotes n'ayant pas reçu de bio-augmentation par injection de culture pure d'*Azoarcus Buckelii* (pilotes 10, 11 et 12).

Vient ensuite une deuxième période montrant cette fois-ci une augmentation des potentiels pour tous les pilotes, et ce jusqu'à $t = 64$ jours. A ce moment, les valeurs des moyennes de potentiels sont très proches (à une exception près) et tournent autour de 430 mV vs ENH. L'exception en question concerne le pilote n°8 pour lequel la valeur de la moyenne des potentiels de ses électrodes est d'environ 340 mV vs ENH.

Par la suite, on constate une légère diminution des potentiels aux alentours de 300 mV vs ENH à jusqu'à $t = 84$ jours puis une stabilisation autour de ce potentiel jusqu'à 120 jours. Vient ensuite à nouveau une augmentation des moyennes des potentiels des électrodes de leur pilote respectifs à des potentiels allant de 520 mV pour les pilotes 9 et 10 à 475 mV vs ENH pour le 11 et 12 avec à nouveau une exception pour le pilote 8. On observera ensuite une stabilisation aux alentours de cette valeur de 500 mV sur les derniers jours d'incubation.

D'un point de vue global on peut noter deux choses importantes : premièrement, on observe sur les premières semaines une certaine hétérogénéité dans les valeurs des moyennes de potentiels d'un pilote à l'autre. En effet, lors de la mesure à $t = 16$ j, les valeurs vont de -71 à -185 mV vs ENH en fonction des pilotes, soit un écart d'environ 250 mV. Cette hétérogénéité va peu à peu diminuer au cours du temps avec des valeurs de plus en plus proches jusqu'à moins de 50 mV d'écart sur les 60 derniers jours.

Néanmoins il est nécessaire de bien garder à l'esprit que les valeurs décrites ici pour chacun des pilotes sont des moyennes calculées à partir des potentiels des 5 électrodes incubées dans ces mêmes pilotes et enterrées à mi-hauteur dans les sédiments. Ainsi, un point important à prendre en compte est l'écart type (ou déviation standard), à savoir un indicateur statistique permettant de connaître à quel point les valeurs de potentiel de chaque électrode varie de l'une

à l'autre, chose impossible à visualiser via une simple étude de la moyenne. Les valeurs d'écart type sont détaillées en Annexe de ce Chapitre mais pour récapituler leur évolution, on peut observer des valeurs d'écart type qui diminuent de plus en plus au cours du temps d'incubation. Cela signifie les variations de potentiel d'une électrode à l'autre au cours du temps pour un même pilote va diminuer au fil des mois d'incubation devenant de plus en plus homogène.

Après cette analyse, une discussion des résultats s'impose :

► En premier lieu on peut constater que les valeurs de potentiel vont varier de deux manières au cours de l'incubation : Dans un premier temps, ces dernières vont diminuer vers des valeurs négatives allant de -50 mV à -200 mV vs ENH, et ce sur les 25 premiers jours d'incubation. Par la suite, on va observer une augmentation de ces potentiels vers des valeurs plus positives aux alentours de 400 mV vs ENH puis se stabiliser, voire légèrement augmenter sur les 100 derniers jours. Ce constat est très important car ces potentiels peuvent nous permettre d'imaginer les réactions d'oxydation ou réduction présentes au niveau de l'électrode.

En effet, lors de notre précédente expérience, des structures en acier inoxydables avaient été enterrées sous une couche de sédiments sans contact direct avec l'air et les valeurs de potentiel d'abandon tournaient autour de -400 mV vs ENH, une valeur légèrement trop négative pour être compatible avec une oxydation optimale de l'acétate ou du glucose en CO₂ par des bactéries exo-électrogènes. Pour rappel, le potentiel observé (soit la tension de seuil) pour l'oxydation de l'acétate en CO₂ par des biofilms exo-électrogènes est d'environ -0,3 V vs ENH à pH = 7 [4]. Or, pour qu'une réaction d'oxydo-réduction soit thermodynamiquement favorable, il est nécessaire que la tension de seuil de la réaction d'oxydation soit inférieure à la tension de seuil de la réaction de réduction.

Dans le cas présent, nos électrodes enterrées montrent un potentiel d'abandon compatible avec celui de l'oxydation de l'acétate et donc de la matière organique présente dans les sédiments en général par des biofilms exo-électrogènes qui auraient colonisé leur surface. Ainsi, il est tout à fait possible que sur les premiers 25 jours d'incubation, une oxydation de la matière organique avec le transfert des électrons qui en résulte à l'électrode ait eu lieu. Pour ce qui est de la réaction de réduction couplée à celle de l'oxydation, il est difficile de déterminer s'il peut s'agir de celle des nitrates ou bien d'une autre espèce (oxygène, ions métalliques présents dans l'eau ou les sédiments...). Si l'on s'en tient au potentiel d'équilibre thermodynamique à pH = 7 des nitrates en nitrite, on obtient $E_0 = 0,42 \text{ V vs ENH}$ [5]. D'un point de théorique, on peut donc considérer

que cette oxydation de la matière organique puisse bel et bien être couplée à une réduction des nitrates.

Néanmoins, comme expliqué à plusieurs reprises dans les Chapitres précédentes, on constate expérimentalement une surtension importante et la tension de seuil de la réduction des nitrates par des bactéries exo-électrogènes est visible plutôt autour de -0,3 V vs Ag/AgCl comme c'est le cas pour l'espèce *Thiobacillus denitrificans* [28]. De fait, il est très improbable que la réaction de réduction couplée à la possible oxydation de la matière organique par des biofilms exo-électrogènes soit celle de la réduction des nitrates.

Par la suite, après environ un mois d'incubation, on observe une augmentation importante du potentiel vers des valeurs très positive (entre 300 et 500 mV vs ENH). Si les potentiels négatifs observés sur les 30 premiers jours sont bien causés par une oxydation de la matière organique par des bactéries exo-électrogènes, alors cette augmentation pourrait s'expliquer par un épuisement de la matière organique oxydable aux abords de l'électrode.

Ainsi, dans le montage détaillé ici (électrode non polarisée incubée dans les sédiments), l'absence de polarisation ne permet pas de fournir les électrons via une contre électrode, signifiant que les électrons des sédiments risquent de devenir le facteur limitant en cas d'oxydation par des bactéries exo-électrogènes anodiques (utilisant les électrodes comme accepteur terminal) aux alentours de l'électrode colonisée.

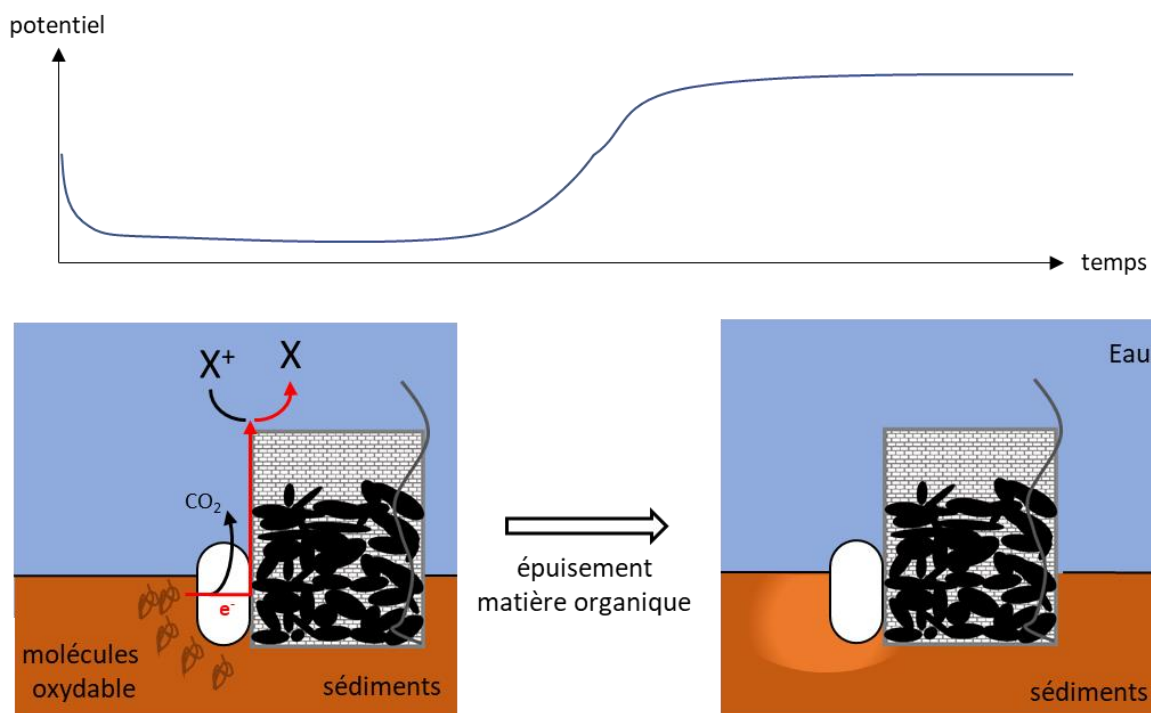


Figure 12 : Représentation schématique de notre hypothèse sur l'évolution du potentiel corrélée avec les métabolismes. Avant épuisement, les électrons provenant de l'oxydation de la matière organique permettent la réduction d'un composé non identifié sur le schéma.

Afin de pouvoir vérifier l'hypothèse décrite Figure 12, il serait pertinent de comparer la valeur de la DCO (Demande Chimique en Oxygène) des sédiments en début et en fin d'incubation afin de vérifier si on assiste bien à un épuisement de la matière organique au cours de l'incubation.

De plus, sera également important d'étudier les communautés bactériennes présentes sur les électrodes et essayer d'identifier des espèces caractérisées comme étant capables de transmettre leurs électrons à une surface solide (bactéries exo-électrogènes anodiques).

Sur ce point, il faut néanmoins conserver à l'esprit qu'après épuisement de la matière organique localement autour de la partie enterrée de l'électrode, la pression de sélection favorisant ces espèces exo-électrogènes disparaît. Or, si notre hypothèse est la bonne, cet épuisement s'observe dès l'augmentation de potentiel soit à environ 2 mois sur les 5 que représente le temps d'incubation total. Cela représenterait donc 3 mois entiers sans bénéficier de cette pression de sélection leur permettant de se développer ou de se maintenir au sein des biofilms colonisant les électrodes non polarisées.

En plus de l'étude des communautés bactériennes composant les biofilms localisés sur et dans les électrodes, l'autre outil d'analyse est l'étude en voltamétrie cyclique de ces électrodes afin d'identifier des possibles catalyses microbiennes de réactions d'oxydation ou de réduction.

3) Etudes en voltamétrie cyclique des électrodes des pilotes 1 à 12

Après ces 158 jours d'incubation, les électrodes ont été étudiées en voltamétrie cyclique. Cette étape a été répartie sur un peu moins d'un mois (27 jours). Cela signifie qu'entre la première électrode du premier pilote (P1E1 pour Pilote n°1, Electrode 1) et la dernière électrode du dernier pilote (P12E5), il y a un mois de différence, portant l'incubation de cette toute dernière électrode à 185 jours.

Cette très large étude ne peut pas être totalement exhaustive car le nombre de voltamétries est bien trop important et montre des profils extrêmement variés.

Avant de se lancer directement dans l'analyse des résultats, un rappel du protocole déjà détaillé dans le matériel et méthode de cette Partie IV (page 178) s'impose. Comme expliqué précédemment, pour des raisons de gain de temps et d'optimisation de l'analyse du courant faradique, chaque électrode est étudiée de deux manières : d'abord l'électrode dans sa globalité à une vitesse de balayage de 1 mV.s^{-1} . Puis une petite quantité de granules de graphite est transférée dans un cylindre en PVC percé de plusieurs trous et dans lequel est ajouté un fil d'acier inoxydable. Ce montage est ensuite étudié en voltamétrie cyclique à une vitesse de balayage de 50 mV.s^{-1} . Ce protocole est ensuite répété une deuxième fois pour chaque électrode. A la différence de l'étude des communautés bactériennes (3 électrodes sur 5 par pilote), toutes les électrodes de chaque pilote sont étudiées de cette façon.

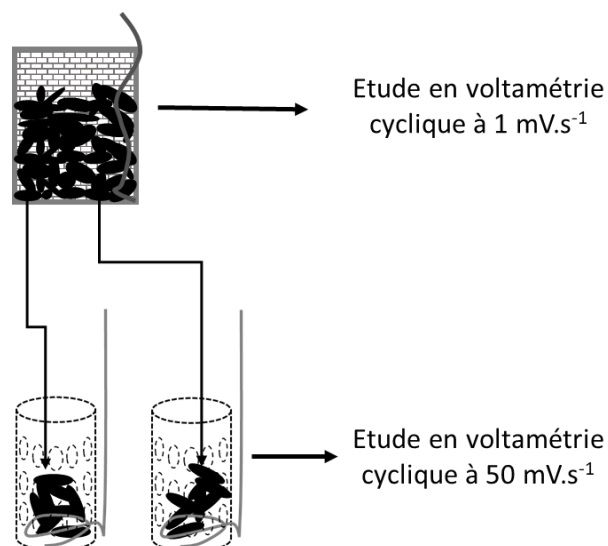


Figure 6 bis : Schéma représentant le protocole d'étude en voltamétrie cyclique des électrodes incubées dans les pilotes 1 à 12. Cette étude est pratiquée entre 158 et 185 jours selon les électrodes incubées dans leur pilote respectif.

Afin que cette étude soit davantage appréhendable, les résultats ne seront pas traités électrode par électrode mais selon le type de résultats obtenus (réduction ou oxydation de tel ou tel composé) puis une synthèse exposant la répartition des réactions présentes ou absentes en fonction des électrodes et des pilotes sera présentée. Le système qui sera utilisé pour désigner les différents échantillons sera le suivant : **PX EX GX** avec P suivi du numéro du pilote (12 pilotes en tout), E suivi du numéro de l'électrode du pilote concerné (5 électrodes par pilote) et G s'il s'agit d'une étude des granules de graphite uniquement avec l'ordre d'étude (2 prélèvements de graphite par électrode, voir figure 6).

a) Etude de la réaction à la présence de nitrates

Le premier axe d'étude ainsi que le plus évident est la réaction des électrodes à l'ajout de nitrate sur voltamétrie cyclique. Pour rappel, lors des additions de nitrates de sodium au sein des pilotes, il était possible de visualiser une réaction claire sur chronoampérométrie dans le cas des électrodes des pilotes 1 à 6 (pilotes 1 à 3 : électrodes polarisées + bio-augmentation et pilotes 4 à 6 : électrodes polarisées sans bio-augmentation) comme montré précédemment (page 184). Pour cela, les études sont toutes faites sous argon dans un tampon phosphate en absence et en présence de nitrate (ajout de 50 mmol.L^{-1} dans le deuxième cas). Lors de l'étude, on a pu observer qu'une partie des électrodes ne montrent aucune réaction à l'ajout de nitrate sur voltamétrie cyclique :

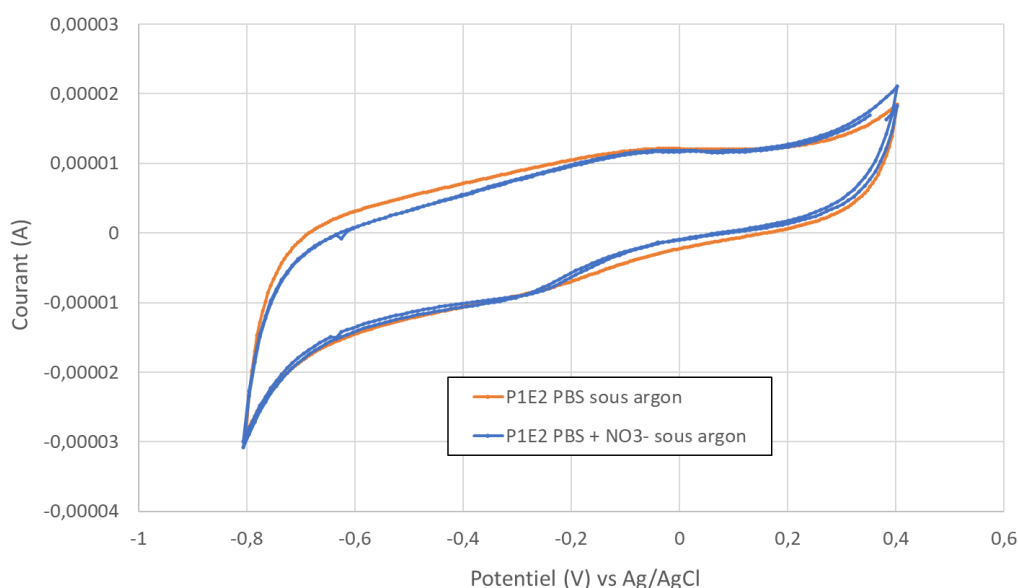


Figure 13 : Exemple de profil d'une électrode entière (P1E2 dans le cas présent) ne montrant aucune réaction à l'ajout de nitrate de sodium. L'étude est faite dans un tampon phosphate (100 mM de K_2HPO_4 et KH_2PO_4) sous argon avec un ajout en nitrate de sodium de 50 mM et une vitesse de balayage de 1 mV.s^{-1} .

On peut par ailleurs noter que dans la très grande majorité des cas (le détail est inclus via la synthèse présentée dans la suite), lorsque l'on constate l'absence de réaction à l'ajout de nitrate durant l'étude sur l'électrode entière, nous n'observons pas non plus de réaction sur voltamétrie cyclique lors de l'étude des granules de graphite seuls de cette même électrode.

Néanmoins, si certaines électrodes ne montrent pas de réaction à l'ajout de nitrate, d'autres électrodes montrent une différence notable avant et après ajout dans leur milieu d'étude. Il est à noter que si ces électrodes ont en commun cette réaction à la présence de nitrate, les profils électrochimiques peuvent malgré tout beaucoup varier d'une électrode à l'autre.

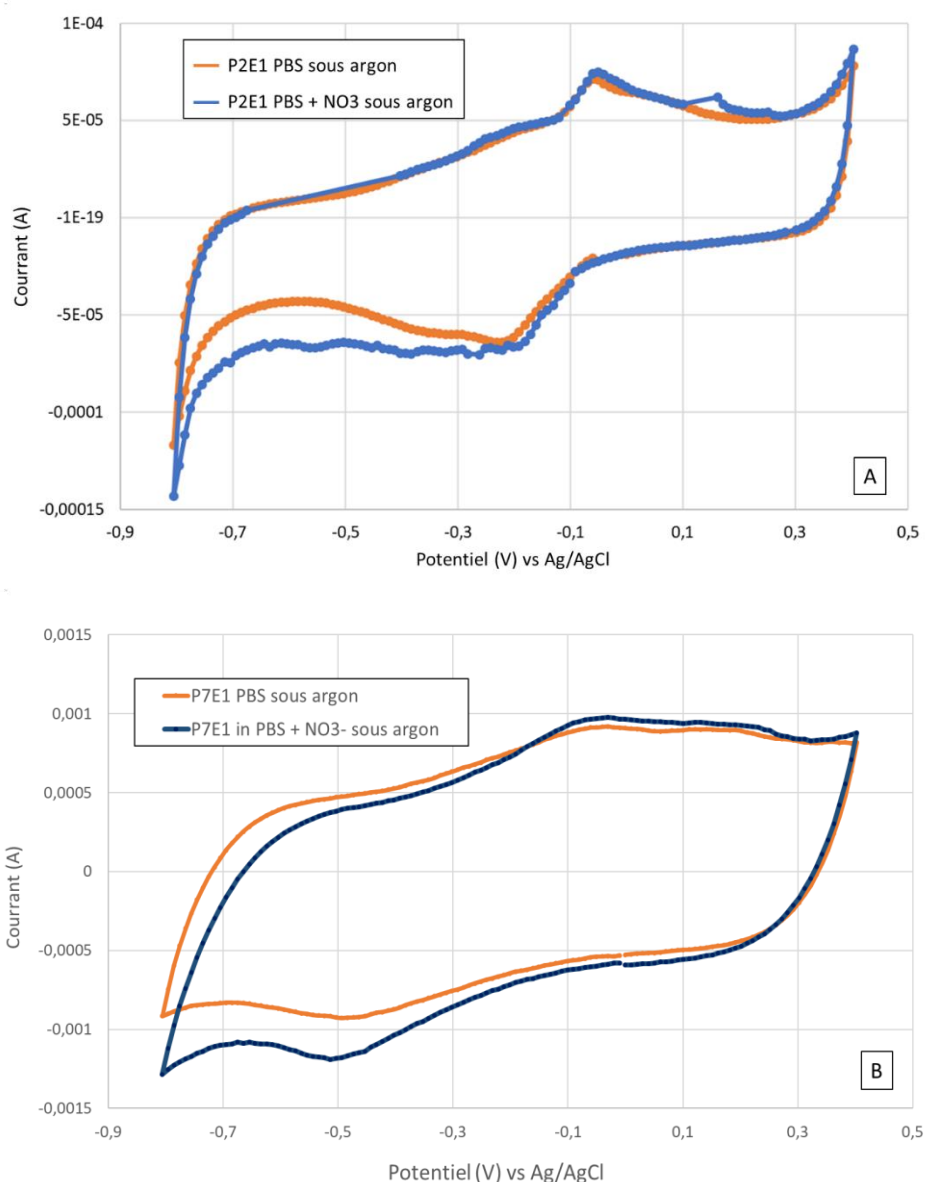


Figure 14 : Deux exemples d'électrodes avec (A) P2E1 et (B) P7E1 montrant toutes les deux une réaction à la présence de nitrates. Les études ont été faites dans un Tampon Phosphate (100 mM de K₂HPO₄ et KH₂PO₄) sous argon avec un ajout en nitrate de sodium de 50 mM et une vitesse de balayage de 1 mV.s⁻¹.

Sur la Figure 14 on peut ainsi observer une réaction électrochimique à l'ajout de nitrate de sodium. Cette réaction se traduit dans les deux cas par l'apparition d'un courant de réduction démarré à environ à $-0,3 \text{ V vs Ag/AgCl}$. Néanmoins, on peut noter que les profils entre ces deux exemples diffèrent. On observe par exemple une réduction à $-0,7 \text{ V vs Ag/AgCl}$ dans le cas de l'électrode P2E1 qui n'est pas visible dans le cas de l'électrode P7E1.

Vient ensuite l'étude des granules de graphite prélevés au sein même des électrodes. Pour rappel, deux études sur des prélèvements de granules sont faites pour chaque électrode. Comme lors des études des électrodes entières, on peut observer sur un certain nombre de prélèvements une réaction à la présence de nitrate de sodium via l'apparition d'un courant de réduction, également visible à partir de $-0,3 \text{ V vs Ag/AgCl}$ comme montré Figure 15.

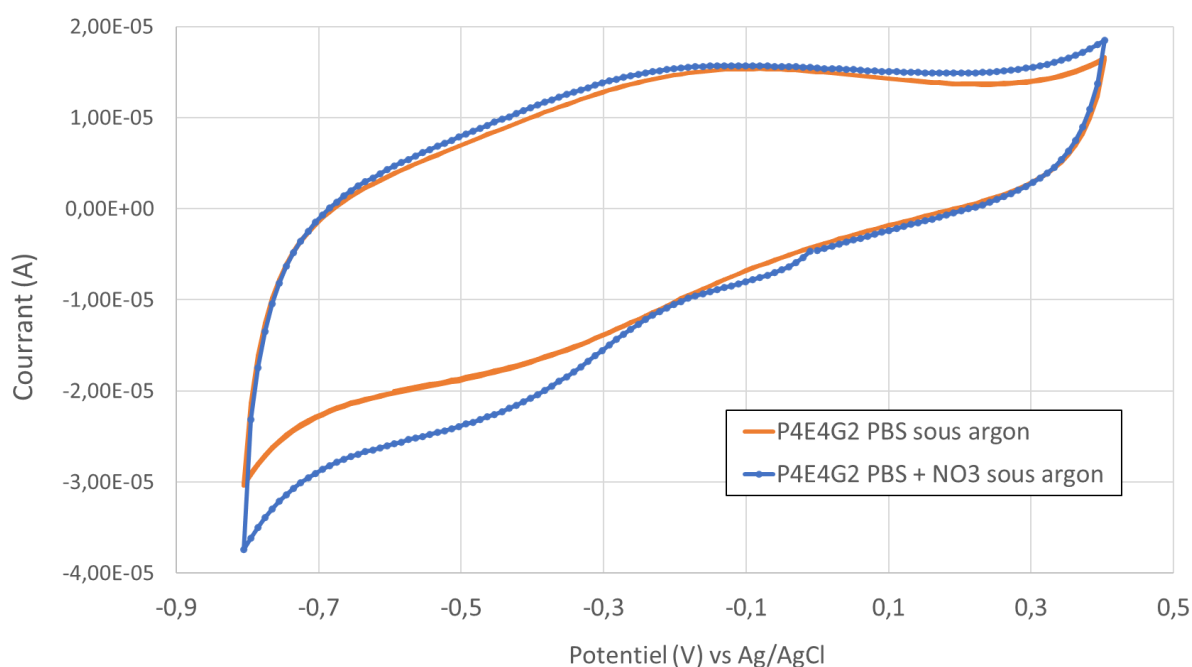


Figure 15 : Exemple de profil réagissant à l'ajout de nitrate de sodium observé lors des études sur des prélèvements de granules de graphite. Ici la voltamétrie cyclique faite sur les granules de graphite provenant de l'électrode 4 du 4^e pilote (deuxième prélèvement des granules). Les études ont été faites dans un Tampon Phosphate (100 mM de K_2HPO_4 et KH_2PO_4) sous argon avec un ajout en nitrate de sodium de 50 mM et une vitesse de balayage de 50 mV.s^{-1} .

Il est à noter que contrairement aux études sur les électrodes entières, les profils observés sont tous relativement similaires à l'exception de l'apparition du courant de réduction lors d'ajout de nitrate de sodium (présent ou absent selon les électrodes). Cela pourrait s'expliquer par la vitesse de balayage plus importante (de 50 mV.s^{-1}) qui a pour effet une augmentation du courant capacitif. On peut par ailleurs noter que l'étude en voltamétrie cyclique sur des granules de

graphite stériles montre un profil de courant capacitif très similaire à celui observé sur les échantillons de granules de graphite provenant d'électrodes incubées.

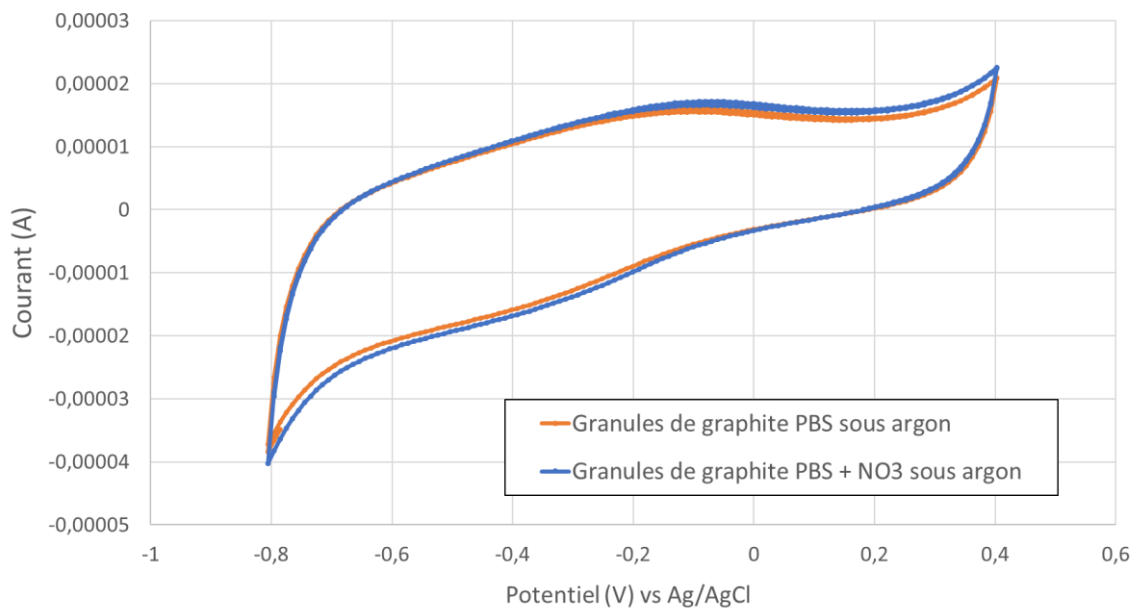


Figure 16 : Voltamétrie cyclique faite sur les granules de graphite abiotiques. Les études ont été faites dans un Tampon Phosphate (100 mM de K_2HPO_4 et KH_2PO_4) sous argon avec un ajout en nitrate de sodium de 50 mM et une vitesse de balayage de 50 mV.s^{-1} .

Ainsi, on peut considérer que le courant observé sur les granules prélevés dans les électrodes incubées et étudiées en voltamétrie cyclique dans un simple tampon phosphate peut s'apparenter à du courant capacitif. Dans le cas de l'échantillon P4E4G2 montré sur la Figure 15 on observe une augmentation du courant de nature faradique d'environ 20 % à partir de -0,3 V lors de l'ajout des nitrates par rapport au courant capacitif de base. Sur la totalité des échantillons répondant à l'ajout de nitrates, cette augmentation peut varier, allant d'environ 35 % (graphe A, Figure 17) à environ 10 % (graphe D, Figure 17).

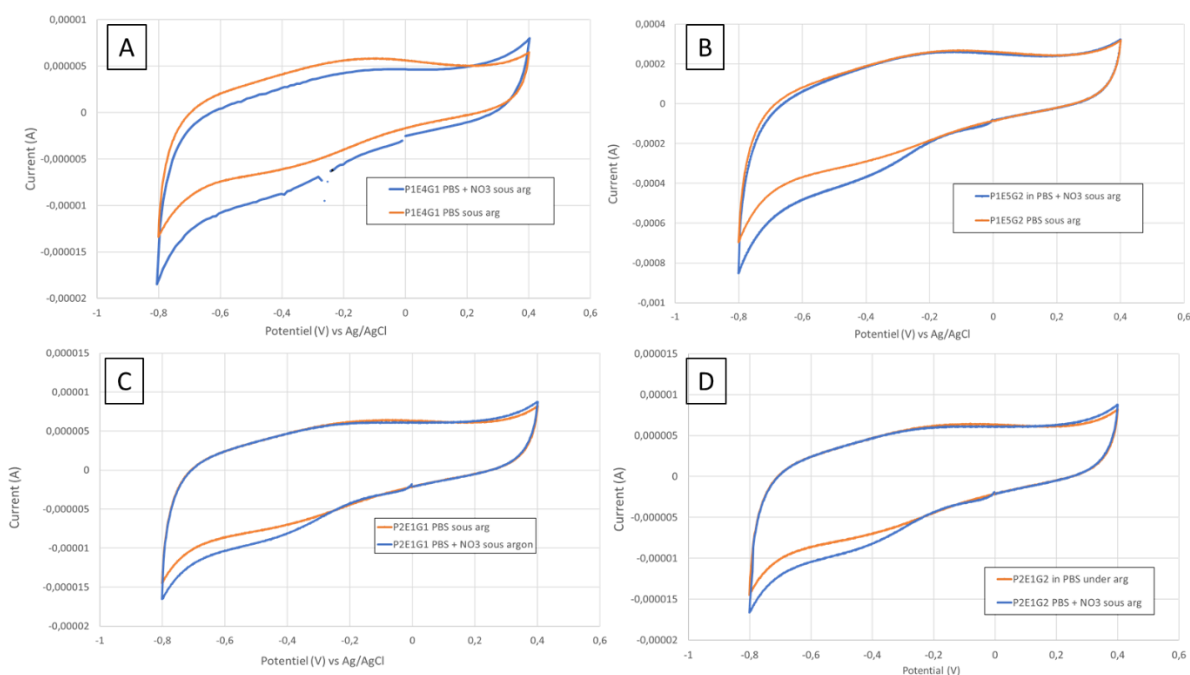


Figure 17 : Quelques exemples de profils réagissant à l'ajout de nitrate de sodium observés lors des études sur des prélèvements de granules de graphite. Les échantillons sont (A) P1E4G1, (B) P1E5G2, (C) P2E1G1 et (D) P2E1G2. Les études ont été faites sous argon dans un Tampon Phosphate (100 mM de K₂HPO₄ et KH₂PO₄, trait orange) sous argon avec un ajout en nitrate de sodium de 50 mM (ligne bleue) avec une vitesse de balayage de 50 mV.s⁻¹.

Le deuxième constat intéressant est que la réaction à l'addition de nitrate de sodium n'est pas toujours, soit totalement absente soit systématiquement observable lors des trois études sur une seule électrode composite (1 étude de l'électrode complète acier inox + granules puis deux études de granules prélevés). En effet, il s'avère que pour une même électrode, un des prélèvements de granules peut montrer une réaction aux nitrates sur voltamétrie sans que ce soit le cas du deuxième. Cette information est importante car cela peut signifier que les potentiels biofilms exo-électrogènes permettant la réduction du nitrate ne sont pas répartis de façon homogène au sein des granules de graphite. Une synthèse globale détaillant les échantillons réagissant aux additions de nitrate est présentée plus loin.

b) Etude de la réaction à la présence d'acétate

Lors des études en voltamétrie cyclique, l'ajout d'acétate a également été testé sur les électrodes. En effet, si l'objectif principal de cette expérience est de développer et d'optimiser l'efficacité de bio-cathodes dénitrifiantes, il faut garder à l'esprit que la réduction bio-électrochimique du nitrate nécessite des électrons. Au sein du projet LowNitrate, les électrons sont censés être fournis aux biofilms localisés au pôle cathodique par une oxydation de la matière organique via d'autres biofilms exo-électrogènes localisés au pôle anodique. Ainsi, une étude des électrodes en présence et absence d'acétate est pertinente.

Après étude, plusieurs électrodes montrent une réaction claire à l'ajout d'acétate (Figure 18). Le profil observé est globalement le même pour toutes les électrodes avec l'apparition ou l'augmentation en termes d'intensité de deux pics, l'un d'oxydation à environ 0 V vs Ag/AgCl et un deuxième pic de réduction cette fois-ci à environ -0,25 V vs Ag/AgCl.

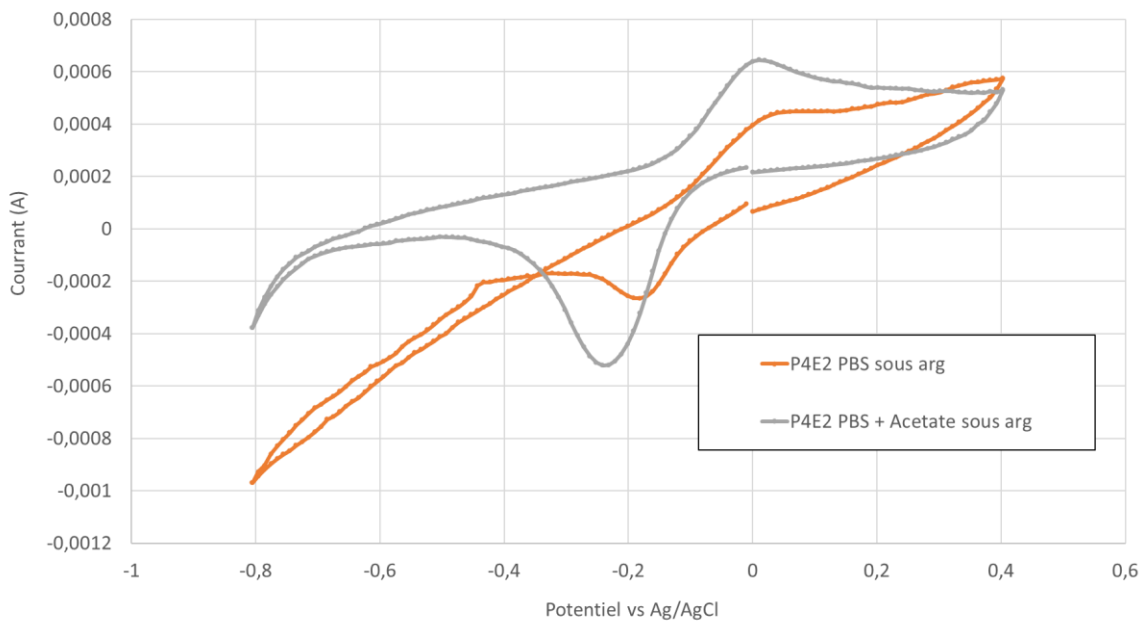


Figure 18 : Exemple de profil réagissant à l'ajout d'acétate de potassium observé lors de l'étude d'une électrode entière (ici la 2^e électrode du 4^e pilote). Les études ont été faites dans un Tampon Phosphate (100 mM de K_2HPO_4 et KH_2PO_4) sous argon avec un ajout de 20 mM d'acétate de potassium et une vitesse de balayage de $1 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

Chose notable, cette réaction à l'ajout d'acétate diffère de celle observée dans la majorité des piles microbiennes. En effet, dans la majorité des cas, on observe, lors de l'étude de la bio-anode en voltamétrie cyclique une biocatalyse lors d'ajouts de matière organique (acétate, glucose, lactate...) avec un début d'oxydation observé à environ -0,4 V vs Ag/AgCl [6, Fig 3].

Dans notre cas, cette biocatalyse n'a été observée sur aucune des électrodes étudiées. En revanche, le profil d'un système réversible constaté ici se rapproche d'un système de type Omc (pour Outer Membrane Cytochrome). En effet, comme expliqué dans l'introduction, les bactéries possédant un métabolisme exo-électrogène anodique possèdent toute une gamme de transporteurs d'électrons qui auront pour rôle d'acheminer les électrons jusqu'à la surface solide à réduire. Or, lorsque l'on étudie ces protéines seules en voltamétrie cyclique, le type de profil observé est un système réversible avec des potentiels pouvant différer selon les protéines comme celui que nous obtenons pour nos électrodes [6, Fig 4]. On peut alors émettre l'hypothèse que l'ajout d'acétate joue sur l'expression ou encore l'activation de transporteurs d'électrons de certaines espèces présentes sous forme de biofilms sur les électrodes.

Autre point important, cette réaction à l'ajout d'acétate n'a été observée que dans le cas d'étude sur des électrodes entières et non sur les prélèvements de granules de graphite seuls (à quelques exceptions près). Cette constatation peut nous laisser penser que la majorité des biofilms réagissant à l'ajout d'acétate sont localisés sur la cage d'acier inoxydable. Cela pourrait s'expliquer par le fait que la matière organique oxydable est présente surtout au sein des sédiments. Or, ces derniers ne pénètrent que difficilement à travers les mailles de la grille d'acier inoxydable qui compose la cage, faisant de cette dernière la seule partie de l'électrode en contact direct avec les sédiments. Une synthèse globale détaillant les échantillons réagissant aux additions d'acétate est présentée plus loin.

c) Etude de la réaction à la présence de nitrite

Lors d'une étude parallèle, une des électrode entière (P11E5) ne réagissant pas à l'ajout de nitrate a été laissée en chronoampérométrie à $-0,5$ V vs Ag/AgCl pendant une nuit dans un Tampon phosphate (100 mM de K_2HPO_4 et KH_2PO_4) enrichi en nitrates (50 mM de $NaNO_3$). Après cette nuit sous polarisation, un courant de réduction extrêmement important a pu être observé sur voltamétrie cyclique. Il s'est avéré après étude que ce courant de réduction très important était lié à la biocatalyse de la réduction des nitrites (NO_2^-) et non des nitrates (NO_3^-).

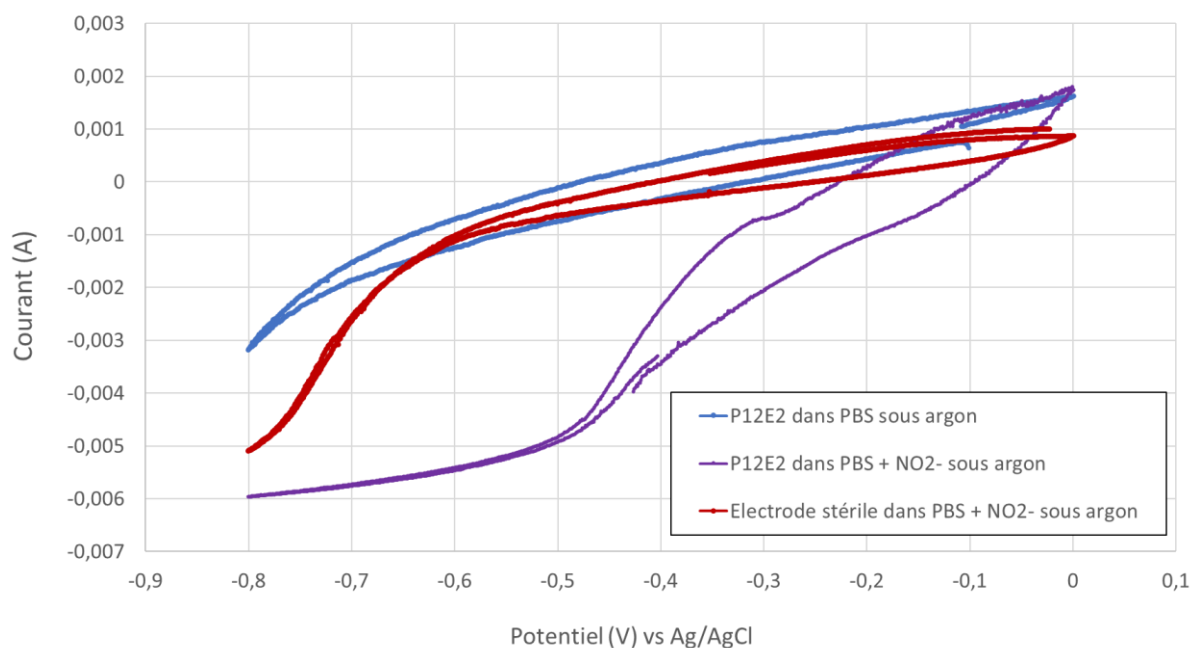


Figure 19 : Profil type de la biocatalyse de la réduction électrochimique des nitrites pour l'électrode 2 du pilote 12. L'électrode est entière P12E2 est comparée à une électrode abiotique. Les études ont été faites dans un Tampon Phosphate (100 mM de K_2HPO_4 et KH_2PO_4) avec saturation à l'argon, un ajout de 5 mM de nitrite de sodium et une vitesse de balayage de 1 mV.s⁻¹.

La théorie la plus probable pour expliquer cela est que durant cette nuit sous polarisation, une certaine quantité de nitrate présent dans le milieu a été réduite en nitrite (par une réduction non exo-électrogène) qui s'est alors accumulé dans le tampon phosphate. Cette accumulation de NO_2^- a permis de visualiser la biocatalyse de sa réduction le jour suivant. L'étude de la réaction à l'ajout de nitrite a ensuite été effectué systématiquement pour les électrodes restantes.

Si, via la Figure 19, on peut observer l'apparition d'une biocatalyse de la réduction des nitrites comparée à une électrode stérile dans les mêmes conditions, il est important de garder à l'esprit que les surfaces des deux électrodes ne sont pas équivalentes car, comme expliqué précédemment, les granules de graphite ne sont pas tous de même taille. Ainsi, le point

important à noter est avant tout l'aspect thermodynamique plutôt que l'aspect cinétique. On peut en effet observer une réduction des nitrites dès $-0,45$ V vs Ag/AgCl dans le cas de l'électrode P12E2 alors qu'à l'inverse, l'électrode abiotique ne montre une réduction des nitrites qui ne semble démarrer qu'à partir de $-0,7$ V vs Ag/AgCl prouvant l'aspect biocatalytique de la réduction des nitrites par des biofilms fixés sur l'électrode P12E2.

Point intéressant, il s'avère que plusieurs électrodes ne montrant pas de réaction à l'ajout de nitrate de sodium sur voltamétrie, montrent en revanche une biocatalyse électrochimique de la réduction des nitrites (exemple : P11E5, P12E4, P12E5). Ce constat peut paraître étonnant car la très grande majorité des espèces capables de réduire le nitrite sont également capables de réduire le nitrate. En effet, la réduction du nitrite étant la deuxième étape de la dénitrification, il est très commun que la respiration du nitrite soit directement couplée à celle du nitrate afin d'optimiser la quantité d'accepteur d'électrons.

Le fait d'observer la réduction exo-électrogène du nitrite sans observer celle du nitrate peut s'expliquer néanmoins : La première observation de cette biocatalyse exo-électrogène de la réduction du nitrite a été faite sur l'électrode P11E5 qui ne montre pas de réaction électrochimique à l'ajout de nitrate. Pourtant, l'accumulation de nitrite après une nuit sous chronoampérométrie à $-0,5$ V dans un milieu enrichi en nitrate prouve qu'une réduction de ces derniers est bien présente mais de nature non exo-électrogène. Cela peut nous indiquer que les espèces bactériennes présentes dans ces électrodes réagissant au nitrite mais non au nitrate sur voltamétrie sont bien capables de réduire les deux mais seulement le nitrite via des voies métaboliques de type exo-électrogènes et donc via captation d'électrons depuis l'électrode.

d) Synthèse des résultats de l'étude électro-chimique des électrodes des pilotes 1 à 12

	Polarisation à -0,5 V vs Ag/AgCl						Pas de polarisation																		
	Bio-augmentation			Pas de Bio-augmentation			Bio-augmentation			Pas de Bio-augmentation															
	Pil 1	Pil 2	Pil 3	Pil 4	Pil 5	Pil 6	Pil 7	Pil 8	Pil 9	Pil 10	Pil 11	Pil 12													
Elect ent 1	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
Graphite 1	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
Graphite 2	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Elect ent 2	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+
Graphite 1	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
Graphite 2	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
Elect ent 3	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-
Graphite 1	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
Graphite 2	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Elect ent 4	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+
Graphite 1	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Graphite 2	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Elect ent 5	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+
Graphite 1	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+
Graphite 2	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-

Table 3 : Synthèse des résultats d'études des réactions des différentes électrodes et des échantillons de graphite aux ajouts de : Bleu : Nitrate de sodium, Rouge : Acétate de potassium et Violet : Nitrite de sodium. Le signe + désigne une réaction claire alors que le signe - indique une absence de réaction.

Le Tableau 3 montre une synthèse de l'absence ou la présence des réactions électro-chimiques à l'ajout de différents composés en fonction des électrodes et des conditions d'incubation. Grâce à cette synthèse, il est possible de tirer plusieurs conclusions importantes :

► En premier lieu, la réduction des nitrates est très majoritairement visible dans le cas des électrodes qui ont été laissées à incuber sous polarisation constante dans les pilotes 1 à 6. Sur les 30 électrodes polarisées à $-0,5 \text{ V vs Ag/AgCl}$, 21 électrodes montrent l'apparition d'un courant de réduction lors de l'ajout de nitrate de sodium pour au moins une des trois études (électrode entière ou un des échantillons de graphite prélevés) avec l'apparition de ce courant de réduction démarrant à environ $-0,3 \text{ V vs Ag/AgCl}$. A l'inverse, pour les électrodes non polarisées présentes dans les pilotes 7 à 12, cette réaction à l'addition de nitrate n'est observable que pour 6 électrodes sur 30. Ce constat est extrêmement important car il met en lumière l'extrême importance de la polarisation imposée pour que la pression de sélection puisse favoriser la dénitrification exo-électrogène. Cela n'est guère étonnant au vu des potentiels d'abandon des électrodes non polarisées relevés tout au long de l'incubation (Figure 11, page 191) qui finissaient par atteindre des valeurs très positive ($+0,5 \text{ V vs ENH}$) en fin d'expérience, soit des valeurs incompatibles thermodynamiquement avec la réduction des nitrates par des organismes exo-électrogènes.

► A l'inverse, on a pu observer, pour ce qui est de la réaction à l'ajout d'acétate de potassium, un nombre d'électrodes plus important dans le cas des pilotes n'incluant pas de polarisation. Cette réaction à l'ajout d'acétate, qui se traduit par l'apparition d'un pic d'oxydation autour de 0 V et de réduction autour de $-0,2 \text{ V vs Ag/AgCl}$, semble bien plus prépondérante en absence de polarisation. Ce constat est globalement cohérent avec les données concernant les biocatalyses anodiques de la matière organique. En effet, le potentiel d'oxydation de la matière organique par des biofilms exo-électrogènes tourne plutôt autour de $-0,4 \text{ V vs Ag/AgCl}$, soit 100 mV au-dessus de celui imposé aux électrodes polarisées ($-0,5 \text{ V vs Ag/AgCl}$) ce qui rend cette oxydation thermodynamiquement défavorable à ce potentiel.

Sur les 30 électrodes laissées sans polarisation, on observe ce phénomène pour 19 électrodes, presque toujours exclusivement lors de l'étude des électrodes entières, semblant indiquer que les biofilms responsables de cette réaction à l'acétate sont localisés au niveau de la cage en acier inoxydable. Pour ce qui est des électrodes polarisées, ce phénomène n'est observé que pour 4 des 30 électrodes polarisées. Ainsi, pour cette réaction particulière, il semble que la polarisation soit au contraire un facteur inhibant le développement des biofilms responsables de cette réaction à l'acétate.

Ces deux constats respectifs nous montrent à quel point l'imposition d'un potentiel via un potentiostat est une variable centrale dans le type de métabolisme exo-électrogène qui va se développer sur l'électrode en question. S'il est avéré que pour un même type de métabolisme exo-électrogène (biocatalyse de l'oxydation de la matière organique notamment), l'application de différents potentiels va influencer sur la thermodynamique ou la cinétique de la réaction en question [7][4][8], notre expérience met en avant qu'elle influe aussi sur les types de métabolismes présents (réaction à l'ajout de nitrate dans un cas à la matière organique dans un autre cas).

Le principal problème qui ressort de cette étude est le fait que dans le cas des pilotes avec des électrodes non polarisées, le principe de l'expérience est facilement transposable à un milieu naturel (par l'utilisation du même montage d'électrode dans une zone humide tel que Rampillon) alors que ce n'est absolument pas le cas pour les électrodes polarisées qui nécessitent l'ajout d'un potentiostat, une contre électrode et une électrode de référence. Ainsi, si nous sommes bien parvenus à développer des bio-cathodes dénitrifiantes (dans cette expérience et dans la précédente décrites dans la Chapitre IV), cela n'aura été possible qu'en imposant un potentiel aux électrodes qui deviendront ainsi des bio-cathodes dénitrifiantes, protocole peu réalisable au sein des écosystèmes naturels à dénitrifier.

► Un autre point notable est l'absence d'effet de l'ajout de culture pure d'*Azoarcus buckelii* sur le type de réactions observé sur voltamétrie cyclique. En effet, si l'on prend le cas de la réaction à l'ajout de nitrate de sodium pour les électrodes polarisées, on obtient 11 électrodes réagissant à cette addition dans les deux cas (pilote 1 à 3 avec bio-augmentation et 4 à 6 sans bio-augmentation). De même, lorsque l'on effectue la même comparaison pour l'ajout d'acétate de potassium pour les pilotes sans polarisation, on observe également 9 électrodes aussi bien lors d'une bio-augmentation (pilotes 7 à 9) qu'en absence de bio-augmentation (pilotes 10 à 12).

L'hypothèse majeure (confirmée par l'étude des communautés bactériennes décrite pas la suite) est que l'espèce n'est pas parvenue à se maintenir au sein des électrodes. En effet, l'un des grands obstacles de la bio-augmentation microbienne est la capacité de la ou des espèces extérieures ajoutées dans le milieu non contrôlé à se maintenir. La capacité d'adaptation des bactéries est infiniment plus performante que celle des animaux et les bactéries déjà présentes naturellement ont déjà optimisé leur métabolisme à l'environnement. Ainsi lors de l'ajout d'une espèce extérieure à l'écosystème, il faut que celle-ci trouve sa place au sein de celui-ci sans qu'elle ne soit adaptée à ce dernier contrairement aux espèces présentes à l'origine. Le moyen

de confirmer ou d'infirmar ces hypothèses est d'étudier les espèces présentes sur les électrodes afin de vérifier la présence ou l'absence d'*Azoarcus buckelii*. Cette étude pourra également potentiellement nous permettre de corréler les métabolismes observés (réactions à aux nitrates et à l'acétate) à des genres bactériens particuliers.

4) Etudes des communautés bactériennes

Les études des communautés bactériennes vont concerner 5 types d'échantillons pour chacun des 12 pilotes. Les types d'échantillons sont les suivants :

Pour les électrodes, 3 d'entre elles sur les 5 ont été envoyées au séquençage après avoir divisées en 3 parties distinctes :

- La partie de l'acier inoxydable supérieure (incubées dans l'eau)
- La partie de l'acier inoxydable inférieure (enterrée dans les sédiments)
- Les granules de graphite

Viennent ensuite les sédiments, tous prélevés à la surface (en contact avec l'eau) et divisés en deux groupes :

- Les sédiments de surface en début d'incubation (prélevés à $t = 1$ jours)
- Les sédiments de surface en fin d'incubation (prélevés à $t = 158$ jours)

En tout, cette étude des communautés bactériennes via amplification puis séquençage du gène de l'ARNr 16S représente plus de 130 échantillons soit une quantité considérable d'informations à traiter et analyser. Afin d'obtenir une vue d'ensemble plus générale, une synthèse plus globale va être faite. Pour cela plusieurs genres bactériens considérés comme d'intérêts vont être sélectionnés et leur abondance relative dans chacun des types d'échantillons en fonction des pilotes sera définie. Cette première exploitation des données permet de visualiser la différence de communautés entre les différents pilotes selon le type d'échantillons.

Une condition appliquée au choix des genres bactériens est la reproductibilité entre électrode. En effet, les genres bactériens ont été choisis car ils montrent un intérêt comparatif mais à conditions qu'ils aient tous une abondance relative d'au moins 5 % pour au moins 2 des 3 électrodes étudiées par pilote, pour un type d'échantillon et pour une condition d'incubation. Par exemple, le genre *Acinetobacter* a pu être étudié car il a montré une abondance relative d'au moins 5 % lors de l'étude des granules de graphite d'au moins 2 des 3 électrodes, et ce pour tous les pilotes de 1 à 3 et de 4 à 6.

Ainsi, les genres bactériens dont l'abondance relative sera analysée sont : *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Geobacter*, *Azoarcus* et *Nitrospira*. Le choix de ces 5 genres bactériens est lié à la différence en termes d'abondance relative considérée comme intéressante selon les conditions d'incubation et le type d'échantillon.

Avant la description et l'interprétation des résultats, une synthèse rapide des caractéristiques de chacun de ces genres s'impose.

a) Description des genres bactériens inclus dans l'étude comparative

- Le genre *Bacillus*

Le genre *Bacillus* est un genre bactérien incluant un très grand nombre d'espèces (plus de 200 espèces documentées) de type Gram + et appartenant au phylum des Firmicutes. Les espèces du genre *Bacillus* sont pour la très large majorité soit aérobies strictes (ne peuvent croître qu'en présence d'oxygène), soit anaérobies facultatives (signifiant qu'elles peuvent croître aussi bien en présence qu'en absence d'oxygène). Par ailleurs, on trouve au sein de ce genre beaucoup d'espèces capables de réduire le nitrate [9][10][11]. A cela s'ajoute le fait que ce genre a également été identifié dans plusieurs études portées sur la bio-électrochimie [12][13][14][15][16][17].

- Le genre *Acinetobacter*

Le genre *Acinetobacter* un genre de type Gram –, appartenant au phylum des Proteobacteria et majoritairement aérobie stricte. Si certaines espèces ont été identifiées comme capables de réduire le nitrate [18], la plupart n'en sont pas capables. D'un point de vue bio-électrochimique, ce genre a été identifié dans plusieurs études sur le sujet laissant penser qu'il inclut plusieurs espèces directement impliquées dans les métabolismes exo-électrogènes [19][20][21][22][16][17], notamment l'électro-réduction de l'oxygène.

- Le genre *Geobacter*

Le genre *Geobacter*, très largement décrit dans les chapitres précédents de cette thèse (notamment le Chapitre I : Introduction) est un genre bactérien très connu au sein de la recherche sur les métabolismes exo-électrogènes. De type Gram – et appartenant au phylum des Proteobacteria, ce genre inclut de nombreuses espèces connues pour leur métabolisme exo-électrogène, notamment anodique.

- Le genre *Nitrospira*

Le genre *Nitrospira* est un genre de type Gram – appartenant au phylum des *Nitrospirae*. Ce genre est très connu pour son rôle dans le cycle de l'azote. Il inclut des espèces dont la tolérance à l'oxygène peut varier d'une espèce à l'autre et dont la grande majorité est capable d'utiliser le nitrate comme accepteur terminal d'électrons [23][24]. Néanmoins la raison pour laquelle

l'étude de ce genre a pris de plus en plus d'importance ces dernières années dans le domaine de la recherche est un type de métabolisme particulier. Ce genre est connu pour son métabolisme dit « Comammox » (pour complete ammonia oxidizing bacteria) qui permet, via plusieurs étapes, de convertir l'ammoniac en nitrate comme montré Figure 21.

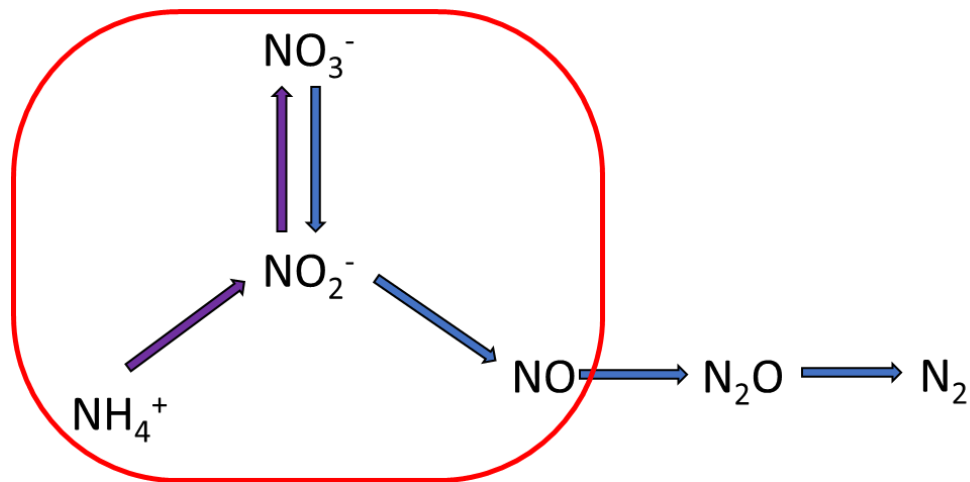


Figure 21 : Synthèse des réactions de la dénitrification (flèches bleues) couplées celles du métabolisme Comammox (flèche violette). Entourées en rouge : les réactions du cycle de l'azote effectuées par la plupart des espèces bactériennes appartenant au genre *Nitrospira*.

Ce type de métabolisme fait des espèces appartenant à ce genre bactérien des espèces à la fois « nitrifiantes » (ou nitrifying species) mais également « dénitrifiantes » (denitrifying species). Ainsi leur métabolisme joue un rôle central dans le cycle de l'azote de certains écosystèmes.

A cela s'ajoute le fait que ce genre (ou au moins la famille auquel il appartient : *Nitrospiraceae*) a également été identifié dans plusieurs études bio-électrochimiques, le plus souvent comme acteur important pour les métabolismes internes des biofilms exo-électrogènes, notamment ceux liés à l'azote. Néanmoins, un métabolisme exo-électrogène propre à l'espèce elle-même n'a jamais été mis en évidence [25][26][27].

Enfin le dernier genre qui sera étudié sera bien évidemment le genre *Azoarcus*. Pour rappel, lors de l'expérience précédente (Chapitre IV), ce genre avait été identifié comme ayant potentiellement un rôle majeur dans la dénitrification exo-électrogène. Son abondance relative importante au sein de nos deux bio-cathodes dénitrifiantes avait été entièrement obtenue par pression de sélection. De par ce constat, une tentative de bio-augmentation a été faite dans ce Chapitre par injection de culture pure d'*Azoarcus buckelii* directement dans les électrodes à $t = 8$ jours pour les pilotes 1 à 3 (électrodes polarisées) et les pilotes 7 à 9 (électrodes non polarisées). Son abondance relative selon les pilotes et les types d'échantillons est également détaillée afin de savoir si son maintien au sein des électrodes a pu se faire.

b) Description des abondances relatives en fonctions des types d'échantillons dans les pilotes 1 à 6

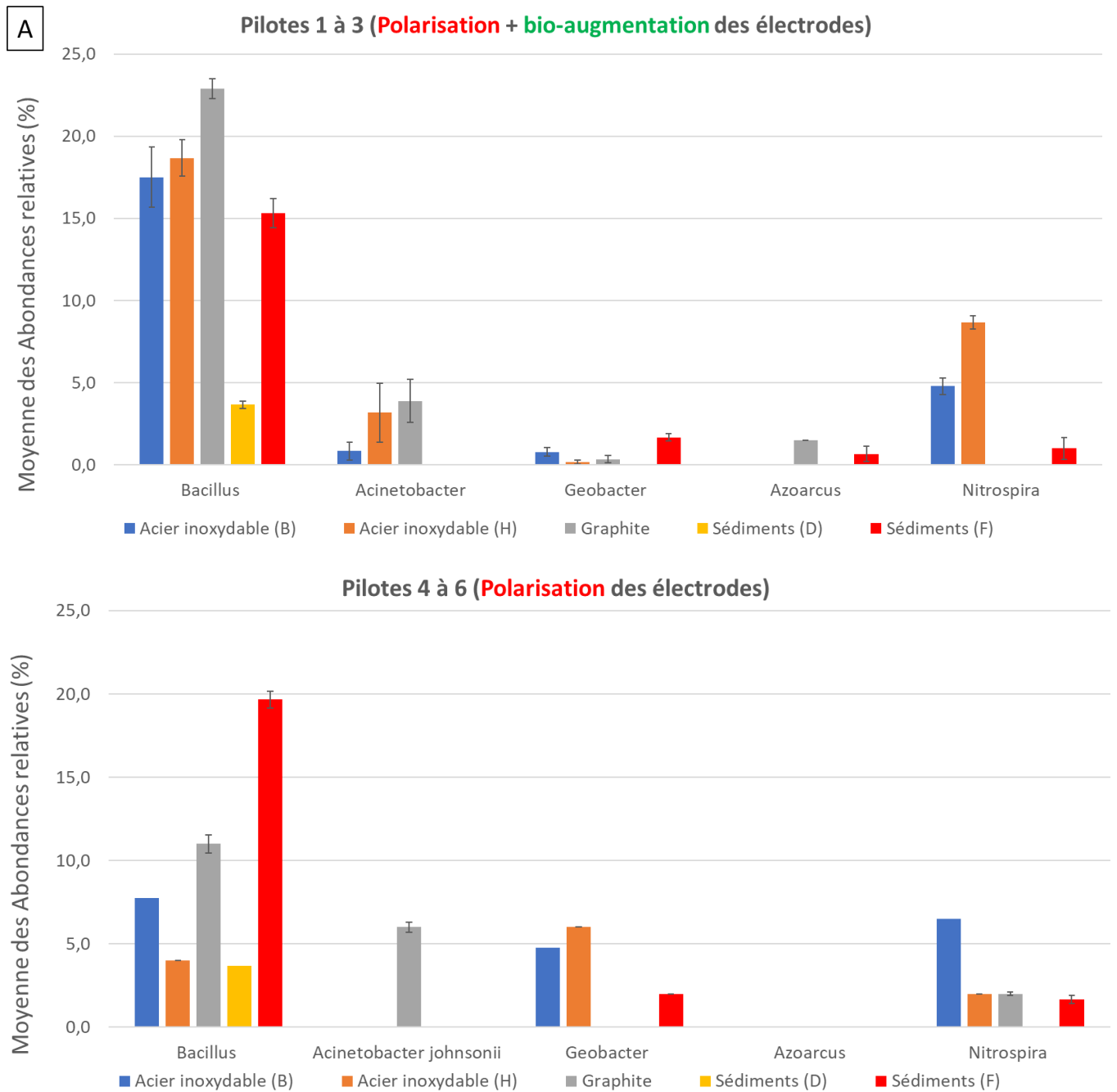


Figure 22 : Moyenne des abondances relatives des genres bactériens *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Geobacter*, *Azoarcus* et *Nitrospira* en fonction des types d'échantillons : Acier inoxydable (Bas, dans les sédiments), Acier inoxydable (Haut, dans l'eau), Graphite, Sédiment (Début d'incubation) et Sédiments (Fin d'incubation) dans les pilotes incluant des électrodes polarisées (pilotes 1 à 6). Pour les échantillons liés aux électrodes, les abondances relatives des 3 électrodes sont fusionnées par type d'échantillons en une seule pour chaque pilote puis la moyenne est calculée entre les trois répliques.

Via la Figure 22, plusieurs observations peuvent être faites :

► En premier lieu, on peut observer que le genre bactérien *Bacillus* possède une abondance relative élevée dans quasiment tous les échantillons en fin d'incubation (les trois échantillons d'électrode et les sédiments en fin d'incubation). Les sédiments en début d'incubation montrent une abondance de ce genre assez faible avec 3,4 % mais en fin d'incubation on atteint entre 15 et 20 % d'abondance dans ces mêmes sédiments. Il est certain que les conditions d'incubation et notamment l'enrichissement en nitrate de sodium mais pas seulement (température, exposition à la lumière et autre) ont généré une pression sélective favorable à ce genre. Or, il s'avère que ce genre inclut énormément d'espèces capables de réduire les nitrates [9]. Il est donc très probable que la présence de nitrates a favorisé le développement de ces espèces au sein des sédiments mais pas seulement. En effet, ce genre est également présent au niveau des électrodes, notamment du graphite et il s'avère que certaines souches de *Bacillus* possèdent bien un métabolisme exo-électrogène [12][13][14][15][16][17]. Néanmoins, le fait que ce genre soit présent avec une abondance relative comparable dans les sédiments en fin d'incubation et dans les électrodes (graphite) peut laisser penser que la présence d'une surface solide oxydable ne soit pas déterminante pour son développement.

► Ensuite vient le genre *Acinetobacter*. Ce genre est présent avec une abondance relative assez faible sur le graphite des électrodes en fin d'incubation (entre 4 et 6 %). Néanmoins, le point intéressant ici est le fait qu'il soit quasiment absent des sédiments aussi bien en début qu'en fin d'incubation. Cette information est importante car cela nous informe que c'est bien la présence de l'électrode qui favorise son développement, à la différence de *Bacillus*. Par ailleurs, il est également admis que ce genre bactérien possède des mécanismes métaboliques exo-électrogènes, notamment cathodique pour la bio-électro-réduction de l'oxygène [19][20][21][22][16][17]. Sa présence uniquement au sein des électrodes pourrait alors indiquer que ces dernières soient au moins en partie devenues des bio-cathodes à oxygène au cours de l'incubation.

► Ensuite vient le cas du genre *Geobacter*. On peut observer, que comme *Acinetobacter*, ce genre n'est présent qu'en très faible quantité dans les sédiments (absent en début d'incubation et environ 2 % en fin). Par contre, on observe une abondance relative d'environ 5 % sur les électrodes (acier inoxydable) mais non à l'intérieur (Graphite) pour les pilotes 4 à 6. Manifestement, l'ajout de culture pure dans le cas des pilotes 1 à 3 a inhibé le développement du genre *Geobacter* sur les électrodes. Par ailleurs, le fait que ce dernier ne se développe que sur les parties en acier inoxydable, et notamment sur la partie enterrée (partie du bas) semble

confirmer le fait que la proximité avec les sédiments est bien déterminante dans son développement. On peut également noter que ce sont uniquement dans ces pilotes 4 à 6 (sans bio-augmentation) que l'on a pu observer une réaction à l'ajout d'acétate lors de l'étude en voltamétrie cyclique (voir Table 3).

► Vient ensuite le cas d'*Azoarcus*. On note que son abondance relative est quasi-nulle aussi bien dans les sédiments que sur et dans l'électrode. Cette constatation indique deux choses : la première est que la culture pure que l'on a ajoutée n'a pas réussi à coloniser l'électrode, du moins jusqu'à la fin de l'incubation. Cela peut être dû au fait que l'espèce *Azoarcus buckelii* n'était pas adaptée aux conditions environnementales des pilotes. Deuxièmement, il s'avère que contrairement à l'étude précédente (Chapitre IV), les conditions au sein des électrodes n'ont pas permis son développement par pression de sélection. En effet, si les électrodes étaient relativement similaires (acier inoxydable et granules de graphite), d'autres facteurs importants ont changé : absence de carbonate, incubation plus longue, température et exposition à la lumière non contrôlée. Cela nous montre à quel point les dynamiques de développement des communautés au sein d'un biofilm sont sensibles aux conditions environnementales.

► Enfin le dernier genre d'intérêt est *Nitrospira*. Comme expliqué en amont, ce genre est très lié au cycle de l'azote. Pour cette raison, sa présence est un bon indicateur d'un biofilm impliqué dans les réactions métaboliques constituant le cycle de l'azote. Or, on observe que ce dernier est présent presque uniquement au niveau des électrodes (notamment les grilles d'acier inoxydable). Cela nous permet de théoriser qu'au sein de l'environnement local que forment les électrodes polarisées il existe bel et bien un métabolisme de l'azote important à l'échelle des biofilms et qu'une partie de ce métabolisme pourrait être de nature exo-électrogène, car favorisé par la présence de l'électrode.

Vient ensuite la comparaison avec les électrodes non polarisées, qui nous permettra d'observer si la polarisation a bien un effet sur la composition des communautés bactériennes.

c) Description des abondances relatives en fonctions des types d'échantillons dans les pilotes 7 à 12

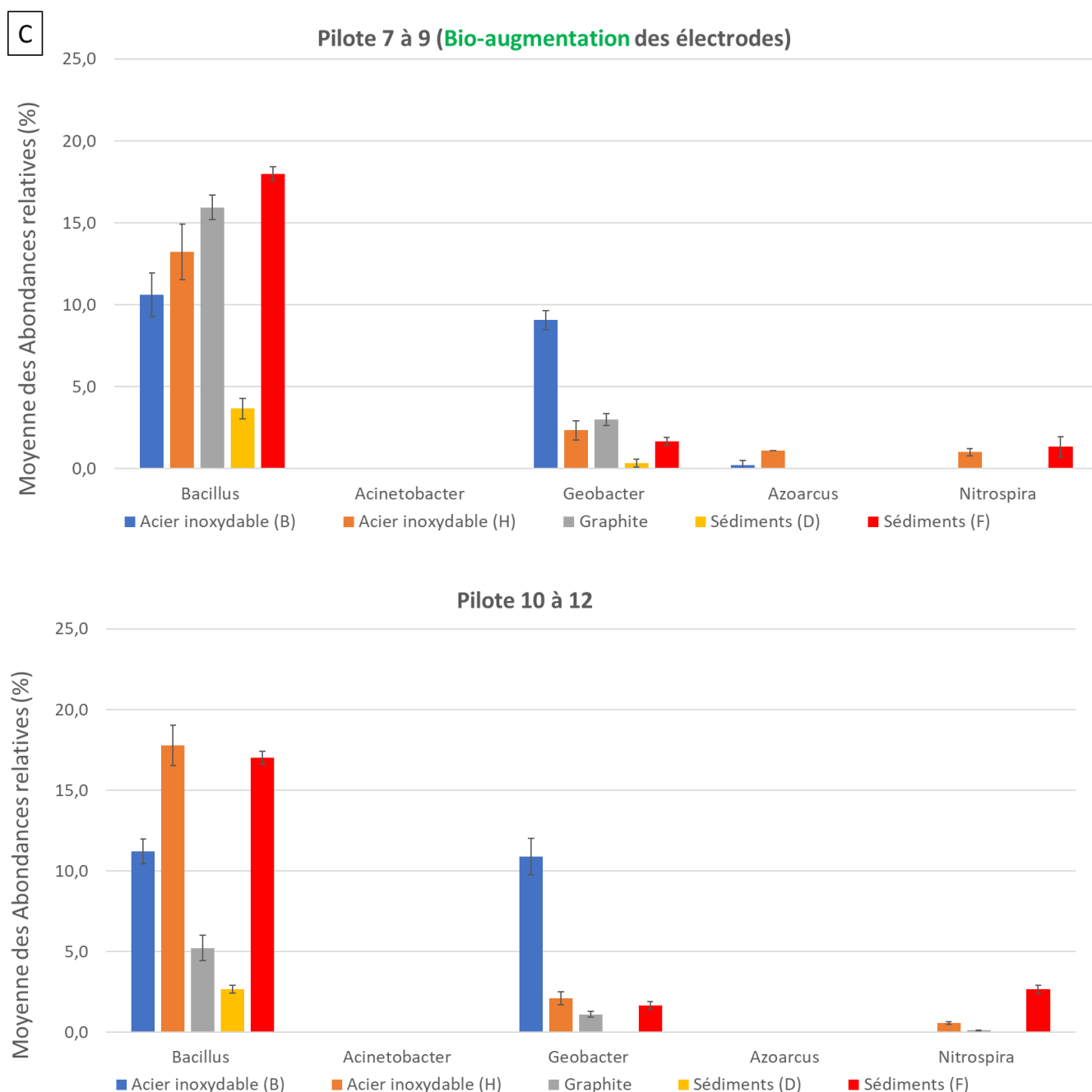


Figure 23 : Moyenne des abondances relatives des genres bactériens *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Geobacter*, *Azoarcus* et *Nitrospira* en fonction des types d'échantillons : Acier inoxydable (Bas), Acier inoxydable (Haut), Graphite, Sédiment (Début d'incubation) et Sédiments (Fin d'incubation) dans les pilotes incluant des électrodes non polarisées (pilotes 7 à 12). Pour les échantillons liés aux électrodes, les abondances relatives des 3 électrodes sont fusionnées par type d'échantillons en une seule pour chaque pilote puis la moyenne est calculée entre les trois répliques.

Via la Figure 23, on peut noter plusieurs points, notamment par comparaison avec ceux observés pour dans le cas des électrodes polarisées :

► En premier lieu, le genre *Acinetobacter*, qu'on retrouvait en abondance relativement faible mais bien localisé au sein des électrodes pour les pilotes avec polarisation est totalement absent ici. Manifestement l'absence de polarisation constante n'a pas permis son développement. Ce point est important car il signifie que ce genre bactérien a également besoin de la polarisation pour se développer et qu'il est donc impliqué de façon directe (par captation d'électrons depuis l'électrode) ou indirect (par électro-assistance) dans le métabolisme exo-électrogène du biofilm global au sein des électrodes polarisées à -0,5 V vs Ag/AgCl dans les pilotes 1 à 6.

► On peut également citer le genre *Nitrospira* qui se trouve dans le même cas. Ce dernier est également totalement absent au sein des électrodes non polarisées en fin d'incubation. Dû au fait que ce genre est un genre pivot dans le cycle de l'azote de par son métabolisme, on peut légitimement penser que les métabolismes reliés au cycle de l'azote sont moins présents lorsque les électrodes ne sont pas polarisées. De fait, si l'absence de polarisation joue sur l'intensité des métabolismes liés au cycle de l'azote, on peut penser que des organismes exo-électrogènes sont directement impliqués dans celui-ci au sein des électrodes polarisées (pilote 1 à 6).

► Pour ce qui est du genre *Geobacter*, on se trouve dans la situation inverse, avec une augmentation notable de son abondance relative sur les électrodes lorsque celles-ci sont laissées sans polarisation. En effet, dans le cas des électrodes sans polarisation, on observe une abondance d'environ 10 % sur l'acier inoxydable enterré avec et sans bio-augmentation contre seulement 5 % dans le cas d'une polarisation et seulement en absence de bio-augmentation. Cette observation nous indique qu'en absence de polarisation, l'électrode a d'avantage tendance à prendre le profil d'une bio-anode et donc à réagir à la présence de matière organique telle que l'acétate comme montré sur la Table 3.

IV) Hypothèses et Conclusion

La synthèse générale de ce chapitre peut se diviser en plusieurs points majeurs :

- La réduction des nitrates pour les pilotes 1 à 6

En premier lieu, nous avons pu observer une réaction notable aux ajouts de nitrate de sodium sur chronoampérométrie dans le cas des pilotes avec électrodes polarisées ensemble à $-0,5$ V vs Ag/AgCl. Cette réaction s'est toujours traduite par une augmentation du courant faradique de réduction bien que les profils divergent. On observe dans un premier cas une augmentation du courant suivi d'une diminution progressive alors que dans le second cas on observe une augmentation du courant de réduction suivi d'une phase de stagnation. D'autre part, l'intégration du courant en fonction du temps entre deux ajouts de nitrate indique que la charge consommée durant ces périodes rentre dans un ordre de grandeur compatible avec la quantité de nitrate ajoutée (mais inférieur en valeur absolue en considérant sa réduction à deux électrons en nitrite).

De plus, lors des études en voltamétrie cyclique, plusieurs électrodes ont montré une réaction à l'ajout de nitrate de sodium via l'apparition d'un courant de réduction à partir de $-0,3$ V vs Ag/AgCl. Ce potentiel observé de réduction des nitrates est par ailleurs cohérent avec ceux décrits dans la littérature [28][29][30]. Il faut également noter que ce courant de réduction reste faible en comparaison du courant capacitif global signifiant probablement que seule une partie des granules et/ou de l'acier inoxydable est colonisé par des biofilm exo-électrogènes.

Enfin, l'étude des communautés a permis de mettre en évidence que certains genres bactériens ne se développent que si les électrodes sont polarisées. Ce constat peut avoir deux explications compatibles entre elles, par ailleurs :

En premier lieu on peut émettre l'hypothèse que c'est la polarisation de l'électrode elle-même qui permet le développement de ces espèces sans que les métabolismes exo-électrogènes ne soient directement impliqués. Pour rappel, le choix d'utiliser des granules de graphite avait été fait car il permet de générer une grande surface d'électrode colonisable par les bactéries mais également car l'oxygène est capable de se réduire électro-chimiquement sur graphite nu au potentiel imposé durant l'incubation ($-0,5$ V vs Ag/AgCl). Ainsi, il est possible que sous polarisation une partie localisée au centre de l'électrode se retrouve en anoxie et que ce soit précisément cette anoxie locale qui permette le développement de certaines espèces absentes au sein des électrodes sans polarisation.

L'autre possibilité est que la polarisation a permis le développement d'organismes spécifiquement exo-électrogènes, notamment cathodiques. Ainsi, une fois ces organismes installés, de nombreux phénomènes d'électro et de bio-assistances en général pourrait être mis en jeu, générant des biofilms à la composition bactériennes distinctes de ceux présents dans les électrodes non polarisées. Ce type de fonctionnement, assimilé à une forme d'électro-assistance, est comparable au phénomène qui a été observée et étudié dans le Chapitre II avec la présence de *Pseudomonas* réduisant l'oxygène, permettant ainsi la bio-électro-réduction du nitrate.

Parmi les genres en question qui ne sont présents que sous polarisation, on peut notamment citer le genre *Nitrospira*, genre bactérien central dans le cycle de l'azote. Comme expliqué précédemment, les espèces de ce genre ont la particularité de posséder un métabolisme dit « Comammox » mais également de pouvoir respirer les nitrates ainsi que les nitrites. Cela signifie que les différents intermédiaires entre le nitrate et le diazote peuvent à la fois servir d'accepteur terminal mais également de source d'électrons selon les situations pour les espèces appartenant à ce genre. Ainsi, sa présence au sein des électrodes polarisées couplée aux observations en voltamétrie cycliques (apparition d'un courant de réduction à -0,3 V vs Ag/AgCl lors d'un ajout en nitrate de sodium) indiquent que nos électrodes polarisées s'apparentent bien à des bio-cathodes dénitrifiantes.

A l'inverse, son absence totale, aussi bien au sein des sédiments en fin d'incubation qu'au sein des électrodes non polarisées confirment que l'application d'un potentiel extérieur est nécessaire pour le développement de biofilms exo-électrogènes dénitrifiants.

Cela démontre que l'application d'un potentiel extérieur est essentielle au développement de bio-cathodes dénitrifiantes pour nos conditions d'incubation.

- Le cas des pilotes 7 à 12 sans polarisation externe des électrodes

Dans le cas des pilotes dont les électrodes ne sont pas polarisées, l'évolution des potentiels d'abandon commence par une diminution vers des potentiels négatifs aux alentours de -0,1 V vs ENH sur les deux premiers mois d'incubation avant de remonter vers des potentiels plus positifs puis vont se stabiliser autour de 0,4 V vs ENH. L'hypothèse posée est que durant les premiers mois d'incubation, les électrodes non polarisées se sont peu à peu développées en bio-anodes avec oxydation de la matière organique par des bactéries exo-électrogènes anodiques. Puis, de par l'épuisement graduel de cette matière organique, l'oxydation devient alors impossible ce qui cause le passage des potentiels négatifs à des potentiels positifs.

L'étude en voltamétrie cyclique de ces électrodes a mis en évidence une réaction électrochimique à la présence d'acétate, avec l'apparition d'un pic d'oxydation à 0 V vs Ag/AgCl et d'un pic de réduction à -0,2 V vs Ag/AgCl. L'un des points importants est que ce profil électrochimique (apparition d'un système réversible) diffère fondamentalement de celui observé dans la plupart des études portant sur les bio-anodes. En effet, ici nous n'observons pas de catalyse de l'oxydation de la matière organique à proprement parler mais plutôt l'apparition d'un système réversible. Une des possibilités est que l'ajout d'acétate déclenche la synthèse, l'excrétion ou l'activation de protéines type cytochrome ou de type navettes électroniques qui peuvent se réduire et s'oxyder sur l'électrode en voltamétrie cyclique.

A noter également que cette réaction à l'ajout d'acétate n'est visible que dans le cas des études sur les électrodes entières et non sur les granules de graphite. Cela signifie que ces biofilms réagissant à l'acétate ont majoritairement colonisé la partie en acier inoxydable plutôt que les granules de graphite, probablement à cause de sa proximité avec la matière organique.

Enfin, l'étude des communautés bactériennes montre une abondance relative du genre bactérien *Geobacter* plus importante en absence de polarisation sur les parties enterrées de l'acier inoxydable.

Reste alors plusieurs questions en suspens : en premier lieu, si le genre *Geobacter* est bien présent avec une abondance relative notable (environ 10 %) sur les cages en acier inoxydable en fin d'incubation, pourquoi aucune biocatalyse de l'oxydation de l'acétate n'est visible lors de l'ajout de ce dernier sur voltamétrie cyclique ?

Pour rappel, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle le passage de l'électrode de potentiels autour de -0,1 V vs ENH à des potentiels positifs autour de 0,4 mV vs ENH après 2 mois

d'incubation était possiblement lié à un épuisement local de la matière organique au niveau de la partie enterrée de l'électrode. Ainsi, sur les 3 mois suivant ce changement de potentiel, les espèces bactériennes ayant colonisé les électrodes se seraient retrouvées sans matière organique à oxyder, ce qui aurait pu causer une inactivation, voire une perte de leur métabolismes exo-électrogènes anodiques. Afin de confirmer cette hypothèse, une étude longue en chronoampérométrie avec ajout régulier d'acétate sur une des électrodes n'ayant pas été utilisées pour l'extraction d'ADN pourrait être effectuée.

La deuxième question qui se pose est l'accepteur final d'électrons. En effet, si la présence du genre *Geobacter* semble indiquer que l'oxydation exo-électrogène de la matière organique est ou a été présente à un moment de l'incubation sur 5 mois, nous devons nous demander quel peut être l'accepteur d'électrons. En effet, notre modèle d'électrode non polarisée, si oxydation exo-électrogène de la matière organique il y a, s'apparente alors à une forme de Snorkel (tuba) bio-électrochimique.

Or, au sein d'un Snorkel, l'électrode sert d'accepteur d'électrons au pôle anodique pour les espèces telles que *Geobacter* mais pas d'accepteur final. L'électrode jouant le rôle de Snorkel sert d'intermédiaire pour la réduction de l'accepteur final au pôle cathodique.

Nous pouvons évoquer deux hypothèses principales sur l'identité de l'accepteur terminal d'électron :

La première et la plus évidente est celle de l'oxygène. En effet, l'électrode étant composée d'acier inoxydable et de graphite, la réduction de l'oxygène est possible sur ces deux matériaux, et ce à des potentiels compatibles avec l'oxydation de la matière organique par des organismes exo-électrogènes (-0,3 V vs ENH) puisque l'oxygène peut se réduire dès 0,2 V vs ENH à pH = 7, notamment sur graphite nu. Ainsi il est parfaitement possible que le potentiel d'abandon observé sur le premier mois (environ -0,1 V vs ENH) soit dû à l'oxydation de la matière organique couplée à une électro-réduction de l'oxygène.

La deuxième possibilité est celle des nitrites. En effet, nous avons pu constater que pour certaines des électrodes non polarisées, on observe une biocatalyse de la réduction des nitrites. Lors des études en voltamétrie cyclique, on peut constater que le courant de réduction augmente vraiment aux alentours de -0,25 V vs Ag/AgCl, soit -0,05 V vs ENH. Là encore, ce potentiel est à la fois compatible thermodynamiquement avec l'oxydation exo-électrogène de la matière organique mais également avec le potentiel d'abandon observé sur les 2 premier mois d'incubation.

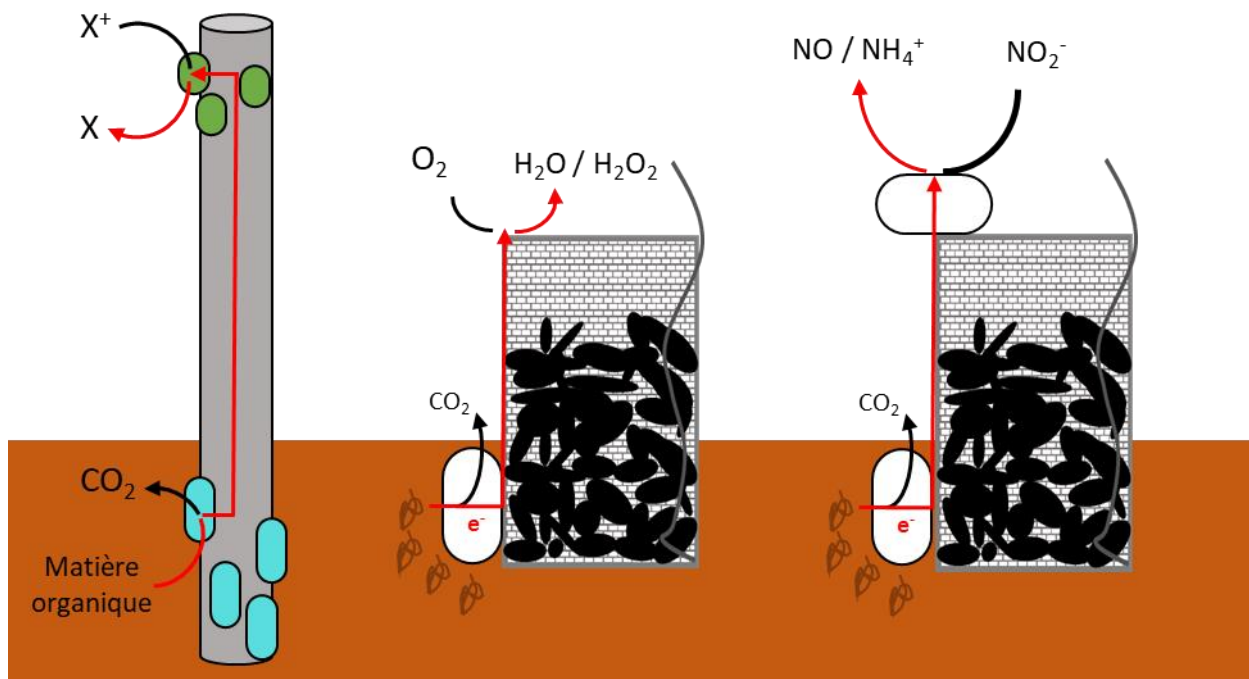


Figure 24 : Accepteurs d'électrons possibles couplés à l'oxydation de la matière organique par des biofilms exo-électrogènes avec comme intermédiaire l'électrode non polarisée prenant une formation type Snorkel électrochimique.

Ainsi, bien la nature de l'accepteur terminal d'électrons reste incertaine, plusieurs alternatives sont possibles et compatibles avec les observations faites en termes d'évolution des potentiels d'abandon, d'études en voltamétrie cyclique et de communautés bactériennes comme expliqué Figure 24.

En conclusion, ce chapitre nous aura permis de démontrer l'importance de la polarisation sur l'évolution des différentes électrodes au cours du temps aussi bien d'un point de vue électrochimique que d'un point de vue microbiologique avec des profils qui varient entre électrodes polarisées et électrodes non polarisées. La présence ou l'absence de certains genres bactériens démontre que les communautés bactériennes s'adaptent en fonction des conditions électrochimiques appliquées à l'électrode ce qui influe notamment sur les types de métabolismes exprimés.

V) Références

- [1] T. Mechichi, E. Stackebrandt, N. Gad'on, G. Fuchs, Phylogenetic and metabolic diversity of bacteria degrading aromatic compounds under denitrifying conditions, and description of *Thauera phenylacetica* sp. nov., *Thauera aminoaromatica* sp. nov., and *Azoarcus buckelii* sp. nov., *Arch. Microbiol.* 178 (2002) 26–35. <https://doi.org/10.1007/s00203-002-0422-6>.
- [2] R. Rabus, L. Wöhlbrand, D. Thies, M. Meyer, B. Reinhold-Hurek, P. Kämpfer, *Aromatoleum* gen. nov., a novel genus accommodating the phylogenetic lineage including *Azoarcus evansii* and related species, and proposal of *Aromatoleum aromaticum* sp. nov., *Aromatoleum petrolei* sp. nov., *Aromatoleum bremense* sp. nov., *Aromatoleum toluolic*, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 69 (2019) 982–997. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003244>.
- [3] J.L. Ram, A.S. Karim, E.D. Sandler, I. Kato, Strategy for microbiome analysis using 16S rRNA gene sequence analysis on the Illumina sequencing platform, *Syst. Biol. Reprod. Med.* 57 (2011) 162–170. <https://doi.org/10.3109/19396368.2011.555598>.
- [4] A.S. Commault, G. Lear, M.A. Packer, R.J. Weld, Influence of anode potentials on selection of *Geobacter* strains in microbial electrolysis cells, *Bioresour. Technol.* 139 (2013) 226–234. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.04.047>.
- [5] C.J.W. Joanne M. Willey, Linda M. Sherwood, 10.3 Redox Reactions: Reactions of Central Importance in Metabolism, in: *Prescott's Microbiol.*, 2019: p. 215.
- [6] C. Leang, X. Qian, T. Mester, D.R. Lovley, Alignment of the c-Type Cytochrome OmcS along Pili of *Geobacter sulfurreducens*, *Appl. Environ. Microbiol.* 76 (2010) 4080–4084. <https://doi.org/10.1128/AEM.00023-10>.
- [7] L. Peng, X.-T. Zhang, J. Yin, S.-Y. Xu, Y. Zhang, D.-T. Xie, Z.-L. Li, *Geobacter sulfurreducens* adapts to low electrode potential for extracellular electron transfer, *Electrochim. Acta.* 191 (2016) 743–749. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2016.01.033>.
- [8] C. Dumas, R. Basseguy, A. Bergel, Electrochemical activity of *Geobacter sulfurreducens* biofilms on stainless steel anodes, *Electrochim. Acta.* 53 (2008) 5235–5241. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2008.02.056>.

- [9] I. Verbaendert, N. Boon, P. De Vos, K. Heylen, Denitrification is a common feature among members of the genus *Bacillus*, *Syst. Appl. Microbiol.* 34 (2011) 385–391. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2011.02.003>.
- [10] K. Heylen, J. Keltjens, Redundancy and modularity in membrane-associated dissimilatory nitrate reduction in *Bacillus*, *Front. Microbiol.* 3 (2012). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00371>.
- [11] T. Yang, Y. Xin, L. Zhang, Z. Gu, Y. Li, Z. Ding, G. Shi, Characterization on the aerobic denitrification process of *Bacillus* strains, *Biomass and Bioenergy.* 140 (2020) 105677. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105677>.
- [12] J. Ren, N. Li, M. Du, Y. Zhang, C. Hao, R. Hu, Study on the effect of synergy effect between the mixed cultures on the power generation of microbial fuel cells, *Bioengineered.* 12 (2021) 844–854. <https://doi.org/10.1080/21655979.2021.1883280>.
- [13] Z.Z. Ismail, A.J. Jaeel, Sustainable Power Generation in Continuous Flow Microbial Fuel Cell Treating Actual Wastewater: Influence of Biocatalyst Type on Electricity Production, *Sci. World J.* 2013 (2013) 1–7. <https://doi.org/10.1155/2013/713515>.
- [14] X. Wu, X. Ren, G. Owens, G. Brunetti, J. Zhou, X. Yong, P. Wei, H. Jia, A Facultative Electroactive Chromium(VI)-Reducing Bacterium Aerobically Isolated From a Biocathode Microbial Fuel Cell, *Front. Microbiol.* 9 (2018). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02883>.
- [15] J. Myung, W. Yang, P.E. Saikaly, B.E. Logan, Copper current collectors reduce long-term fouling of air cathodes in microbial fuel cells, *Environ. Sci. Water Res. Technol.* 4 (2018) 513–519. <https://doi.org/10.1039/C7EW00518K>.
- [16] B. Erable, I. Vandecandelaere, M. Faimali, M.-L. Delia, L. Etcheverry, P. Vandamme, A. Bergel, Marine aerobic biofilm as biocathode catalyst, *Bioelectrochemistry.* 78 (2010) 51–56. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2009.06.006>.
- [17] B.E. Logan, R. Rossi, A. Ragab, P.E. Saikaly, Electroactive microorganisms in bioelectrochemical systems, *Nat. Rev. Microbiol.* 17 (2019) 307–319. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0173-x>.
- [18] A. Villalobo, J.M. Roldan, J. Rivas, J. Cardenas, Assimilatory nitrate reductase from *Acinetobacter calcoaceticus*, *Arch. Microbiol.* 112 (1977) 127–132.

<https://doi.org/10.1007/BF00429324>.

- [19] T. Pepè Sciarria, S. Arioli, G. Gargari, D. Mora, F. Adani, Monitoring microbial communities' dynamics during the start-up of microbial fuel cells by high-throughput screening techniques, *Biotechnol. Reports*. 21 (2019) e00310. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00310>.
- [20] J. Yu, Y. Park, H. Cho, J. Chun, J. Seon, S. Cho, T. Lee, Variations of electron flux and microbial community in air-cathode microbial fuel cells fed with different substrates, *Water Sci. Technol.* 66 (2012) 748–753. <https://doi.org/10.2166/wst.2012.240>.
- [21] S. Poirier, E. Desmond-Le Quéméner, C. Madigou, T. Bouchez, O. Chapleur, Anaerobic digestion of biowaste under extreme ammonia concentration: Identification of key microbial phylotypes, *Bioresour. Technol.* 207 (2016) 92–101. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.01.124>.
- [22] D. Nosek, A. Cydzik-Kwiatkowska, Microbial Structure and Energy Generation in Microbial Fuel Cells Powered with Waste Anaerobic Digestate, *Energies*. 13 (2020) 4712. <https://doi.org/10.3390/en13184712>.
- [23] B. Bayer, M.A. Saito, M.R. McIlvin, S. Lücker, D.M. Moran, T.S. Lankiewicz, C.L. Dupont, A.E. Santoro, Metabolic versatility of the nitrite-oxidizing bacterium *Nitrospira marina* and its proteomic response to oxygen-limited conditions, *ISME J.* 15 (2021) 1025–1039. <https://doi.org/10.1038/s41396-020-00828-3>.
- [24] H. Koch, S. Lücker, M. Albertsen, K. Kitzinger, C. Herbold, E. Spieck, P.H. Nielsen, M. Wagner, H. Daims, Expanded metabolic versatility of ubiquitous nitrite-oxidizing bacteria from the genus *Nitrospira*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112 (2015) 11371–11376. <https://doi.org/10.1073/pnas.1506533112>.
- [25] K.C. Wrighton, B. Viridis, P. Clauwaert, S.T. Read, R.A. Daly, N. Boon, Y. Piceno, G.L. Andersen, J.D. Coates, K. Rabaey, Bacterial community structure corresponds to performance during cathodic nitrate reduction, *ISME J.* 4 (2010) 1443–1455. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.66>.
- [26] Z. Chen, S. Zhang, L. Zhong, Simultaneous sulfide removal, nitrogen removal and electricity generation in a coupled microbial fuel cell system, *Bioresour. Technol.* 291 (2019) 121888. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121888>.

- [27] C. Liao, J. Wu, L. Zhou, T. Li, J. An, Z. Huang, N. Li, X. Wang, Repeated transfer enriches highly active electrotrophic microbial consortia on biocathodes in microbial fuel cells, *Biosens. Bioelectron.* 121 (2018) 118–124. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.08.066>.
- [28] N. Pous, C. Koch, J. Colprim, S. Puig, F. Harnisch, Extracellular electron transfer of biocathodes: Revealing the potentials for nitrate and nitrite reduction of denitrifying microbiomes dominated by *Thiobacillus* sp., *Electrochem. Commun.* 49 (2014) 93–97. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2014.10.011>.
- [29] L. Yu, Y. Yuan, S. Chen, L. Zhuang, S. Zhou, Direct uptake of electrode electrons for autotrophic denitrification by *Thiobacillus denitrificans*, *Electrochem. Commun.* 60 (2015) 126–130. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2015.08.025>.
- [30] N. Pous, A.A. Carmona-Martínez, A. Vilajeliu-Pons, E. Fiset, L. Bañeras, E. Trably, M.D. Balaguer, J. Colprim, N. Bernet, S. Puig, Bidirectional microbial electron transfer: Switching an acetate oxidizing biofilm to nitrate reducing conditions, *Biosens. Bioelectron.* 75 (2016) 352–358. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.08.035>.

VI) Annexes

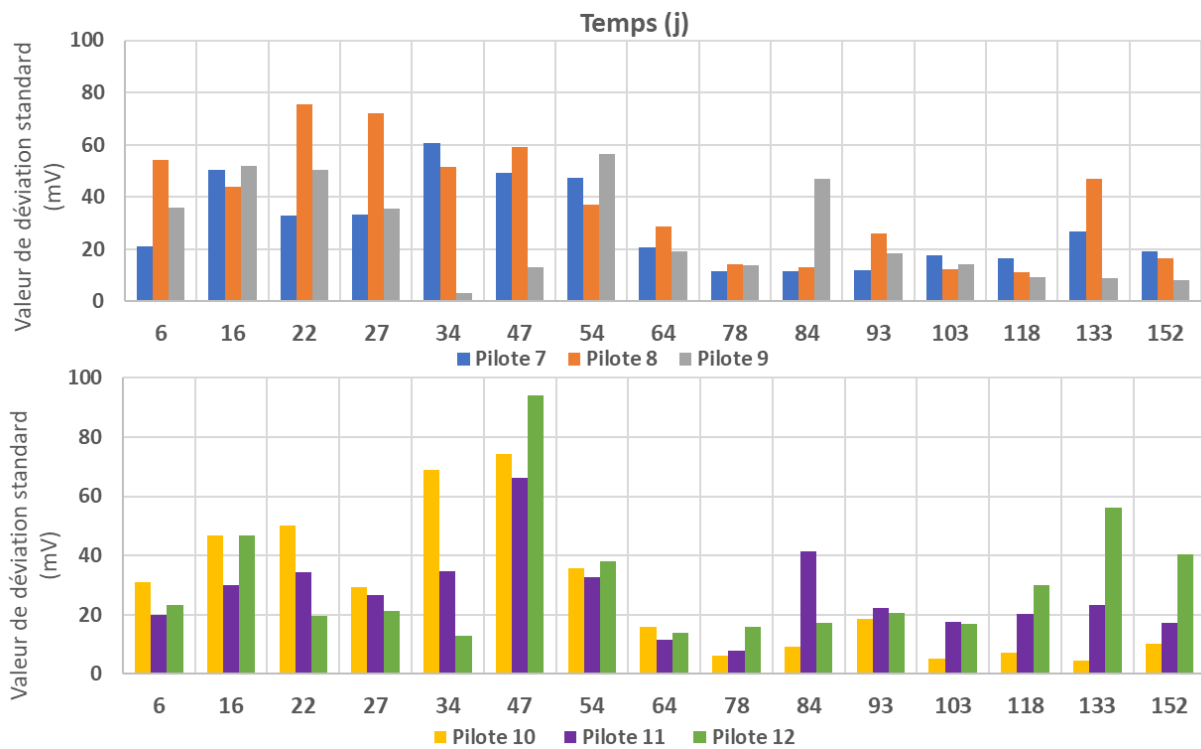


Figure Annexe 1 : Evolution des déviations standard entre les 5 électrodes des pilotes 7 à 9 (avec bio-augmentation) et 10 à 12 (sans bio-augmentation) au cours des 158 jours d'incubation. La déviation standard (ou écart type) est la moyenne quadratique des différences de chaque valeur individuelle par rapport à la moyenne du groupe auquel il appartient.

Conclusion Générale et Perspectives

1) Conclusion générale

Après avoir détaillé la majeure partie des expériences menées, une conclusion générale est nécessaire afin d'offrir une synthèse des résultats et de reprendre point par point les éléments importants. En premier lieu, il est bon de rappeler que cette thèse s'inscrit au sein du projet ANR LowNitrate qui vise le développement d'une électrode en court-circuit permettant une optimisation de la dénitrification au sein des zones humides en exploitant les métabolismes exo-électrogènes. L'un des aspects importants du projet est que le système ne doit nécessiter ni entretien particulier ni apport extérieur quelconque. Pour cela, le modèle privilégié est celui du Snorkel ou Tuba bio-électrochimique. Ce dernier consiste en une électrode en court-circuit avec un pôle anodique où aura lieu l'oxydation de la matière organique des sédiments et un pôle cathodique où aura lieu la réduction des composés azotés, notamment les nitrates, les deux types de réactions étant bio-catalysées par des biofilms.

Via cette thèse nous nous sommes majoritairement concentrés sur le pôle cathodique en tentant de développer des bio-cathodes dénitrifiantes. Notre approche s'est très largement basée sur l'utilisation de la pression naturelle de sélection amenée par la présence d'une surface conductrice permettant l'acheminement d'électrons via polarisation et un enrichissement important en nitrate au sein de nos pilotes. Plusieurs écueils, réussites et points majeurs méritent d'être détaillés :

- Relation entre dénitrification et présence d'oxygène

L'un des points critiques du projet est la problématique de l'oxygène. En effet, ce dernier étant un accepteur terminal d'électrons plus efficace que le nitrate (avec $E'_0 = 0,81$ V pour O_2/H_2O et $E'_0 = 0,42$ V pour NO_3^- à pH = 7 respectivement), la dénitrification est rarement pratiquée par les organismes en présence d'oxygène. Or, la seule zone au sein des bassins de rétention avec une concentration en nitrate significative et une quasi-absence d'oxygène se trouve dans les premiers centimètres des sédiments. L'eau, quant à elle semble être trop fortement chargée en oxygène pour que les nitrates jouent le rôle de l'accepteur terminal d'électrons de la respiration bactérienne.

C'est ce que nous avons pu constater lors de la première expérience incluant la polarisation d'un barreau de graphite avec comme inocula biologique l'eau naturelle de la zone humide de Rampillon. Après un mois passé sous polarisation (à environ -0,3 V vs ENH) dans un milieu

enrichi en nitrates, nous avons pu observer sur l'électrode le développement d'un biofilm composé majoritairement d'espèces appartenant au genre bactérien *Pseudomonas* ainsi qu'une biocatalyse de l'électro-réduction de l'oxygène. Il s'est avéré que la dénitrification était accélérée lorsque l'on polarisait cette bio-cathode à oxygène sans pour autant que cette dernière ne réagisse à l'ajout de nitrate sur voltamétrie cyclique.

Nous avons alors émis l'hypothèse que cette biocatalyse de la réduction de l'oxygène par le biofilm colonisant l'électrode permet, sous polarisation, de générer des conditions anaérobiques locales permettant à une forme de dénitrification non exo-électrogène d'avoir lieu. Dans ce contexte, ce n'est pas l'électrode qui sert de source d'électrons de façon directe pour la réduction du nitrate mais cette dernière permet d'obtenir des conditions locales favorables à une dénitrification n'impliquant pas d'échange d'électrons avec l'électrode.

De même, lors de la deuxième étude, nous avons pu observer une différence d'efficacité de la dénitrification avec une augmentation de près de 100 % au sein de phases aqueuses n'étant pas en contact direct avec l'atmosphère et limitant donc la diffusion de l'oxygène. Cette problématique de la présence d'oxygène est centrale mais le résultat obtenu lors de la première étude a mis en évidence qu'une biocatalyse de la réduction exo-électrogène de l'oxygène permet d'optimiser localement la dénitrification non exo-électrogène, ce qui nous ouvre des perspectives. En effet, il est parfaitement envisageable d'exploiter le système du Snorkel bio-électrochimique mais dans l'optique de générer des conditions anoxiques afin de favoriser la dénitrification, et ce au sein des zones humides elles-mêmes.

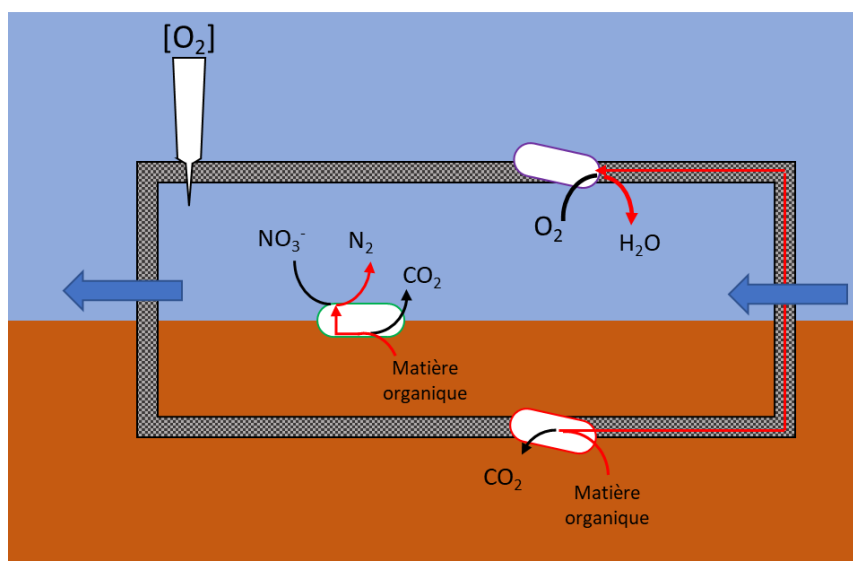


Figure 1 : Exemple d'un montage de type Snorkel perméable à l'eau (type grille d'acier inoxydable) favorisant la dénitrification non exo-électrogène via réduction exo-électrogène de l'oxygène générant des conditions anoxiques locales au sein de la zone humide (intérieur de la cage)

Cette perspective peut s'avérer particulièrement prometteuse car elle permettrait de faire face à un autre obstacle important de ce projet. En effet, pour que le Snorkel soit fonctionnel, il est nécessaire que le potentiel d'oxydation de la matière organique soit inférieur à celui de la réduction, ce qui est délicat dans le cas des nitrates. En effet, la tension de seuil à laquelle la bio-électro-réduction des nitrates par des bactéries est possible est de l'ordre de $-0,1$ V vs ENH, soit moins que l'oxygène. Lors de l'expérience décrite dans le Chapitre II, nous observons une bio-catalyse de la réduction de l'oxygène débutant dès $0,2$ V vs ENH. C'est vraisemblablement l'une des raisons pour laquelle l'application d'un potentiel externe s'est montrée aussi fondamentale lors de notre étude.

- L'importance de la polarisation

Comme décrit dans le Chapitre IV, afin de tenter de palier la problématique de l'oxygène, nous avons décidé de bâtir des électrodes exploitant des granules de graphite que nous avons couplés à une imposition de potentiel via l'utilisation d'un potentiostat. Ce choix s'est montré fructueux car une réponse claire à l'ajout de nitrates a été observée sur chronoampérométrie à $-0,5$ V vs ECS via l'augmentation du courant de réduction pour 2 des 3 pilotes incluant ce type d'électrode. Nous avons par la suite lancée une deuxième expérience décrite dans le Chapitre V en utilisant un modèle d'électrode similaire mais en incluant cette fois-ci une série de pilotes ne contenant des électrodes non polarisées en plus des pilotes contenant des électrodes polarisées.

Lors de l'étude en voltamétrie cyclique, il s'est avéré que les électrodes des pilotes avec polarisation à $-0,5$ V vs Ag/AgCl montrent une réduction des nitrates débutant à environ $-0,3$ V vs Ag/AgCl, soit $-0,1$ V vs ENH. Par ailleurs, cette réduction des nitrates n'est très que rarement présente pour les électrodes incubées sans polarisation. De même, ces électrodes non polarisées ont montré une évolution de leurs potentiels d'abandon vers des valeurs incompatibles avec les réductions bio-électrochimiques du nitrate telles que documentées à l'heure actuelle (autour de $-0,1$ V vs ENH).

Par ailleurs, lors de l'étude des communautés bactériennes, une différence claire de composition a également été constatée entre les électrodes polarisées durant l'incubation et celles incubées sans polarisation. Ce constat montre que pour notre modèle d'électrode la polarisation à un potentiel négatif ($-0,5$ V vs ECS) est essentielle au développement de bio-cathodes dénitrifiantes. En termes de perspective, nous pourrions par ailleurs tenter d'appliquer toute une gamme de potentiels différents afin de déterminer si une réduction bio-électrochimique des

nitrate à un autre potentiel que celui observé (-0,3 V vs ENH) est possible. Ce type d'étude a déjà été effectué mais uniquement au sein de milieu contrôlé avec utilisation de culture pure comme *Thiobacillus* [1] et il serait intéressant de l'appliquer à un milieu incluant un inoculum biologique non contrôlé comme des sédiments.

Néanmoins, pour rappel, le projet LowNitrate admet comme condition l'absence de polarisation externe. Ainsi, pour que l'objectif du projet soit atteint, il sera nécessaire de tester d'autres types d'électrodes tout en faisant varier les conditions environnementales afin de pouvoir se placer à un potentiel d'abandon compatible avec celui observé pour la bio-électro-réduction des nitrates.

- Des communautés bactériennes adaptables à la dénitrification exo-électrogène

Un des points que nous avons pu noter durant cette thèse est la capacité d'adaptation des communautés bactériennes à former des biofilms exo-électrogènes dénitrifiants ayant des compositions variées. En effet pour les expériences décrites dans le Chapitre IV, nous avons polarisé des électrodes pour un temps d'incubation total de 26 jours et sommes parvenus à développer des bio-cathodes dénitrifiantes. Lors de l'étude des communautés bactériennes présentes, nous avons pu identifier le genre *Azoarcus* comme un acteur important de la dénitrification exo-électrogène.

Pourtant lors de l'expérience suivante, des électrodes bâties sur un modèle similaire (cage d'acier inoxydable + granules de graphite) ont été polarisées et incubées dans le même type d'inoculum mais sur un temps beaucoup plus long de 158 jours. Là encore, une réponse claire à l'ajout de nitrate sur chronoampérométrie et voltamétrie cyclique a permis de confirmer que ces électrodes s'apparentaient à des bio-cathodes dénitrifiantes. Néanmoins, lors de l'étude des communautés bactériennes, le genre *Azoarcus* s'est montré totalement absent. La tentative de bio-augmentation des électrodes s'est donc soldée par un échec, chose assez commune avec la bio-augmentation. D'un autre côté, d'autres genres bactériens d'intérêt tel qu'*Acentobacter* ou *Nitrospira* ont été identifiés uniquement au sein des électrodes polarisées alors qu'ils sont totalement absents des sédiments ou des électrodes non polarisées. Ces deux genres présentent un intérêt, soit pour leur nombreuses identifications au sein de systèmes bio-électrochimiques comme *Acentobacter*, soit pour leur rapport privilégié avec les métabolismes du cycle de l'azote comme *Nitrospira*.

Ainsi, il est clair que les différences environnementales entre les deux expériences (ajout ou non de carbonate, température contrôlée ou ambiante, temps d'incubation) ont influencé le développement des communautés bactériennes tout en permettant le développement de bio-

cathodes dénitrifiantes. Cette conclusion montre que la pression de sélection liée à la présence d'une électrode polarisée couplée à un enrichissement en nitrate permet le développement de biofilms exo-électrogènes de composition différentes en fonction des conditions d'incubation.

2) Perspectives

Ces travaux de thèse ont permis de définir plusieurs futurs axes d'étude qui permettraient d'accroître les connaissances actuelles concernant les bio-cathodes dénitrifiantes et leur influence.

- Identification et annotation des gènes impliqués dans les métabolismes exo-électrogènes cathodiques

L'une des raisons pour lesquelles les métabolismes exo-électrogènes cathodiques sont aussi mal compris est l'absence de compréhension des voies métaboliques qui les composent, et notamment les voies de transfert d'électrons.

Une perspective importante liée à ces travaux de thèse est l'utilisation de la métagénomique globale, soit l'amplification et le séquençage de tous les chromosomes bactériens d'un échantillon donné. Une fois les séquences de ces génomes disponibles, il est alors possible d'identifier les gènes d'intérêt via une étude comparative. Dans notre cas, l'organisme le plus prometteur est le genre *Azoarcus* pour sa capacité à réduire le nitrate ainsi que sa représentation importante au sein des études bio-électrochimiques. Ainsi, une fois la séquence du chromosome de l'espèce qui s'est développée au sein des électrodes détaillées au Chapitre IV obtenue, il serait intéressant d'identifier les gènes suspectés d'avoir un rôle dans un potentiel métabolisme exo-électrogène cathodique. Pour cela, une étude comparative peut être faite selon deux grands axes :

- Une étude comparative du chromosome d'*Azoarcus* avec celui des genres *Geobacter* et *Shewanella* afin d'identifier la présence de gènes codant pour des cytochrome membranaires (Omc) ou des e-pili (pil A). Cette comparaison permettrait de mettre en lumière un potentiel métabolisme exo-électrogène par contact direct ou via pili chez *Azoarcus*.

- Une autre étude comparative intéressante serait d'identifier la quantité de gènes codant pour des navettes électroniques pouvant s'oxyder ou se réduire à la surface d'une électrode. Il en existe un grand nombre mais certaines comme les phénazines [2] ou encore le pyocyanin sont relativement bien documentées [3]. Ainsi, estimer le nombre et la nature de ces navettes pouvant être synthétisées par *Azoarcus* permettrait de mettre en lumière un potentiel métabolisme exo-

électrogène par synthèse de navettes électroniques chez *Azoarcus*. Cette étude pourrait être suivie d'une étude en culture pure de cette espèce d'*Azoarcus* lysée au préalable afin de visualiser les potentiels d'oxydo-réduction des navettes en question sur Voltamétrie cyclique.

Ainsi, après comparaison, une identification des gènes en question ainsi que l'étude de leurs promoteurs respectifs permettraient de mieux saisir le fonctionnement du potentiel métabolisme exo-électrogène ainsi que la régulation de son expression chez des genres d'intérêt comme *Azoarcus*.

- Etude de l'influence des bio-cathodes sur les métabolismes exprimés au sein de l'écosystème

Une autre perspective intéressante serait de caractériser l'influence de la présence des électrodes au sein de leur environnement sur les types et l'intensité des métabolismes exprimés. En effet, l'ajout de matériaux synthétiques au sein d'un milieu naturel peut avoir un impact non négligeable sur les micro-organismes naturellement présents au sein de ce milieu.

Ainsi, il est possible de déterminer la prédominance de certains types de métabolismes via une étude en qPCR (ou PCR quantitative). Le principe est d'amplifier certains gènes précis comme par exemple ceux impliqués dans le métabolisme lié au cycle de l'azote à partir d'un échantillon naturel (comme des sédiments) puis de quantifier chacun de ces gènes. Là où l'étude par l'intermédiaire du gène codant pour l'ARNr 16S permet d'identifier des genres, voire des espèces bactériennes précises sans pour autant être sûr des métabolismes présents, la qPCR de certains gènes permet d'identifier les métabolismes présents et leur abondance mais sans les relier à une espèce en particulier.

Ainsi, il serait possible de savoir si l'ajout des électrodes au sein d'un milieu naturel peut ou non influencer sur le type et l'intensité des métabolismes présents, notamment au sein des sédiments. Ce type d'étude a déjà été effectuée via une collaboration avec le Dr. Ulo Mander de l'Université de Tartu [4]. Le sujet de cette étude portait sur la quantité de gènes liés au cycle de l'azote présents dans les sédiments d'un bassin de rétention estonien en présence d'électrodes de tailles et composition différentes. Il serait intéressant de l'appliquer à notre milieu naturel (lac de Rampillon notamment) pour mieux saisir l'influence de nos électrodes sur les écosystèmes naturels.

3) Références

- [1] L. Yu, Y. Yuan, S. Chen, L. Zhuang, S. Zhou, Direct uptake of electrode electrons for autotrophic denitrification by *Thiobacillus denitrificans*, *Electrochem. Commun.* 60 (2015) 126–130. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2015.08.025>.
- [2] E.M. Bosire, L.M. Blank, M.A. Rosenbaum, Strain- and Substrate-Dependent Redox Mediator and Electricity Production by *Pseudomonas aeruginosa*, *Appl. Environ. Microbiol.* 82 (2016) 5026–5038. <https://doi.org/10.1128/AEM.01342-16>.
- [3] J. Oziat, S. Elsen, R.M. Owens, G.G. Malliaras, P. Mailley, Electrochemistry provides a simple way to monitor *Pseudomonas aeruginosa* metabolites, in: 2015 37th Annu. Int. Conf. IEEE Eng. Med. Biol. Soc., IEEE, 2015: pp. 7522–7525. <https://doi.org/10.1109/EMBC.2015.7320132>.
- [4] S.S. Gadegaonkar, T. Philippon, J.M. Rogińska, Ü. Mander, M. Maddison, M. Etienne, F. Barrière, K. Kasak, R. Lust, M. Espenberg, Effect of Cathode Material and Its Size on the Abundance of Nitrogen Removal Functional Genes in Microcosms of Integrated Bioelectrochemical-Wetland Systems, *Soil Syst.* 4 (2020) 47. <https://doi.org/10.3390/soilsystems4030047>.

Résumé

La bio-électrochimie microbienne concerne l'étude des transferts d'électrons entre des micro-organismes vivants comme les bactéries et des électrodes. On distingue au sein de ces transferts d'électrons deux catégories : les transferts de type anodique où l'organisme réduit la surface de l'électrode et les transferts de type cathodique où l'électrode est oxydée par l'organisme. Parmi les biofilms microbiens cathodiques certaines bactéries catalysent la réduction des nitrates. Les travaux de cette thèse se concentrent sur les bio-cathodes à nitrate avec comme objectif la dépollution des milieux naturels. Dans un premier temps, des électrodes sous polarisation constante sont étudiées et montrent une biocatalyse de la réduction de l'oxygène permettant une augmentation indirecte de l'efficacité de la dénitrification. Ce résultat nous mène ensuite à une analyse de l'influence de l'oxygène présent dans l'air ambiant et permet d'observer une augmentation très significative de la dénitrification en cas d'absence de contact avec l'atmosphère. Cela nous amène à concevoir des électrodes avec des granules de graphite qui sont laissées sous polarisation constante sur une période d'un mois. Les résultats montrent une réaction aux nitrates ainsi qu'une dénitrification accrue pour les pilotes incluant ces électrodes. Enfin, une expérience incluant un temps d'incubation plus important met en évidence l'impact de la polarisation constante sur les communautés bactériennes ainsi que sur les types de métabolismes exo-électrogènes exprimés.

Mots clés : *Bio-cathodes à nitrate, Bio-cathodes à oxygène, Métabolismes exo-électrogènes, Etude des communautés bactériennes, Dénitrification*

Abstract :

Microbial bio-electrochemistry is an emerging scientific field that studies electron exchanges between electrodes and living organisms. There are two distinct types of exchange: the anodic transfers where an organism will reduce the electrode surface and cathodic transfers where the surface will be oxidized by the organism whom will be able to reduce other compounds such as nitrate in its environment using the picked-up electrons. This thesis focusses on the study and development of nitrate reducing bio-cathodes with the long-term objective of depolluting natural environments. In a first study, graphite electrodes under constant polarization are analyzed and show a bio-catalyzed oxygen reduction which causes an indirect increase of denitrification. This result leads us to investigate the influence of oxygen present in ambient air on denitrification efficiency and we observe an important increase of denitrification when direct contact with atmosphere is absent. To overcome the oxygen influence, we chose to use graphite granules to build electrodes that will be polarized for one month of incubation. During this incubation, a clear electrochemical response to nitrate and an increase of denitrification efficiency is noted. From there we launched another experiment in order to define the influence of polarization on the microbial communities and the expressed exoelectrogenic metabolisms.

Keywords: *Nitrate bio-cathodes, Oxygen bio-cathodes, exoelectrogenic metabolisms, Bacterial communities study, Denitrification*