



**HAL**  
open science

# Etude du potentiel des systèmes bioélectrochimiques microbiens pour la fixation de l'azote

Axel Rous

► **To cite this version:**

Axel Rous. Etude du potentiel des systèmes bioélectrochimiques microbiens pour la fixation de l'azote. Biologie cellulaire. Montpellier SupAgro, 2023. Français. NNT : 2023NSAM0041 . tel-04537060

**HAL Id: tel-04537060**

**<https://theses.hal.science/tel-04537060>**

Submitted on 8 Apr 2024

**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.

# THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'INSTITUT AGRO MONTPELLIER ET DE L'UNIVERSITE DE MONTPELLIER

En Biotechnologie et Microbiologie

École doctorale GAIA – Biodiversité, Agriculture, Alimentation, Environnement, Terre, Eau  
Spécialité Agroressources, Procédés, Aliments, Bioproduits

Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement – INRAE

## Étude du potentiel des systèmes bioélectrochimiques microbiens pour la fixation de l'azote

Soumise par Axel ROUS

Sous la direction de Nicolas  
BERNET, Eric TRABLY et Elie LE  
QUÉMÉNER

Devant le jury composé de

Wafa ACHOUAK, Directrice de Recherche, CNRS Aix-Marseille

Théodore BOUCHEZ, Ingénieur en chef des Ponts Eaux et Forêts, INRAE Antony

Frédéric BARRIERE, Maître de conférence, Université de Rennes

Antonella MARONE, Chargée de recherche, ENEA, Italie

Nicolas BERNET, Directeur de Recherche, INRAE Narbonne

Eric TRABLY, Directeur de Recherche, INRAE Narbonne

Elie LE QUEMENER, Chargé de Recherche, INRAE Narbonne

Présidente du Jury, Rapportrice

Rapporteur

Examineur

Examinatrice

Directeur de thèse

Co-Directeur de thèse

Invité



UNIVERSITÉ  
DE MONTPELLIER

L'INSTITUT  
agro Montpellier



## Résumé de la thèse

L'azote est un élément indispensable pour le vivant et joue un rôle essentiel pour la croissance des plantes. Dans l'agriculture moderne, cet élément est principalement fourni par le biais d'engrais azotés. La production de ces engrais repose principalement sur la production d'ammoniac ( $\text{NH}_3$ ) grâce au procédé industriel Haber-Bosch. Cependant, c'est un procédé très gourmand en énergie et qui est responsable d'importantes émissions de gaz à effet de serre. Il est donc souhaitable d'avoir recours à des procédés de production d'ammoniac moins coûteux pour l'environnement tels que les procédés électrochimiques de réduction du  $\text{N}_2$ . Ces procédés nécessitent cependant l'utilisation de catalyseurs coûteux, non renouvelables et peu efficaces pour la réduction de  $\text{N}_2$  dans des conditions ambiantes. Or, dans la nature, cette même réaction est catalysée par des bactéries dites diazotrophes qui sont responsables du phénomène de fixation biologique de  $\text{N}_2$  à température ambiante. Dans mon travail de thèse, je me suis intéressé à la possibilité d'interfacer ces bactéries fixatrices d'azote avec des électrodes pour la production d'une forme d'azote utilisable ( $\text{NH}_4^+$ ).

J'ai d'abord étudié des cultures de *Geobacter sulfurreducens* sur des anodes en présence ou absence d'azote assimilable. Ces premières expériences ont permis de mettre en évidence que les densités de courant obtenues pour ces bioanodes n'étaient pas altérées en absence d'azote assimilable. La croissance de *G. sulfurreducens* était en revanche moins importante dans cette condition. La production de  $\text{NH}_4^+$  observée était très faible et probablement liée à de la lyse cellulaire. Dans ces premières expériences, la fixation du  $\text{N}_2$  n'a pas pu être démontrée de manière directe, mais elle explique probablement la croissance microbienne observée avec  $\text{N}_2$  comme seule source d'azote sur les bioanodes.

J'ai ensuite étudié et comparé les performances de fixation de  $\text{N}_2$  dans des enrichissements sur biocathodes et dans des enrichissements en bouteilles avec  $\text{H}_2 + \text{CO}_2$ . J'ai déployé en parallèle la méthode de mesure de l'activité réductrice d'acétylène (ARA) pour avoir une mesure directe de la fixation de l'azote. Ces expériences m'ont permis de démontrer que les systèmes biocathodiques étaient plus efficaces que les cultures en bouteilles sur  $\text{H}_2 + \text{CO}_2$  pour le développement d'une communauté complexe fixatrice de  $\text{N}_2$ . J'ai également montré que le  $\text{N}_2$  fixé était principalement retrouvé dans la biomasse microbienne plutôt que sous forme des ions ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ). Les bactéries retrouvées dans les communautés m'ont permis de faire des hypothèses sur les interactions qui favorisent la fixation de  $\text{N}_2$  et sur la nature de celles-ci. J'ai notamment fait l'hypothèse que la présence d'une bactérie fixatrice de  $\text{CO}_2$  produisant de l'acétate sur les cathodes était un élément clé des communautés fixatrices de  $\text{N}_2$  sur mes biocathodes.

Dans un troisième temps, j'ai réalisé des travaux en souches pures pour tester les hypothèses formulées sur les interactions microbiennes au sein des communautés cathodiques fixatrices de  $N_2$ . Aucune croissance n'a pu être observée en culture pure sur  $H_2 + CO_2$ , mais une croissance a été observée en coculture de deux souches (*Desulforamulus ruminis* et *Azospirillum lipoferum*). Par ailleurs, *A. lipoferum* et *Comamonas testosteroni* ont été capables de croître en utilisant l'acétate comme substrat. Cependant, des contaminations lors de ces expériences m'empêchent de conclure sur les interactions supposées.

Ces résultats, permettent d'ores et déjà d'évaluer l'intérêt de développer les systèmes électrochimiques microbiens pour la fixation de l'azote. Ces travaux m'ont permis de mettre en évidence que la production de biomasse diazotrophe plutôt que la production de  $NH_4^+$ , pourrait être la forme d'engrais à produire de façon privilégiée dans ces systèmes. En revanche, les vitesses et demandes en énergie de la biomasse produite restent à améliorer.

## Thesis summary

Nitrogen is an essential element for life and plays a crucial role in plant growth. In modern agriculture, this element is primarily supplied through nitrogen fertilizers. The production of these fertilizers relies mainly on the industrial Haber-Bosch process, which produces ammonia ( $\text{NH}_3$ ). However, this process is very energy-intensive and is responsible for significant greenhouse gas emissions. Therefore, it is desirable to explore more environmentally-friendly methods for ammonia production, such as electrochemical processes for  $\text{N}_2$  reduction. These processes, however, require the use of expensive, non-renewable, and inefficient catalysts for  $\text{N}_2$  reduction under ambient conditions. In nature, the same reaction is catalyzed by diazotrophic bacteria, responsible for the phenomenon of biological nitrogen fixation at room temperature. In my doctoral research, I focused on the possibility of interfacing these nitrogen-fixing bacteria with electrodes for the production of a usable form of nitrogen ( $\text{NH}_4^+$ ). I first studied cultures of *Geobacter sulfurreducens* on anodes in the presence or absence of assimilable nitrogen. These initial experiments revealed that the current densities obtained on these bioanodes were not affected in the absence of assimilable nitrogen. However, the growth of *G. sulfurreducens* was less significant in this condition. The observed production of  $\text{NH}_4^+$  was very low and likely related to cell lysis. In these initial experiments, direct  $\text{N}_2$  fixation could not be demonstrated, but it probably explains the microbial growth observed when  $\text{N}_2$  was the sole source of nitrogen on the bioanodes.

I then studied and compared the nitrogen fixation performance in enrichments on biocathodes and in bottle enrichments with  $\text{H}_2 + \text{CO}_2$ . I simultaneously employed the acetylene reduction assay (ARA) method to directly measure nitrogen fixation. These experiments demonstrated that the biocathodic systems were more effective than bottle cultures on  $\text{H}_2 + \text{CO}_2$  for the development of a complex  $\text{N}_2$ -fixing community. I also showed that the fixed  $\text{N}_2$  was mainly found in microbial biomass rather than in the form of ammonium ions ( $\text{NH}_4^+$ ). The bacteria found in these communities allowed me to make hypotheses about the interactions that promote  $\text{N}_2$  fixation and their nature. I hypothesized that the presence of a  $\text{CO}_2$ -fixing bacterium producing acetate on the cathodes was a key element in  $\text{N}_2$ -fixing communities on my biocathodes.

In a third phase, I conducted work with pure strains to test the hypotheses formulated regarding microbial interactions within nitrogen-fixing cathodic communities. No growth was observed in pure culture on  $\text{H}_2 + \text{CO}_2$ , but growth was observed in a coculture of two strains (*Desulforamulus ruminis* and *A. lipoferum*). Additionally, *Azospirillum lipoferum* and *Comamonas testosteroni* were able to grow using acetate as a substrate. However,

contamination during these experiments prevents me from drawing conclusive results about the supposed interactions.

These results already highlight the potential of developing microbial electrochemical systems for nitrogen fixation. My work has shown that the production of diazotrophic biomass, rather than  $\text{NH}_4^+$  production, could be the preferred form of fertilizer to produce in these systems. However, the rates and energy requirements of the produced biomass need improvement.

*« La science consiste à passer d'un étonnement à un autre. »*

*Aristote*





## Remerciements

Je tiens à commencer par remercier Wafa Achouak, Théodore Bouchez, Frédéric Barrière et Antonella Marone pour avoir accepté d'examiner mes travaux de thèse. Je tiens également à remercier Laurence Soussan pour son rôle de référente au sein de mon comité de suivi.

Je tiens à remercier chaleureusement l'ensemble de mes encadrants, à savoir Nicolas Bernet, Eric Trably et Elie Le Quéméner. Merci pour la confiance que vous m'avez accordée pour la réalisation de mon stage de fin d'étude et de ces travaux de thèse qui s'intéressent à des problématiques qui me tiennent à cœur.

Un grand merci également à toutes les personnes qui ont pu m'assister de près ou de loin dans la réalisation de ces travaux et en particulier les personnes avec lesquelles j'ai eu la chance de partager mon bureau, Marilia, Pamela, Chari et Vincent. Un remerciement tout particulier à Fernanda Perez Bernal qui m'a accompagné durant toute la durée du stage et de la thèse. J'ai adoré pouvoir discuter avec toi de nos différentes problématiques et voir comment on pouvait s'aider mutuellement. Un grand merci aussi à Gaëlle Santa-Catalina pour sa bonne humeur et les analyses microbiologiques qui ont été réalisés tout au long de mes travaux. Un grand merci aussi à Philippe Sousbie pour m'avoir aidé lors de la prise en charge de certains appareils. Également un grand merci à Sophie Cuisette pour son investissement et les moments d'entraide devant les GC. Et enfin un très grand merci à Bastien Morvant pour sa disponibilité et son implication au sein du laboratoire et en dehors. Un grand merci à toutes les personnes que j'ai pu côtoyer au LBE.

Un immense merci également aux jeunes chercheurs qui ont partagé avec moi ces trois années. David pour les moments d'encouragements entre doctorant et les soirées partagées. Margot M pour les moments de rire quand les choses n'alliaient pas avec nos belles GC. Ali pour son implication et sa bonne humeur communicative et à tous les autres avec qui j'ai eu la chance d'échanger Margaud, Tatiana, Korentin, Camille, Pierre, Nicolas, Kevin, Clément, Néméhie, Marie, Lucie, merci pour tout.

Enfin, je tiens à remercier mes meilleurs amis, Julian, Nizar, Arthur, Elias, Clémentine, Rose, Audrey, Brandon, Caroline sur qui je pouvais toujours compter malgré l'éloignement. À ceux avec qui j'ai passé les meilleurs moments, merci pour votre soutien.

Enfin, un immense merci à mes parents qui m'ont toujours donné leur force, leur amour et leurs encouragements au cours de ces travaux de thèse. Et bien sûr un immense merci à toi Margot qui a partagé ces trois années (et quelques mois) avec moi, dans les bons comme les

mauvais moments. Merci de m'avoir apporté tout l'amour que tu avais à m'offrir. A tout ceux qui ont contribué, d'une manière ou d'une autre, à cette thèse, je vous en suis profondément reconnaissant. Ce travail n'aurait pas été possible sans votre précieuse aide.

# Table des matières

<b>Résumé de la thèse</b>	<b>ii</b>
<b>Thesis summary</b>	<b>iv</b>
<b>Remerciements</b>	<b>viii</b>
<b>Table des matières</b>	<b>x</b>
<b>Liste des figures</b>	<b>xiii</b>
<b>Liste des tableaux</b>	<b>xxiii</b>
<b>Liste des abréviations</b>	<b>xxiv</b>
<b>Publications et communications scientifiques</b>	<b>xxvi</b>
<b>Introduction</b>	<b>1</b>
1. L'azote, besoin et mise à disposition du vivant	1
2. Utilisation des engrais chimique	2
3. Verdir les engrais (production et utilisation)	2
<b>Chapitre 1 - Synthèse bibliographique : L'azote et sa fixation en système bioélectrochimique microbien</b>	<b>3</b>
1. Fixation biologique de l'azote	3
1.1. Cycle de l'azote	3
1.2. Mécanismes de fixation de N <sub>2</sub> : les nitrogénases	5
1.3. Ecologie microbienne de la fixation de l'azote	9
2. Engrais azotés	16
2.1. Production industrielle d'engrais chimique	17
2.2. Engrais organiques	20
2.3. Production de bactéries pour les bioengrais ou autre produit de la fixation biologique de N <sub>2</sub>	23
3. Les systèmes de bioélectrochimie microbiens pour la fixation biologique de N <sub>2</sub> et la croissance de biomasse	25
3.1. Avantages des systèmes de bioélectrochimie microbien pour la fixation de N <sub>2</sub>	25
3.2. Bactéries électroactives et transfert d'électrons avec une interface solide	27
3.3. Exemple des systèmes bioélectrochimique microbiens pour la fixation de N <sub>2</sub> en culture de souche pure	31
3.4. En communauté microbienne mixte	32
<b>Présentation du manuscrit</b>	<b>34</b>
<b>Chapitre 2 - Matériel et méthodes</b>	<b>35</b>
1. Dispositifs électrochimiques microbiens	35
1.1. Méthodes électrochimiques	35
1.2. Dispositif dédié à l'étude des bioanodes	36
1.3. Dispositif dédié à l'étude des enrichissements en compartiment cathodique	38

1.4.	Dispositif dédié à l'étude des souches pures en compartiment cathodique	39
1.5.	Procédure de stérilisation	41
<b>2.</b>	<b>Cultures bactériennes de bioanodes et biocathodes pour la fixation de N<sub>2</sub></b>	<b>41</b>
2.1.	Bioanode avec <i>Geobacter sulfurreducens</i>	41
2.2.	Procédure de culture des bioanodes à <i>G. sulfurreducens</i>	42
2.3.	Enrichissements de bactéries autotrophes diazotrophes	44
2.4.	Souches pures pour la reconstruction d'une biocathode fixant N <sub>2</sub>	49
<b>3.</b>	<b>Méthodes d'analyse</b>	<b>55</b>
3.1.	Analyses chimiques des milieux	55
3.2.	Analyse des gaz	57
3.3.	Séquençage des communautés et quantification des bactéries	59
<b>4.</b>	<b>Analyse des données</b>	<b>62</b>
4.1.	Calcul du rendement Faradique	62
4.2.	Calcul du nombre de bactéries d'après la quantification du gène ADNr 16S par qPCR	65
4.3.	Bilan matière	66
<b>Chapitre 3 - Bioanode à <i>Geobacter sulfurreducens</i> avec N<sub>2</sub> comme source de N</b>		<b>68</b>
<b>1.</b>	<b>Suivi de la densité de courant et rendements de réaction</b>	<b>68</b>
<b>2.</b>	<b>Croissance de <i>Geobacter sulfurreducens</i></b>	<b>72</b>
<b>3.</b>	<b>Fixation de N<sub>2</sub> sur une bioanode</b>	<b>74</b>
<b>4.</b>	<b>Discussion - Conclusion</b>	<b>75</b>
<b>Chapitre 4 - Fixation de N<sub>2</sub> dans une biocathode</b>		<b>77</b>
<b>1.</b>	<b>Enrichissement d'une communauté microbienne fixant N<sub>2</sub> en autotrophie et hypothèses sur les interactions</b>	<b>79</b>
1.1.	Validation de la fixation de N <sub>2</sub> par la méthode ARA après 340 jours d'enrichissement	79
1.2.	Densité de courant et enrichissement en bactérie autotrophes en enrichissement cathodique	82
1.3.	Quantification de la biomasse	84
1.4.	Quantification de l'azote et efficacité coulombique	86
1.5.	Communauté microbienne et modèle conceptuel des interactions	91
<b>2.</b>	<b>Inoculation de nouvelles cathodes à partir des communautés enrichies</b>	<b>96</b>
2.1.	Densité de courant	97
2.2.	Croissance de biomasse sur l'électrode et fixation de N <sub>2</sub>	99
2.3.	Fixation de N <sub>2</sub>	101
2.4.	Rendements faradiques	104
2.5.	H <sub>2</sub> et réduction possible d'O <sub>2</sub>	105
2.6.	Communautés fixant N <sub>2</sub> sur les cathodes	106
<b>3.</b>	<b>Conclusion</b>	<b>111</b>
<b>Chapitre 5 - Validation des hypothèses avec des cultures de souche pures</b>		<b>113</b>
<b>1.</b>	<b>Culture de souches pures sur H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub></b>	<b>113</b>
1.1.	Croissance sur H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	114
1.2.	Fixation de N <sub>2</sub> sur H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> par des cultures de souches pures	120
<b>2.</b>	<b>Culture de souches pures sur acétate</b>	<b>124</b>
2.1.	Croissance sur acétate et H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	124
2.2.	Fixation de N <sub>2</sub> sur acétate et H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	128
<b>3.</b>	<b>Cocultures de souches pures d'intérêts</b>	<b>130</b>
3.1.	Croissance sur H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> en coculture	131

3.2.	Croissance de <i>D. ruminis</i> sans O <sub>2</sub>	136
<b>4.</b>	<b>Cultures des souches pures en MEC</b>	<b>137</b>
4.1.	Performances électrochimiques	138
4.2.	Voltammétrie cyclique	139
4.3.	Croissance bactérienne	140
4.4.	Fixation de N <sub>2</sub> en MEC avec des souches pures	142
<b>5.</b>	<b>Conclusion</b>	<b>143</b>
<b>Chapitre 6 - Discussion et Perspectives</b>		<b>145</b>
<b>1.</b>	<b>Discussion : Potentiel des systèmes de bioélectrochimie microbiens pour la fixation biologique de N<sub>2</sub></b>	<b>145</b>
1.1.	Production de NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	145
1.2.	Production de biomasse diazotrophe	152
<b>2.</b>	<b>Perspectives : Etude des mécanismes de la fixation de N<sub>2</sub></b>	<b>156</b>
2.1.	Par la variation des potentiels appliqués	156
2.2.	Par l'association de différents métabolismes et/ou ingénierie génétique	157
2.3.	Par l'amélioration du modèle des interactions	158
<b>3.</b>	<b>Perspectives : Amélioration de la croissance de la biomasse cathodique diazotrophe</b>	<b>159</b>
3.1.	Par l'optimisation de l'apport en oxygène	159
3.2.	Par l'association de différents métabolismes	160
3.3.	Par l'optimisation du rapport surface d'électrode sur volume du bioprocédé	161
<b>4.</b>	<b>Perspectives : Application de la fixation de N<sub>2</sub> dans les BES</b>	<b>161</b>
<b>Références</b>		<b>164</b>
<b>Annexes</b>		<b>184</b>
<b>1.</b>	<b>Principe d'électrochimie</b>	<b>184</b>
1.1.	L'électrochimie	184
1.2.	Les systèmes de bioélectrochimie microbiens pour la fixation biologique de N <sub>2</sub>	188
<b>2.</b>	<b>Développement et protocole de la méthode d'analyse de la réduction de l'acétylène (ARA)</b>	<b>191</b>
2.1.	Principe	191
2.2.	Procédure	192
<b>3.</b>	<b>Inhibition des nitrogénases</b>	<b>195</b>
3.1.	Inhibition des nitrogénases par l'azote assimilable	195
3.2.	Inhibition des nitrogénases par O <sub>2</sub>	197
<b>4.</b>	<b>Figures supplémentaires</b>	<b>198</b>
4.1.	Courbe densité/potentiel	198
4.2.	Contamination des cultures de souches pures	198

## Liste des figures

- Figure 0-1 : Schéma des différentes sources d'azote utilisable par les plantes. La fixation industrielle est représentée par le procédé Haber-Bosch, la fixation biologique de  $N_2$  est représentée par les bactéries du sol et la fixation de  $N_2$  par des bactéries utilisées comme bio engrais est présentée avec le réacteur microbien. Le recyclage de l'azote par l'utilisation de l'azote organique des lisiers, digestats et/ou compost est également présenté.....1
- Figure 1-1 : Schéma simplifié du cycle biogéochimique de l'azote. La fixation de  $N_2$  est présentée en haut avec le passage de  $N_2$  à  $NH_4^+$ . Ces réactions sont catalysées par des bactéries.....3
- Figure 1-2 : Arbre phylogénétique de 3 domaines du vivant. Les embranchements/classes contenant des fixateurs de  $N_2$  sont colorés en bleu.(Boyd & Peters, 2013) .....5
- Figure 1-3 : Schéma du complexe nitrogénase : Complexe enzymatique permettant la fixation biologique de  $N_2$ . Les sous-unités NifH (Fe protéine avec 4Fe-4S cluster), NifD (sous unité  $\alpha$  de la protéine MoFe avec cofacteur MoFe pour la réduction de  $N_2$ ), et NifK (sous unité  $\beta$  de la protéine MoFe avec P-cluster) sont représentées, ainsi que le cofacteur MoFe de la sous-unité  $\alpha$  qui sert de site actif de la fixation du  $N_2$ . Cette figure a été réalisée à partir des écrits et des figures de Rees et al. (2005).....6
- Figure 1-4 : Fixation biologique de  $N_2$  par les bactéries symbiotiques ayant formées des nodules avec une plante hôte. Présentation des échanges de carbone et d'azote entre les symbiotes. Cette figure a été réalisée à partir des écrits et des figures de Schwember et al. (2019) et Smercina et al. (2019).....9
- Figure 1-5 : Cycle de l'azote dans les sols et interactions entre bactéries fixatrices libres et les plantes. ....12
- Figure 1-6 : Schéma simplifié du procédé Haber-Bosch.(Kissel, 2014; Rouwenhorst et al., 2021) .....17
- Figure 1-7: Schéma des Transferts d'Electron Extracellulaires (Extracellular Electron Transfer) possibles dans un système bioélectrochimique microbien à l'anode et à la cathode (Arunasri & Mohan, 2019; Moscoviz et al., 2019).....28
- Figure 1-8: Arbre phylogénique d'espèces bactériennes représentantes des bactéries électroactives proposé par Lovley & Holmes (2022). Arbre basé sur des données de séquençage de génome entier et de metagenomics. Des détails sur les niches écologiques, les donneurs et accepteurs d'électron sont présentés ainsi que les hypothèses de chemin de transfert d'électron externe (EET) pour les bactéries les mieux connues (importance

phylogenetique, environnemental ou EET les plus étudiés). Les EET cytochromes et e-pili font références aux cytochrome type-c et au pili conducteur (Lovley & Holmes, 2022). .....29

Figure 1-9 : Echelle de quelques potentiels standards de couple redox à pH=7, 25°C et P<sub>ATM</sub>. On retrouve les potentiels des couples O<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O, O<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, H<sup>+</sup>/H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>, N<sub>2</sub>/NH<sub>3</sub> et Fe<sup>2+</sup>/Fe<sub>(s)</sub>. On retrouve les oxydants à gauche de l'axe. Les oxydants les plus forts se trouvent en haut. On retrouve les réducteurs à droite. Les réducteurs les plus forts sont vers le bas. .30

Figure 1-10: Schéma du métabolisme de *G. sulfurreducens* en présence d'une anode et en condition de fixation de N<sub>2</sub> avec l'oxydation de l'acétate. Cette figure s'inspire des écrits et des figures de Esteve-Núñez et al. (2005) et de Jing et al. (2022). .....32

Figure 2-1: Schéma des cellules d'électrolyse microbienne (MEC) utilisées pour la culture de *G. sulfurreducens* .....37

Figure 2-2: Réacteur utilisé pour la culture de *G. sulfurreducens* à l'anode. La chambre anodique est à gauche et la chambre cathodique à droite. Les tiges des électrodes et les canules sont passées au travers de bouchons à rabats étanches. L'étanchéité autour de l'électrode de référence est réalisée grâce à un bouchon GL25 et joint associé. ....37

Figure 2-3: Schéma des cellules d'électrolyse microbienne (MEC) utilisées pour l'enrichissement de bactéries autotrophes et diazotrophes. ....39

Figure 2-4: Dispositif de recirculation de gaz avec de gauche à droite, l'éprouvette pour le suivi des variations de volume de gaz dans le dispositif, la bouteille contenant 120 à 650 mL de gaz (petit et grand réacteur), la pompe à une vitesse de 10mL/min et le réacteur. Tous les tuyaux utilisés sont des tuyaux néoprène<sup>®</sup> de 1,4 mm de diamètre. ....39

Figure 2-5 : Petits réacteurs utilisés pour la culture de souche pure avec l'électrode de référence au premier plan. A) La chambre cathodique est à gauche de la photo (électrode en feutre de carbone + référence au premier plan) et la chambre anodique à droite. L'électrode de référence est maintenue en place à l'aide d'un bouchon GL18. B) Le côté opposé des réacteurs où l'on retrouve la canule d'apport de gaz qui est en verre et bouchée par un septum comme pour les grands réacteurs. Ces canules permettent l'apport de gaz au centre de la chambre cathodique. Les prélèvements sont fait au travers du septum bleu présent tout à droite de la photo. Les sorties des réacteurs non utilisées sont fermées par des bouchons GL14. ....40

Figure 2-6: Déroulement des cultures de *Geobacter sulfurreducens* pour la formation de biofilm anodique pour la fixation de N<sub>2</sub> .....43

Figure 2-7: Schéma du déroulement des deux procédures de pré-enrichissement utilisées..46



Figure 2-8: Schéma résumé du déroulement des enrichissements de bactérie fixatrice de N <sub>2</sub> et autotrophe avec et sans cathode.....	49
Figure 2-9: Schéma du déroulement des cultures de souches pures réalisées.....	54
Figure 3-1 : Densités de courant relevées pour tous les réacteurs inoculés avec <i>G. sulfurreducens</i> pour chaque batch. Les lignes bleues correspondent aux réacteurs où la fixation de N <sub>2</sub> a lieu et les lignes vertes correspondent aux réacteurs témoins (sans fixation de N <sub>2</sub> ). Les surfaces utilisées pour le calcul de la densité sont les surfaces d'une seule face d'électrode (25cm <sup>2</sup> ). 20mM d'acétate étaient présents dans les milieux au début de chaque batch et un ajout a été fait (sauf batch 5) après 3 à 4 jours avec une quantité d'acétate correspondant à 10mM dans nos réacteurs.....	70
Figure 3-2 : Concentration en copies du gène ADNr 16S des quatre réacteurs à la fin du premier batch (sans fixation de N <sub>2</sub> ) et du deuxième (premier batch de fixation de N <sub>2</sub> ) .....	73
Figure 3-3 : Concentration en biomasse (axe de droite) et en copies du gène ADNr 16S (axe de gauche) des anodes colonisées. Les résultats sont rapportés au volume de la chambre anodique. ....	74
Figure 4-1: Vitesse de réduction de l'acétylène en $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4/\text{L}/\text{j}$ dans les différents réacteurs après 340 jours d'enrichissement. Pour l'enrichissement H <sub>2</sub> E, 3 bouteilles ont été utilisées pour la mesure de la réduction de l'acétylène avec une injection par bouteille présentées ici. Pour les enrichissements PCE, 2 réacteurs avec 4 injections chacun ont été utilisés pour valider la répétabilité des mesures en éthylène C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> , ce qui donne 8 injections. Pour les enrichissements nPCE, 2 réacteurs ont été utilisés et correspondent aux deux mesures visible sur le graphique. Pour les réacteurs (PCE et nPCE) une mesure correspond à la somme de C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> mesurée dans l'espace de tête des réacteurs et dans le système de recirculation des gaz.....	80
Figure 4-2 : Densité de courant moyenne mesurée pour les deux PCE (ligne bleue). Les niveaux indiqués en rouge correspondent à la densité de courant moyenne théorique et à l'écart-type estimés à partir des densités de courant de deux systèmes électrochimiques abiotiques. Pour le système électrochimique abiotique, un batch de deux jours a été réalisé avec du C organique et un batch de 16 jours avec du CO <sub>2</sub> . Les pics observés sont dus au fonctionnement en batch des PCE avec des perturbations à chaque renouvellement du milieu. Des pannes de courant sont survenues à 230 jours et 260 jours. Le temps indiqué sur l'axe des x correspond au temps expérimental à partir du jour 0 de l'enrichissement où les échantillons de sol ont été introduits pour la première fois dans les bouteilles avec un milieu contenant du C organique. Le jour 55 correspond au démarrage du système électrochimique microbien avec les communautés pré-enrichies. La ligne en pointillé au jour 110 correspond au passage au CO <sub>2</sub> comme seule source	

de carbone dans les PCE. Un lissage de la courbe sur 5 jours a été appliqué sur la courbe de densité de courant des PCE. ....83

Figure 4-3 : Concentrations de bactéries au cours du temps dans les différents enrichissements, calculées à partir des quantifications par qPCR de l'ADNr 16S dans le milieu et le biofilm. Les disques verts correspondent aux enrichissements H<sub>2</sub>E en bouteilles, les triangles bleus correspondent à l'enrichissement par cathode polarisée (PCE), les carrés rouges correspondent aux contrôles dans l'enrichissement par cathode non polarisée (nPCE). Les symboles partiellement violets marqués Org correspondent aux premières phases d'enrichissement en C organique pour la PCE et la nPCE. La flèche indique la transition entre l'enrichissement par bouteille et l'enrichissement par cathode dans les systèmes électrochimiques microbiens pour le PCE et le nPCE. Les barres d'erreur correspondent à l'écart-type calculé. ....86

Figure 4-4 : a) Concentration N total basée sur la somme de (1) N estimé à partir de la mesure de la biomasse (biomasse en suspension et biofilm), (2) contenu en N sous forme ionique (N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, N-NO<sub>3</sub>, N-NO<sub>2</sub>) et (3) N mesuré dans le poids sec du milieu de l'enrichissement par cathode polarisée (PCE) et de l'enrichissement par cathode non polarisée (nPCE) et (b) concentration en N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> dans l'enrichissement par H<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>E), PCE et nPCE. ....88

Figure 4-5 : Distribution des électrons dans les différents produits des réactions de réduction sur les cathodes PCE pour des périodes allant de 125 à 214 jours et de 215 jours à la fin des enrichissements présentés. Sont présentés les proportions d'électrons utilisés dans la production d'H<sub>2</sub> (en cyan), les produits de la fixation de N<sub>2</sub> (en vert ; N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, N<sub>total</sub>), l'acétate retrouvé issu de la fixation du CO<sub>2</sub> (en bleu) et l'estimation de biomasse produite sur ces périodes (en rouge). Les barres d'erreurs correspondent aux écart-types des mesures entre les deux réacteurs et pour les différents batch réalisés sur ce périodes (5 entre 125 et 214 jours et 6 sur la période suivante).....89

Figure 4-6 : Résultats de l'analyse en composantes principales (ACP) réalisée sur les communautés microbiennes a) des pré-enrichissements, des bouteilles d'enrichissement alimentées en H<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>E) après 232 jours et des cathodes des enrichissements en PCE et nPCE après 214 jours et b) des bouteilles d'enrichissement alimentées en H<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>E) après 232 jours et des cathodes des enrichissements en PCE et nPCE après 214 jours. Seules les familles des cinq principales OTU bactériennes de chaque communauté échantillonnée ont été utilisées pour l'analyse. Les communautés microbiennes dans les bouteilles de pré-enrichissement sont représentées par les abréviations suivantes : F pour le sol forestier, T pour le terreau, L pour la rhizosphère des légumineuses et M pour un mélange de toutes ces communautés. Les variables les moins proches du cercle de corrélation ne sont pas affichées (cos<sup>2</sup> < 0,2).....92

Figure 4-7 : Graphiques à barres des abondances relatives des principales familles bactériennes des pré-enrichissements, de l'enrichissement alimenté en H<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>E après 232 jours) et des enrichissements cathodiques (PCE et nPCE après 214 jours). Les communautés microbiennes dans les bouteilles de pré-enrichissement sont représentées par les abréviations suivantes : F pour le sol forestier, T pour le terreau, L pour la rhizosphère des légumineuses et M pour un mélange des trois. Seules les familles dont l'abondance relative est ≥ 5 % sont représentées pour chaque échantillon. ....95

Figure 4-8 : Hypothèses des interactions prenant place dans nos communautés après enrichissement pour la fixation de N<sub>2</sub> avec des sources d'énergie inorganiques. ....96

Figure 4-9 : Densités de courant relevées dans les différents réacteurs à électrodes polarisées. Sont présentés les densités de courant des réacteurs des enrichissements (PCE 1 et 2) et les densités de courant des réacteurs inoculés avec le milieu des premiers (PCE B1 et B2). Les densités de courant avant inoculation mesurées dans les réacteurs non utilisés pour les enrichissements sont présentées en noir. Les densités de courant sont présentées séparément avec a) les réacteurs PCE et PCE B1 en bleu et bleu foncé et b) les réacteurs PCE 2 et PCE B2 en vert et vert foncé. Le moment de l'inoculation est indiqué par une flèche rouge. Les changements de milieu sont indiqués par des flèches noires.....98

Figure 4-10 : Croissance de biomasse sur les électrodes des nouvelles cultures cathodiques (PCE E et PCE B) et comparaison avec les moyennes des cultures d'enrichissement. La concentration moyenne des enrichissements nPCE est calculée d'après les mesures à 340 et 417 jours. La concentration mesurée à 398 jours pour les cathodes PCE B correspond à la biomasse déjà présente sur les cathodes avant inoculation. Un seul réacteur PCE B a été mesuré pour le dernier point à 473 jours. Le second réacteur (PCE B2) présentant une concentration en ADNr 16S d'environ 10<sup>6</sup> bactérie/mL soit trop faible pour le séquençage, voit sa concentration en bactérie estimée selon un facteur de 10 ADNr 16S/bactérie. ....99

Figure 4-11 : Vitesse de réduction de l'acétylène mesurée par la méthode ARA. Les résultats présentés pour les enrichissements à 340 jours sont les mêmes que présentés en partie 1 de ce chapitre. Les résultats des enrichissements H<sub>2</sub>E ne sont pas présentés avec des observations de C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> uniquement dans une bouteille après 450 jours d'enrichissement. Les formes indiquent le réacteur et/ou pré-enrichissement ayant été utilisé aussi bien pour les bouteilles d'enrichissements H<sub>2</sub>E et pour les enrichissements cathodiques. Les ronds correspondent au pré-enrichissement avec échantillon de sol séparé et au réacteur PCE 1. Les triangles correspondent aux pré-enrichissement en mélange des échantillons ou réacteur PCE 2. Deux points sont présents pour les PCE E2 et PCE B2 à 455 jours (55 jour) pour une seconde mesure de la fixation utilisée pour confirmer l'absence de réduction de l'acétylène C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>. ....102

Figure 4-12 : Résultats des analyses en composantes principales (ACP) des communautés bactériennes sur les électrodes des enrichissements PCE, nPCE et des nouveaux réacteurs (PCE E et PCE B). Sont présentés dans la figure a) les résultats de l'ACP sur les communautés cathodiques à 214, 340, 417 et 473 jours des enrichissements (19 et 75 jours pour PCE B) pour les quatre types de réacteur (PCE, nPCE, PCE E et PCE B). En b) sont présentés les résultats de l'ACP sur les communautés cathodiques à 214, 340, 417 et 473 jours des enrichissements (19 et 75 jours pour PCE B) pour les trois types de réacteur polarisé (PCE, PCE E et PCE B). En c) sont présentés les résultats de l'ACP sur les communautés cathodiques à 340, 417 et 473 jours des enrichissements (19 et 75 jours pour PCE B) pour les trois types de réacteur polarisé (PCE, PCE E et PCE B). Les analyses ont été faites sur les dix OTU majoritaires de chaque communauté avant d'être ramené au niveau des familles .....107

Figure 4-13 : Abondances relatives des familles bactériennes présentes sur les électrodes des enrichissements et sur les nouvelles cathodes. Les familles présentant à moins de 5% ont été retirées. Les abondances relatives sont calculées d'après le séquençage des gènes ADNr 16S. ....110

Figure 4-14 : Nouvelles hypothèses de fonctionnement des cathodes de fixation de N<sub>2</sub>. Les espèces indiquées ici sont utilisées comme exemples des différents types métaboliques impliqués d'après nos observations et hypothèse à 214 jours d'enrichissements et à 473 jours. ....111

Figure 5-1 : Densité optique à 600nm mesurée pour les différentes souches pures utilisées sur milieu minéral en présence d'H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> au cours du a) premier, b) deuxième et c) troisième batch successifs. Les mesures pour A. lipoferum, C. testosteroni, D. ruminis et X. autotrophicus sont présentées en vert clair, orange, bleu et vert foncé respectivement. Les barres d'erreurs sont obtenues par calcul de l'écart-type des mesures sur les triplicats de culture pour chaque souche.....116

Figure 5-2: Densité optique à 600nm des différentes souches de bactéries pures lors de la culture en milieu minéral avec H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> après lavage des cellules. Sont présentés a) le premier batch "court", b) le second plus long de 35 jours et c) le troisième batch avec une concentration plus faible d'O<sub>2</sub> dans l'espace de tête (≤3%). Les mesures pour A. lipoferum, C. testosteroni, D. ruminis et X. autotrophicus sont présentées en vert clair, orange, bleu et vert foncé respectivement. Les barres d'erreurs sont obtenues par calcul de l'écart-type des mesures sur les triplicats de culture pour chaque souche.....117

Figure 5-3 : Concentrations en bactérie dans les cultures de souches pures au cours du sixième batch avec diminution de la quantité d'O<sub>2</sub>. Elles correspondent aux concentrations en gène d'ADNr 16S obtenues par qPCR divisées par les nombres de copies du gène d'ADNr 16S dans

les génomes selon la base de donnée rrndb 5.7. Les concentrations finales correspondent aux mesures réalisées après 14 jours de culture. Les barres d'erreurs sont calculées comme l'écart-type des triplicats des cultures de chaque souche. ....119

Figure 5-4 : Vitesses de réduction de l'acétylène en éthylène mesurées par la méthode ARA pour les différentes cultures de souches pures en milieu minéral avec H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> comme source d'énergie. Les cinq batchs sont présentés avec les batchs 1 à 3 correspondant aux cultures avec repiquages successifs et les batchs 4 et 6 sont les batchs avec lavage des cellules avant inoculation. Le batch 5 n'a pas eu d'utilisation de la méthode ARA. Seuls les résultats pour lesquels du C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> a été mesuré sont présentés. Les points représentent les vitesses de réduction de chaque duplicat mesurées à différents moments au cours du batch. ....121

Figure 5-5 : Densité optique à 600nm des cultures de souches pures sur acétate : a) le premier batch de 7 jours, b) le second batch de 8 jours et c) et d) le troisième batch présenté avec deux échelles différentes pour l'axe des ordonnées. Les mesures pour *A. lipoferum*, *C. testosteroni*, *D. ruminis* et *X. autotrophicus* sont présentées en vert clair, orange, bleu et vert foncé respectivement. Les barres d'erreurs sont obtenues par calcul de l'écart-type des mesures sur les triplicats de culture pour chaque souche. ....125

Figure 5-6 : Concentrations en bactéries dans les cultures pures au cours du troisième batch avec apport d'acétate. Elles correspondent aux concentrations en gène d'ADNr 16S obtenues par qPCR divisées par les nombres de copies du gène d'ADNr 16S dans les génomes selon la base de donnée rrndb 5.7. Les concentrations initiales correspondent aux mesures réalisées au moment de l'inoculation. Les concentrations finales correspondent aux mesures réalisées après 14 jours de culture. Les barres d'erreurs sont calculées comme l'écart-type des triplicats des cultures de chaque souche. ....126

Figure 5-7 : Concentrations initiales et finales d'acétate dans les trois batchs de pour *A. lipoferum*, *C. testosteroni*, *D. ruminis* et *X. autotrophicus* : a) le premier batch de sept jours, b) le second batch de huit jours et c) le dernier batch de 14 jours. Les barres d'erreurs sont obtenues par calcul de l'écart-type des mesures sur les triplicats de culture pour chaque souche. ....128

Figure 5-8 : Vitesses de réduction de l'acétylène en éthylène mesurées par la méthode ARA pour les différentes cultures pures en milieu minéral avec ajout de 0,5g/L Na-acétate comme source d'énergie. Seuls les résultats pour lesquels du C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> a été mesuré sont présentés. Les points représentent les vitesses de fixation de chaque duplicat à différents moments au cours du batch. ....129

Figure 5-9 : Concentration bactérienne des cocultures de *A. lipoferum* et *D. ruminis* dans un milieu minéral avec H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> comme source d'énergie et de carbone : a) DO mesurée à 600nm

au cours du temps, b) concentrations initiales et finales en copies du gène ADNr 16S. Pour la densité optique présentée, il s'agit de la moyenne de 4 réplicats de coculture. Pour les résultats de qPCR des gènes ADNr 16S, la concentration moyenne à t0 correspond à la moyenne de 4 réplicats. Deux réplicats sont utilisés à 15 jours et les 2 autres à 20 jours. Les barres d'erreurs correspondent à l'écart-type des mesures.....132

Figure 5-10 : Quantité de a) O<sub>2</sub> et b) H<sub>2</sub> d'après les mesures des concentrations des espaces de têtes des cultures de mélange d'A. lipoferum et D. ruminis (cyan) par rapport à une bouteille non inoculée appelée Blanc (point et ligne noir). Les deux points pour chaque prélèvements correspondent à la quantité avant et après les différents prélèvements (gaz et liquide) dans les bouteilles et les changements de température, pression et volume sont donc revu et pris en compte. ....133

Figure 5-11 : Vitesse de production d'éthylène C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> par les cultures de mélange de D. ruminis et A. lipoferum. Les différents points correspondent aux réplicats des cultures. Vitesses de réduction de l'acétylène en éthylène mesurées par la méthode ARA pour les cultures de mélange de D. ruminis et A. lipoferum en milieu minéral avec H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> comme source d'énergie. Seuls les résultats pour lesquels de l'éthylène C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> a été mesuré sont présentés. Les points représentent les vitesses de fixation de chacun des 4 réplicats au cours de 4 mesures en 5 jours après 20 jours de culture. ....134

Figure 5-12 : Hypothèses sur les interactions entre Azospirillum lipoferum et Desulforamulus ruminis d'après nos observations au cours des enrichissements et des résultats des cultures pures. On suppose que A. lipoferum, connue comme capable d'oxyder H<sub>2</sub>, utilise O<sub>2</sub> comme accepteur final d'électron. Cette respiration dans les bouteilles non agitées provoque la formation de zones anoxiques par un gradient permettant le fonctionnement du métabolisme anaérobie de D. ruminis. Le sulfate (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) pourrait être utilisé comme accepteur final d'électrons de D. ruminis avec H<sub>2</sub> comme donneur d'électrons. ....135

Figure 5-13 : Concentration bactérienne mesurée par la densité optique à 600nm et la mesure de la concentration bactérienne dans les bouteilles de culture de D. ruminis sans O<sub>2</sub>. Trois réplicats sont utilisés pour chaque point présenté. a) Densité optique à 600nm mesurée pour cultures de D. ruminis pures utilisées sur milieu minéral en présence d'H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> avec retrait d'O<sub>2</sub> et b) Concentrations en bactérie dans les cultures de D. ruminis pures au cours du batch sur milieu minéral avec retrait d'O<sub>2</sub>. Elles correspondent aux concentrations en gène d'ADNr 16S obtenues par qPCR divisées par les nombres de copies du gène d'ADNr 16S dans les génomes selon la base de donnée rrndb 5.7. Les concentrations initiales correspondent aux mesures réalisées au moment de l'inoculation. Les concentrations finales correspondent aux mesures réalisées après 28 jours de culture. Les barres d'erreurs sont calculées comme l'écart-type des

triplicats des cultures de chaque souche. Les barres d'erreurs sont obtenues par calcul de l'écart-type des mesures sur les triplicats de culture. ....	136
Figure 5-14 : Densités de courant mesurées dans les deux réacteurs de chaque souche de <i>D. ruminis</i> et <i>X. autotrophicus</i> : a), le premier batch en MEC avant et après inoculation des réacteurs. b) le deuxième batch de 30 jours avec 3 jours avant inoculation avec cultures issues de milieu riche et c) troisième batch en absence d'O <sub>2</sub> avec <i>D. ruminis</i> . Les points en noir correspondent aux valeurs mesurées dans les réacteurs avant inoculation, les points en couleur correspondent aux mesures après inoculation. Les flèches correspondent à des cycles de CV. Un lissage des courbes sur cinq jours est utilisé ainsi qu'un retrait des valeurs jugées aberrantes (augmentation de plus de 95% de la valeur de J précédente, soit après dix minutes). ....	138
Figure 5-15 : Voltammétrie cyclique a) des réacteurs avec la présence d'O <sub>2</sub> (6 jours sans inoculation et 17 jours après) et b) dans un réacteur avec du N <sub>2</sub> seul comme gaz après 5 jours et 35 jours après inoculation par <i>D. ruminis</i> . ....	140
Figure 5-16 : Mesure de la densité optique dans les milieux des réacteurs utilisés pour la culture de <i>D. ruminis</i> et <i>X. autotrophicus</i> sur cathode. Les trois batchs présentés correspondent à a) le premier batch avec O <sub>2</sub> , b) le second batch en présence d'O <sub>2</sub> et c) le dernier batch réalisé pour <i>D. ruminis</i> en anaérobiose.....	141
Figure 5-17 : Concentrations en bactérie estimées par qPCR des ADNr 16S. Les concentrations correspondent aux concentrations en gène d'ADNr 16S obtenues par qPCR divisées par les nombres de copies du gène d'ADNr 16S dans les génomes selon la base de donnée rrndb 5.7. Les concentrations sont calculées en utilisant les quantités de bactérie des milieux et des électrodes avant de rapporter l'ensemble au volume de la chambre cathodique utilisée. Les barres d'erreurs correspondent aux écarts-types entre les deux réacteurs pour chaque condition sauf pour le troisième batch où un seul réacteur de <i>D. ruminis</i> a été utilisé. Le graphique a) correspond au premier batch avec O <sub>2</sub> et b) au second batch. C) représentent les concentrations bactériennes initiale et finale du réacteur de <i>D. ruminis</i> sans O <sub>2</sub> .....	142
Figure 0-1 : Montage du piège à soude utilisé avec en bas la seringue contenant l'échantillon de gaz qui est vidé pour faire buller son gaz dans le NaOH de la seringue supérieure. Une fois tout le gaz passé, le système est retourné pour récupérer uniquement du gaz dans la première seringue avant de reproduire la première étape. Si le système est bien hermétique, le volume de gaz retrouvé dans la deuxième seringue doit diminuer par rapport à celui de la première seringue. ....	195
Figure 0-2 : Système de régulation NifLA de la transcription des gènes nif en réponse à la présence d'azote utilisable et système de gestion de la concentration en azote utilisable GlnDK	

(W. Zhang et al., 2023). En présence d'azote, la glutamine intracellulaire augmente. Sa fixation avec la protéine GlnD active l'activité d'acylation de-uridine et clive les uridine monophosphate (UMP) des monomères de protéine GlnK. La protéine GlnK sans UMP se fixe sur la protéine nifL. Cette fixation active la fixation de la protéine NifL à la protéine NifA. La protéine NifA a pour rôle l'activation de la transcription par liaison avec le promoteur  $\sigma_{54}$  des gènes nif. Le complexe nifL/NifA ne peut plus se fixer sur le promoteur, il n'y a donc pas d'activation de la transcription. ....196

Figure 0-3 : Schéma de la régulation de la transcription des gènes nif par le système nifLA en réponse à la présence d'O<sub>2</sub> (W. Zhang et al., 2023). En présence d'O<sub>2</sub>, la chaîne respiratoire oxyde la coenzyme redox pour apporter du pouvoir réducteur pour la réduction d'O<sub>2</sub>. La coenzyme FAD/FADH<sub>2</sub> se fixe à la protéine NifL et active son rôle de blocage de NifA uniquement quand le complexe NifL/FAD est oxydé (FAD/FADH<sub>2</sub> sous forme FAD). La présence d'O<sub>2</sub> entraîne l'arrêt de la transcription des gènes nif.....197

Figure 0-4 : Courbes densité potentiel mesurées a) à 214 jours d'enrichissement pour les cultures PCE et b) après 15 jours de cultures de *G. sulfurreducens* en bioanode. Un scan rate de 1mV/s.....198

Figure 0-5 : Abondance relative des différents genres bactériens retrouvés dans nos cultures de souches pures après repiquages des cryo-banques dans du milieu riche et une culture de 4 jours. ....199



## Liste des tableaux

Tableau 2-1 : Coefficients de Henry des espèces chimiques présentées au cours de ces travaux. .....	67
Tableau 3-1 : Rendements mesurés au cours de la culture de <i>G. sulfurreducens</i> sur anode. Sont présentés le rendement faradique ( <i>CEAn</i> ), le rendement de récupération à la cathode ( <i>CEH2</i> ) et le rendement global des systèmes utilisés ( <i>CECell</i> ) .....	72
Tableau 4-1 : Résumé des étapes de l'enrichissement sur cathode.....	78
Tableau 4-2 : Résumé des étapes des enrichissements en bouteille avec apport d' $H_2$ .....	78
Tableau 4-3 : Moyennes des vitesses de production en ammonium et des concentrations en gènes <i>nifH</i> et <i>ADNr 16S</i> à 340 jours pour les trois configurations expérimentales. Ces moyennes sont mesurées à 340 jours après un batch de 21 jours pour la vitesse calculée. Les concentrations sont basés sur la biomasse des cathodes (biofilm+milieu). Moyennes mesurées sur les deux réacteurs PCE, les deux réacteurs contrôles nPCE et les six bouteilles $H_2E$ .....	82
Tableau 4-4 : Densités de courant, vitesses de production et rendement faradique pour les deux enrichissements cathodiques polarisés (PCE) sur deux périodes différentes de densité de courant avec le $CO_2$ comme seule source de carbone. Au cours de la première période (131-214 jours), la densité de courant a augmenté, tandis qu'au cours de la seconde période (>215), la densité de courant a diminué après plusieurs coupures de courant (voir Figure 4-2). .....	91
Tableau 4-5 : Rendements faradiques des cathodes des enrichissements (PCE E) et des nouveaux réacteurs (PCE B). Les résultats correspondent à la période de 398 jours à 473 jours après le début des enrichissements (0 à 75 jours des nouvelles cathodes). Les quantités de bactéries des électrodes proviennent des mesures réalisées aux jours 417 et 473 des enrichissements (19 et 75 des nouvelles cathodes). .....	104
Tableau 6-1 : Tableau récapitulatif des différents travaux sur bioanodes pour la fixation de $N_2$ . Sont présentés les matériaux utilisés pour les électrodes, les vitesses de production de N total et $NH_4^+/NH_3$ normalisées à la taille des électrodes (ou volume du réacteur quand indisponible) et les potentiels appliqués à l'électrode de travail par rapport à une électrode de référence ou la différence de potentiel (ddp) entre les deux électrodes du système. ....	148
Tableau 6-2 : Tableau récapitulatif des différents travaux sur biocathodes ou cathode abiotique comme source d' $H_2$ pour la fixation de $N_2$ . Sont présentés les matériaux utilisés pour les électrodes, les vitesses de production de N total et $NH_4^+/NH_3$ normalisées à la taille des électrodes (ou volume du réacteur quand indisponible) et les potentiels appliqués à l'électrode de travail par rapport à une électrode de référence ou la différence de potentiel (ddp) entre les deux électrodes du système. ....	150

## Liste des abréviations

ACP : Analyse en composante principales

AEM : Anion exchange membrane, Membrane échangeuse d'anions

AGV : Acide Gras Volatils

ARA : Acetylene Reduction Assay, méthode de suivi de la fixation de N<sub>2</sub> par réduction de l'acétylène

ATP : Adénosine Triphosphate

BES : Systèmes Bioélectrochimiques microbiens

$CE_{An}$  : Rendement faradique anodique

$CE_{Ca}$  : Rendement faradique anodique

$CE_{H_2}$  : Rendement de récupération à la cathode

$CE_{cell}$  : Rendement faradique global du système

CEM : Cation exchange membrane, Membrane échangeuse de cations

CPG : Chromatographie en phase gazeuse

DIET : Transfert direct d'électron inter-espèces

EET : Extracellular Electron Transfer, Transfert d'électrons extracellulaire

EAB : Bactéries électroactives

FID : Détecteur à ionisation de flamme

H<sub>2</sub>E : Enrichissement en bouteille avec apport d'H<sub>2</sub>

HOB : Bactérie oxydant l'hydrogène

HPLC : Chromatographie Liquide à Haute Performance

i.e. : c'est-à-dire

MEC : Cellule d'électrolyse microbienne

MES : Electrosynthèse microbienne

MFC : Pile à combustible microbienne

NCBI : Centre américain de données biotechnologiques

nPCE : Enrichissement sur cathode non polarisée

$n_p$  : Quantité d'électrons échangée au cours d'une réaction de réduction pour un produit P

$n_s$  : Quantité d'électrons échangée au cours d'une réaction d'oxydation d'un substrat S

OCV : Open circuit voltage, potentiel à circuit ouvert

PCE : Enrichissement sur cathode polarisée

PCE E : Réacteurs utilisant des cathodes colonisées au cours des enrichissements PCE

PCE B : Réacteurs inoculés avec du milieu issu des enrichissements PCE

PSM : Poste de sécurité microbiologique

qPCR : Quantitative polymerase chain reaction, Réaction en chaîne par polymérase en temps réel (quantitative)

RPM : Rotation par minute

SHE : Standard Hydrogen Electrode, Electrode standard à hydrogène

SCE : Saturated Calomel Electrode, Electrode au calomel saturé

TCD : Détecteur de conductibilité thermique

## Publications et communications scientifiques

A la date de dépôt de cette thèse, les travaux présentés dans ce document ont donné lieu aux communications suivantes.

### **Publications en revue à comité de lecture :**

Rous A, Santa-Catalina G, Desmond-Le Quéméner E, Trably E, Bernet N. *Comparison of enrichment methods for efficient nitrogen fixation on a biocathode*. (2023) (p. 2023.03.02.530809) bioRxiv, <https://doi.org/10.1101/2023.03.02.530809>

Recommandé par PCI Microbiol :

<https://doi.org/10.24072/pci.microbiol.100010>

PCI journal :

<https://doi.org/10.24072/pcjournal.365>

Codes informatiques et données :

<https://doi.org/10.57745/ONNGWZ>

### **Communication orale en congrès international :**

Rous A, Trably E, Desmond-Le Quéméner E, Bernet N. *Enrichment strategy of chemolithotrophic biofilm for nitrogen fixation in MES*. ISMET8 – 2022 Global Conference, 19-23 Sep 2022, Chania, Greece.

<https://hal.inrae.fr/hal-04176863>

### **Communication en congrès national :**

Rous A, Desmond-Le Quéméner E, Trably E, Bernet N. *Enrichissement de bactéries chimolithotrophes du sol pour la fixation biologique de l'azote sur une biocathode*. Société Française de Microbiologie (SFM), Montpellier, 3 octobre – 5 octobre 2022.

<https://hal.inrae.fr/hal-04233645>



## Introduction

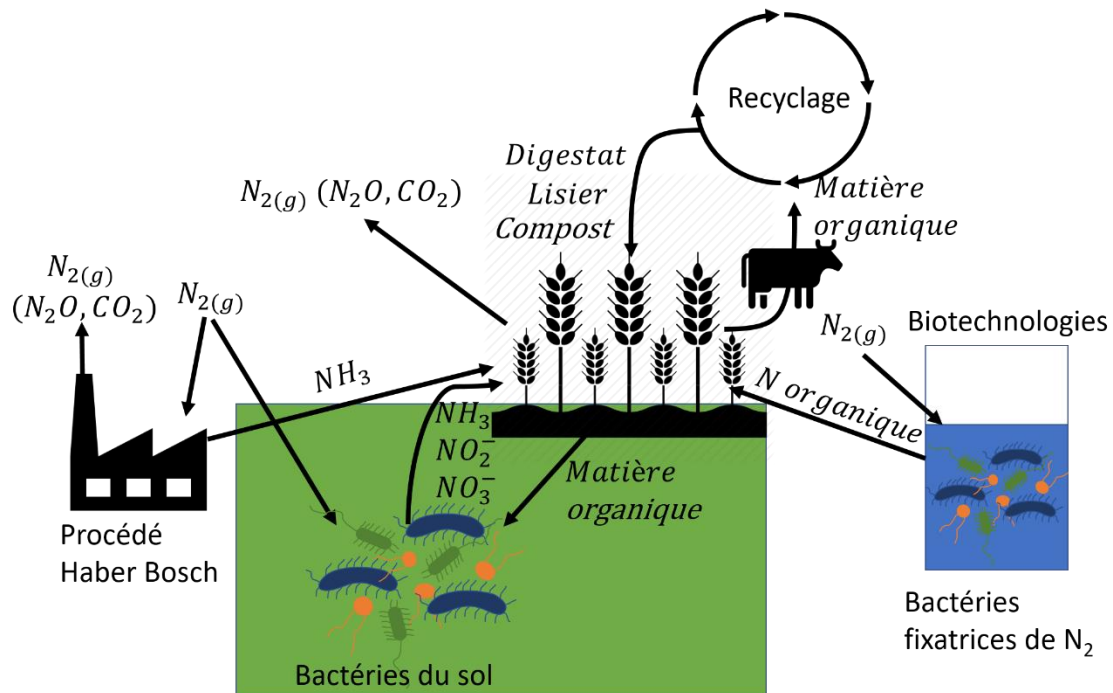


Figure 0-1 : Schéma des différentes sources d'azote utilisable par les plantes. La fixation industrielle est représentée par le procédé Haber-Bosch, la fixation biologique de  $N_2$  est représentée par les bactéries du sol et la fixation de  $N_2$  par des bactéries utilisées comme bio engrais est présentée avec le réacteur microbien. Le recyclage de l'azote par l'utilisation de l'azote organique des lisiers, digestats et/ou compost est également présenté.

### 1. L'AZOTE, BESOIN ET MISE A DISPOSITION DU VIVANT

L'azote est un élément essentiel pour la vie. Il est notamment retrouvé dans les protéines au niveau des liaisons peptidiques entre acides aminés et est nécessaire à la synthèse d'ADN. Dans la nature, l'azote se trouve en très grande quantité dans l'atmosphère où il représente près de 80% de l'air sous forme d'azote moléculaire  $N_2$ . Cependant, cet azote moléculaire n'est pas utilisable en l'état par la très grande majorité des êtres vivants. En effet, pour être assimilé par le vivant, l'azote doit être sous une forme disponible comme l'ammoniac ( $NH_3$ ), le nitrate ( $NO_3^-$ ) ou d'autres formes azotées (urée, protéines) (Delwiche, 1970). Dans certains cas, l'azote atmosphérique  $N_2$  peut être fixé après conversion en ammoniac ( $NH_3$ ). Cette réaction peut être réalisée par des bactéries, en interaction ou non avec des plantes. On parle alors de fixation biologique de l'azote. Il s'agit d'un phénomène naturel par lequel le diazote  $N_2$  « entre » dans le cycle de l'azote et devient utilisable par le vivant comme le présente la Figure 0-1 avec les bactéries du sol fixant le  $N_2$  pour les plantes.

## 2. UTILISATION DES ENGRAIS CHIMIQUE

Pour subvenir aux besoins des plantes dans un contexte d'augmentation de la population mondiale et de la consommation alimentaire, l'industrialisation de la production d'azote utilisable par les plantes a été nécessaire. Cette industrialisation a conduit à une évolution importante dans nos manières de produire nos aliments avec la révolution agricole survenue au cours du XIX<sup>ème</sup> siècle (Kissel, 2014). À cette époque, il est devenu possible d'apporter plus d'azote aux plantes pour favoriser leur développement et améliorer les rendements de production. L'azote est depuis apporté sous forme d'engrais contenant de l'ammoniac, de l'urée ou des sels de nitrates. Le procédé industriel qui a permis une avancée majeure dans la production d'engrais azoté est le procédé Haber-Bosch, proposé par Fritz Haber en 1908 (Kissel, 2014). Ce procédé requiert toutefois une consommation d'énergie importante ainsi que d'émissions majeures de gaz à effet de serre. Dans l'objectif de réduire ces impacts, il est nécessaire de trouver de nouvelles voies pour produire et/ou utiliser les engrais dans l'agriculture.

## 3. VERDIR LES ENGRAIS (PRODUCTION ET UTILISATION)

Pour ce faire, la recherche se concentre sur plusieurs voies comme la réduction des émissions ou de la consommation d'énergie du procédé Haber Bosch. D'autres travaux ont examiné l'utilisation d'engrais organiques tels que les composts, ainsi que l'introduction ou l'enrichissement de bactéries fixatrices de N<sub>2</sub> dans le sol pour fournir les éléments essentiels à la croissance des plantes. Ces bactéries peuvent-être produites via divers procédés et ont été au cœur du projet CATHOMIX, au sein duquel cette thèse s'est inscrite. L'objectif était d'explorer l'utilisation des systèmes bioélectrochimiques microbiens, où l'apport d'énergie électrique permettrait de convertir l'azote moléculaire en une forme utilisable par les plantes, tout en examinant la nature de cette forme d'azote produite (NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ou biomasse microbienne fixatrice de N<sub>2</sub>). Le projet CATHOMIX, financé par l'ANR, associe l'Université de Rennes, l'Université de Bretagne Occidentale et INRAE. Un premier work package coordonné par l'Université de Bretagne Occidentale portait sur le développement de matériaux utilisables à la cathode pour permettre un bon développement microbien et la production d'H<sub>2</sub>. Le second work package, coordonné par INRAE, s'intéressait aux bactéries capables de fixer N<sub>2</sub> sur une cathode et aux mécanismes au sein des communautés microbiennes. Enfin, l'Université de Rennes coordonne le work package sur la mise en commun des résultats et le développement d'un électrolyseur microbien pour la production d'un engrais bactérien.

# Chapitre 1 - Synthèse bibliographique : L'azote et sa fixation en système bioélectrochimique microbien

## 1. FIXATION BIOLOGIQUE DE L'AZOTE

L'azote représente près de 80% de notre atmosphère où il est présent sous forme de  $N_2$ . Cet azote, bien que disponible en très grande quantité, est inaccessible sous cette forme pour une grande partie du vivant. Les micro-organismes, en particulier les bactéries, jouent un rôle clé dans le processus de fixation de l'azote.

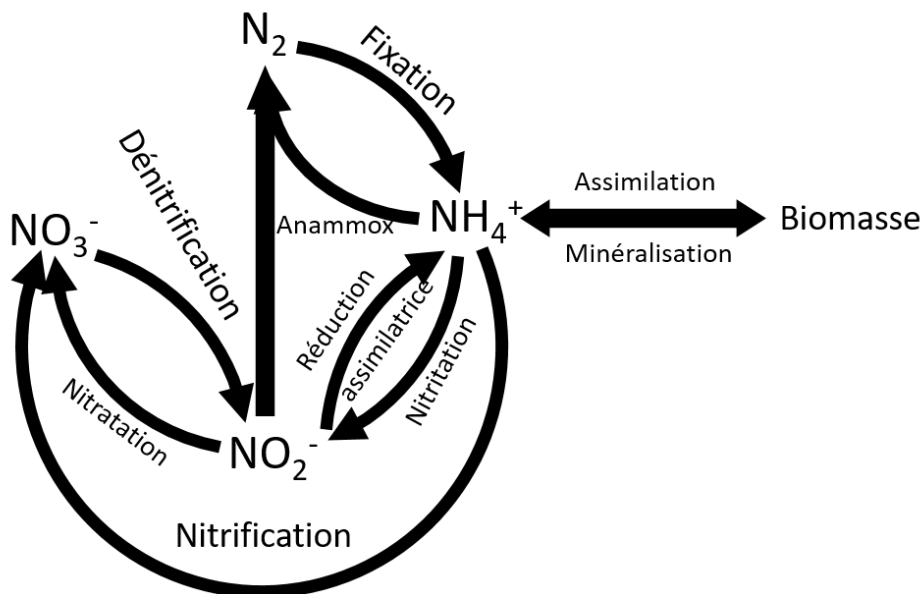


Figure 1-1 : Schéma simplifié du cycle biogéochimique de l'azote. La fixation de  $N_2$  est présentée en haut avec le passage de  $N_2$  à  $NH_4^+$ . Ces réactions sont catalysées par des bactéries.

### 1.1. Cycle de l'azote

Le cycle biogéochimique de l'azote décrit les transformations appliquées à la conversion d'azote atmosphérique  $N_2$  en des formes d'azote utilisables. Ces réactions sont catalysées par des bactéries et sont présentées dans la Figure 1-1.

#### 1.1.1. Fixation de $N_2$

La fixation d'azote est catalysée par des bactéries dites diazotrophes présentes dans les sols et les océans. L'azote fixé est ensuite assimilé dans la biomasse. Cette biomasse peut être minéralisée pour rendre l'azote disponible (voir Figure 1-1). De nombreux genres bactériens peuvent être impliqués dans ce processus comme les genres *Azobacter* ou *Azospirillum*. Ces bactéries utilisent une enzyme appelée nitrogénase qui va consommer 16 ATP et 8 électrons



pour réduire une mole de  $N_2$ . Dans cette réaction, le  $N_2$  est utilisé comme accepteur final d'électrons et requiert un donneur d'électrons tels que diverses molécules organiques et le  $H_2$ .

### 1.1.2. Nitrification

La nitrification est le processus par lequel l'azote ammoniacal  $NH_4^+$  est converti en nitrate  $NO_3^-$ . Cette transformation se fait en deux étapes comme le montre la Figure 1-1 en faisant intervenir des microorganismes différents. La première étape qui est l'oxydation de  $NH_4^+$  en nitrite  $NO_2^-$  est appelée nitritation. Cette réaction est catalysée par des bactéries nitrifiantes par exemple les bactéries du genre *Nitrosomonas* en présence d' $O_2$ . Cet  $O_2$  sert d'accepteur final d'électrons de la réaction et  $NH_4^+$  de donneur.

La seconde étape est la nitratisation par laquelle le nitrite ( $NO_2^-$ ) est oxydé en nitrate ( $NO_3^-$ ) par des bactéries nitrifiantes. Ces bactéries sont par exemple du genre *Nitrobacter*. Cette étape se fait également en aérobiose en utilisant  $O_2$  comme accepteur d'électrons et  $NO_2^-$  comme donneur. Deux moles d' $O_2$  sont alors utilisées lors de l'oxydation complète d'une mole de  $NH_4^+$  en  $NO_3^-$  comme le présente la Figure 1-1.

### 1.1.3. Dénitrification

La dénitrification est un processus permettant le passage des  $NO_3^-$  à l'état d'azote peu réactif ( $N_2$ ) par réduction. Une première réduction va provoquer la formation de  $NO_2^-$  et une seconde réduction va libérer le  $N_2$ . Ces réductions, contrairement à la nitrification qui repose sur des genres très spécifiques, peuvent être réalisées par de nombreux genres bactériens par exemple les bactéries du genre *Pseudomonas*. Ici, le donneur d'électrons peut être de la matière organique ou  $H_2$ , par exemple avec  $NO_3^-$  ou  $NO_2^-$  comme accepteur d'électrons. Cinq moles d'électrons sont utilisées par  $NO_3^-$  dans ces réactions de réduction et la réaction complète représente une perte d'enthalpie libre standard de -1120 kJ/mol (Latham et al., 2016). C'est la réaction qui présente la plus grande variation d'enthalpie libre en absolu.

### 1.1.4. Anammox

La réaction Anammox, pour « anaerobic ammonium oxidation » (oxydation anaérobie d'ammonium) découverte beaucoup plus tardivement, permet de revenir à l'azote moléculaire, comme la dénitrification. Le  $NO_2^-$  va être utilisé comme accepteur final d'électrons lors de l'oxydation de  $NH_3$  utilisé comme donneur d'électrons (Figure 1-1). Ces

réactions sont réalisées exclusivement par des bactéries appartenant au phylum des *Planctomycetes* (Op den Camp et al., 2007).

### 1.2. Mécanismes de fixation de $N_2$ : les nitrogénases

La fixation biologique de  $N_2$  en  $NH_3$  est catalysée par des bactéries dites diazotrophes. Ces bactéries possèdent un complexe enzymatique dédié à cette réaction. Ce complexe est appelé nitrogénase et existe sous trois formes différentes. Les gènes permettant la formation de ces complexes enzymatiques sont très conservés entre les différentes espèces bactériennes et archées capables de fixer  $N_2$  (Fani et al., 2000). Les bactéries possédant des nitrogénases se retrouvent principalement dans les classes des *Protéobactéries* (*Azospirillum*, *Azotobacter*, *Azomonas*) et les Cyanobactéries (*Trichodesmium*, *Cyanothece*) comme le présente l'arbre phylogénétique de la Figure 1-2 (Bagali, 2012). Cet arbre nous montre également la présence de bactéries fixatrices de  $N_2$  chez les *Firmicutes* (*Clostridia*) et les *Euryarchaeota* (*Methanococcus*) (Boyd & Peters, 2013; Leigh, 2000).

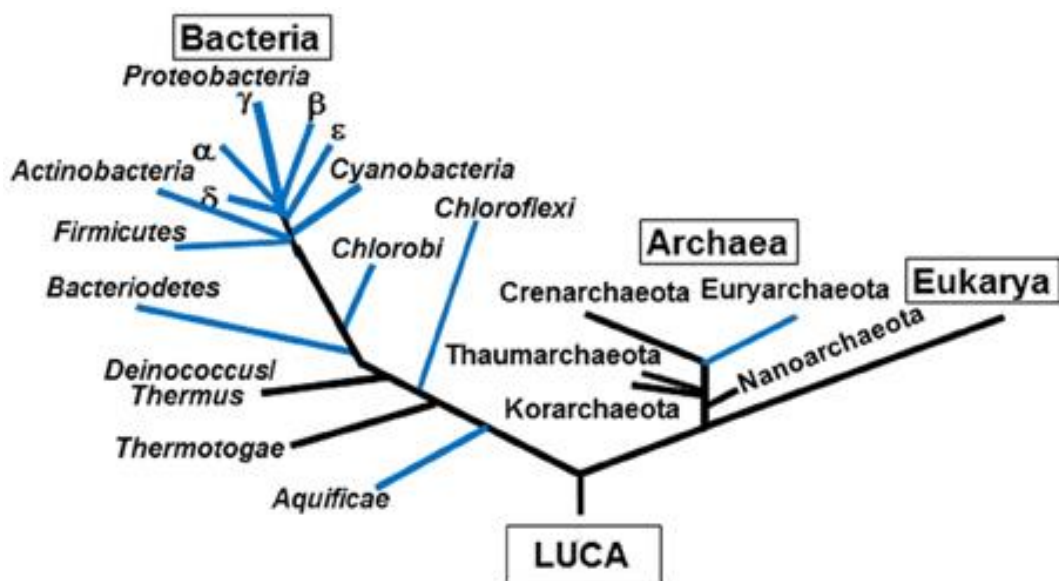


Figure 1-2 : Arbre phylogénétique de 3 domaines du vivant. Les embranchements/classes contenant des fixateurs de  $N_2$  sont colorés en bleu. (Boyd & Peters, 2013)

#### 1.2.1. Nitrogénase et les besoins pour la fixation de $N_2$

Ce complexe est composé de plusieurs sous-unités qui vont casser la triple liaison entre les deux atomes d'azote pour former  $NH_3$  comme le présente la Figure 1-3.

### 1.2.1.1 Présentation de la nitrogénase

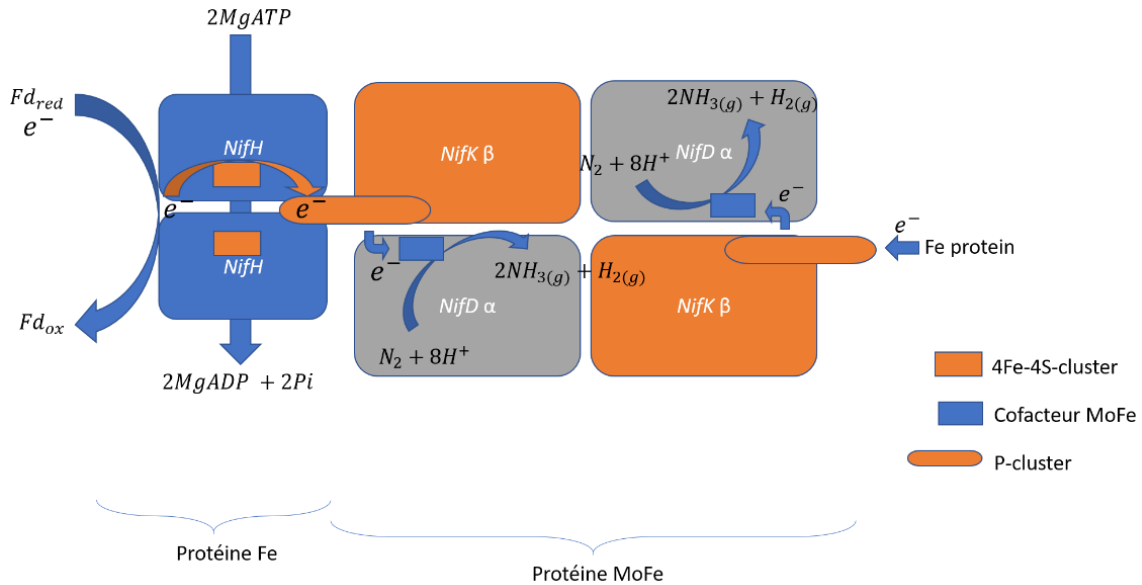
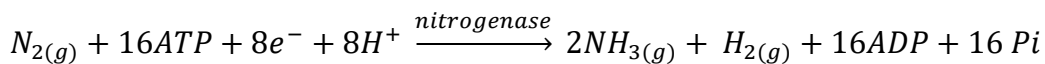


Figure 1-3 : Schéma du complexe nitrogénase : Complexe enzymatique permettant la fixation biologique de N<sub>2</sub>. Les sous-unités NifH (Fe protéine avec 4Fe-4S cluster), NifD (sous unité α de la protéine MoFe avec cofacteur MoFe pour la réduction de N<sub>2</sub>), et NifK (sous unité β de la protéine MoFe avec P-cluster) sont représentées, ainsi que le cofacteur MoFe de la sous-unité α qui sert de site actif de la fixation du N<sub>2</sub>. Cette figure a été réalisée à partir des écrits et des figures de Rees et al. (2005).

Le bilan de la réduction de l'azote moléculaire en NH<sub>3</sub> par la nitrogénase est présenté dans l'Équation 1 (Burgess & Lowe, 1996).

Équation 1: Réduction de l'azote par la nitrogénase MoFe



Il existe trois nitrogénases : la nitrogénase MoFe (à cofacteur MoFe), la nitrogénase VFe et la nitrogénase FeFe (Zhao et al., 2006). La nitrogénase MoFe est la plus répandue chez les bactéries fixatrices de N<sub>2</sub> tout en étant la nitrogénase demandant le moins d'ATP (Zhao et al., 2006). En effet, cette nitrogénase utilise 16 moles d'ATP par mole de N<sub>2</sub> (Équation 1) contre 24 moles d'ATP pour la nitrogénase VFe (Eady, 2003) et 40 moles d'ATP pour la FeFe nitrogénase (W. Zhang et al., 2023). La nitrogénase à cofacteur FeFe présente une production d'H<sub>2</sub> par NH<sub>3</sub> plus importante que les autres nitrogénases (Zhao et al., 2006). C'est également cette nitrogénase FeFe qui a la vitesse de fixation de N<sub>2</sub> la plus faible (Zhao et al., 2006). Ici, nous nous intéresserons à la nitrogénase MoFe pour présenter les mécanismes communs de ces nitrogénases. Cette nitrogénase est composée de deux protéines comme le présente la Figure 1-3. La première protéine est une protéine FeFe et la seconde est une protéine MoFe.

La protéine FeFe est un dimère et la protéine MoFe, qui possède deux sous-unités  $\alpha$  et deux sous-unités  $\beta$ , un tétramère (Rees et al., 2005).

Les 8 électrons et 16 ATP nécessaires à la fixation de  $N_2$  peuvent être obtenus par différents métabolismes tels que la respiration, la fermentation ou la photosynthèse (Burris & Roberts, 1993).

#### 1.2.1.2 Pouvoir réducteur et hydrogène à la nitrogénase

Les donneurs d'électrons utilisés pour la respiration peuvent être très variés avec l'oxydation de matière organique comme le glucose (aussi pour la fermentation) ou des molécules inorganiques comme l' $H_2$  (Burris & Roberts, 1993). En aérobiose, l' $O_2$  sert d'accepteur final d'électrons à la chaîne respiratoire et en anaérobiose, le  $NO_3^-$  ou  $SO_4^{2-}$  peuvent servir d'accepteur d'électron de la chaîne respiratoire.

Lors de la synthèse de  $NH_3$ , une mole d' $H_2$  est produite par mole de  $N_2$  fixée dans le complexe de la nitrogénase comme indiqué dans l'Équation 1. Cette production est causée par le mécanisme de fixation. En effet, les électrons issus des différents métabolismes présentés sont apportés à la nitrogénase par l'intermédiaire d'un cofacteur comme la ferrédoxine (Rees et al., 2005). Cette ferrédoxine est oxydée par un 4Fe-4S cluster présent dans la protéine FeFe (Rees et al., 2005). Deux moles d'ATP sont nécessaires pour permettre le transfert d'une mole d'électrons comme le présente la Figure 1-3 (Hickey, 2022). L'hydrolyse de ces ATP permet, en premier, le passage d'un électron du P-cluster au cofacteur MoFe (appelé aussi M-cluster) de la sous-unité  $\alpha$  (Hickey, 2022). Ensuite, le second ATP permet le passage de l'électron du 4Fe-4S-cluster au P-cluster. Un proton  $H^+$  se fixe alors au cofacteur MoFe et forme un atome d'hydrogène avec l'électron supplémentaire du cofacteur. D'après le modèle de Lowe Thorneley, cette étape est réalisée quatre fois avant la fixation de  $N_2$  sur le cofacteur MoFe (Lowe et al., 1984). Ces quatre fixations de proton sur le cofacteur entraînent la libération d'un  $H_2$  fixé sur un Fe du cluster M. Cette libération entraîne un état « super-réduit » de l'atome de Fe qui rend favorable la fixation de  $N_2$  (Hickey, 2022). En effet, la fixation du  $N_2$  sur l'atome de Fe, accompagnée de l'élimination d'une des liaisons de  $N_2$ , demande 67 kJ contre 170 kJ pour la libération d' $H_2$ , ce qui rend la réaction favorable et permet de casser la première liaison de  $N_2$  (Hickey, 2022). Après la fixation de  $N_2$  sur le cofacteur MoFe, des protons et électrons sont apportés pour casser les liaisons entre atomes d'azote et les réduire. Ainsi, d'après le modèle de Lowe et Thorneley, un premier  $NH_3$  est obtenu après sept transferts d'électrons entre la protéine FeFe et la protéine MoFe (Lowe et al., 1984). Un huitième électron et proton permet la libération du dernier  $NH_3$ .

Le H<sub>2</sub> produit et libéré pour permettre la liaison de N<sub>2</sub> au cofacteur MoFe, est ensuite recyclé par une hydrogénase qui l'oxyde. En présence d'O<sub>2</sub>, cet H<sub>2</sub> sert de donneur d'électrons pour la réduction d'O<sub>2</sub>. En anaérobiose, on aura par exemple SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> comme accepteur final d'électrons. Cette respiration permet le renouvellement de l'ATP et, en aérobiose, une diminution locale de la concentration en O<sub>2</sub> est favorable à l'activité de la nitrogénase (Gallon, 1981). Ce recyclage d'un H<sub>2</sub> permet une réduction du coût de formation de l'azote fixé (Hickey, 2022). On notera aussi que l'étape de fixation de N<sub>2</sub> sur le cofacteur est réversible, ce qui demande donc l'élimination du H<sub>2</sub> pour éviter qu'il ne reprenne la place du N<sub>2</sub>.

### 1.2.2. Inhibition de la nitrogénase

La nitrogénase peut être inhibée par différents facteurs. Elle est sensible à l'O<sub>2</sub> et à la présence de formes d'azote utilisables (Bagali, 2012; Dixon & Kahn, 2004).

#### 1.2.2.1 Inhibition des nitrogénases par l'azote assimilable

La présence de N assimilable est documentée comme étant inhibitrice de l'activité des nitrogénases (Yamashita et al., 2019). En effet, la fixation de N<sub>2</sub> par les bactéries est inhibée au-delà d'une concentration seuil d'environ 2μM de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> en milieu liquide (Darnajoux et al., 2022). Cette inhibition est liée à la régulation de la transcription des gènes *nif* (gène de la fixation de N<sub>2</sub> avec nitrogénase MoFe), *vnf* et *anf* pour les nitrogénases alternatives, mais très proches de *nif*, en réponse à la présence de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ou d'autres formes d'azote (exemples : NO<sub>3</sub><sup>-</sup> et glutamate). Chez la plupart des protéobactéries, cette régulation est faite par le système de régulation *nifLA* comme présenté en Annexes (Inhibition des nitrogénases) (W. Zhang et al., 2023).

#### 1.2.2.2 Inhibition des nitrogénases par O<sub>2</sub>

L'O<sub>2</sub> est un autre facteur connu pour être un inhibiteur important des nitrogénases. Sa présence peut entraîner des inhibitions de plusieurs types en fonction des quantités d'O<sub>2</sub> et des bactéries, comme pour la présence d'azote (Gallon, 1981; Hill, 1988). Cette inactivation peut être réversible ou non en fonction des espèces bactériennes et du mécanisme utilisé (Hill, 1988). Dans le cas des bactéries aérobies strictes, cet oxygène doit être maintenu à un niveau permettant l'utilisation d'O<sub>2</sub> comme accepteur final d'électron de la chaîne respiratoire pour le renouvellement de l'ATP mais à un niveau assez faible pour éviter l'inactivation de la nitrogénase. Les mécanismes d'inhibition des nitrogénases par l'oxygène sont présentés en annexe (Inhibition des nitrogénases).

### 1.3. Ecologie microbienne de la fixation de l'azote

Les bactéries responsables de la fixation de l'azote sont regroupées en bactéries symbiotiques et bactéries libres du sol selon le type d'interactions qu'elles présentent avec les plantes et le sol (Smercina et al., 2019).

#### 1.3.1. Bactéries symbiotiques fixatrice de $N_2$

Les bactéries symbiotiques, qui vivent dans les racines des plantes et échangent des nutriments avec elles, peuvent utiliser l'azote sous forme de  $N_2$  pour produire du  $NH_3/NH_4^+$  et des protéines.

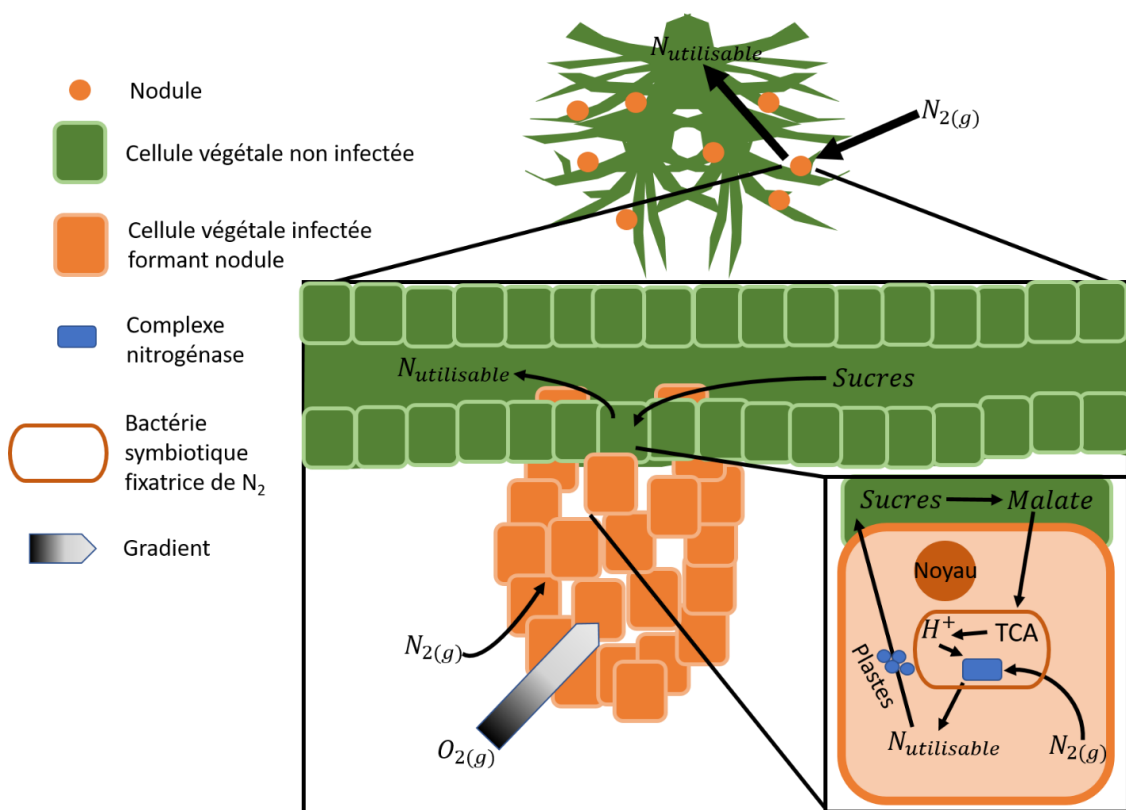


Figure 1-4 : Fixation biologique de  $N_2$  par les bactéries symbiotiques ayant formées des nodules avec une plante hôte. Présentation des échanges de carbone et d'azote entre les symbiotes. Cette figure a été réalisée à partir des écrits et des figures de Schwember et al. (2019) et Smercina et al. (2019).

#### 1.3.1.1 Symbiose et nodule

Les bactéries symbiotiques les mieux connues sont membres des genres *Rhizobium* et *Bradyrhizobium* qui se développent dans les racines des légumineuses (*Fabaceae*) dans des organes appelés nodules présentés dans la Figure 1-4 (Montañez et al., 1995). Ces nodules se forment à la suite d'un échange de signaux entre des bactéries nodulantes et la plante. La plante va libérer des flavonoïdes qui vont activer la transcription des gènes de nodulation des

bactéries (Nelson & Sadowsky, 2015). Ces gènes, appelés *nod* (*nodABC*), vont permettre l'expression d'un facteur de nodulation appelé NodD (protéine) (Nelson & Sadowsky, 2015), qui, une fois reconnu par la plante par un récepteur du facteur de nodulation bactérien (NFRs), permet l'endosymbiose et la formation d'un nodule. D'autres gènes participent à la reconnaissance entre la plante hôte et la bactérie nodulante. Cette signalisation spécifique est essentielle pour assurer la fixation symbiotique de N<sub>2</sub> tout en empêchant l'entrée de bactéries pathogènes (Nelson & Sadowsky, 2015). Dans l'eau, il existe également des exemples de symbioses. Par exemple, dans les écosystèmes tropicaux et tempérés, la fougère aquatique du genre *Azolla* s'associe à la cyanobactérie filamenteuse *Anabaena azollae* pour fixer l'azote (Burris & Roberts, 1993). Cette cyanobactérie est capable de fixer N<sub>2</sub> sans association symbiotique, mais augmente sa fixation lorsqu'elle est associée avec *Azolla* (Nicoletti, 2022). En effet, le nombre de cellules hétérocystes responsables de la fixation de l'azote chez *A. azollae* augmente lors de la symbiose, au détriment des cellules « normales » faisant la photosynthèse. Le déficit de carbone et d'énergie lié à la diminution de la photosynthèse est alors compensé par les échanges avec la plante hôte.

#### 1.3.1.2 Sources d'énergie et d'électrons pour la fixation de N<sub>2</sub>

Dans une association symbiotique, la plante fournit la source de carbone organique, notamment sous la forme de sucres aux bactéries avec lesquelles elle est en symbiose. Comme présenté en Figure 1-4, le carbone organique sert à la croissance des bactéries et apporte l'énergie nécessaire à la fixation de N<sub>2</sub> (White et al., 2007). Le N<sub>2</sub> fixé grâce à l'énergie du carbone organique est ensuite échangé avec la plante, sous forme de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> dans le cytosol, puis sous formes d'acides aminés (Glutamine, Asparagine) après un passage par les plastides de la cellule végétale dans laquelle a lieu la symbiose (White et al., 2007). Pour les cyanobactéries phototrophes comme *A. azollae*, le nombre de cellules hétérocystes responsables de la fixation de N<sub>2</sub> augmente lors de la symbiose, au détriment des cellules « normales » faisant la photosynthèse (Burris & Roberts, 1993). Le déficit de carbone et d'énergie lié à la diminution de la photosynthèse est alors compensé par les échanges avec la plante hôte (Burris & Roberts, 1993).

Les sucres apportés par la plante dans les nodules sont convertis en malate avant son assimilation par les bactéries comme présenté dans la Figure 1-4. Les bactéries fixatrices de N<sub>2</sub> utilisent ce carbone organique comme donneur d'électron (Delgado et al., 1993). Le succinate peut aussi être présent et utilisé dans les nodules (Smercina et al., 2019). L'accepteur final d'électrons utilisé est l'O<sub>2</sub> qui doit être maintenu à un niveau assez faible pour ne pas inhiber la fixation de N<sub>2</sub> mais suffisant pour la production d'énergie (Delgado et

al., 1993). En cas de perte de l'apport en  $O_2$ , c'est le métabolisme fermentaire qui prend le pas sur la respiration et qui permet l'apport d'énergie et de pouvoir réducteur pour la fixation de  $N_2$  (Delgado et al., 1993).

### 1.3.1.3 Protection face à l'oxygène

La fixation de l'azote étant sensible à l'oxygène, la formation de nodules et l'endosymbiose avec une plante apporte aux bactéries un environnement avec un gradient d' $O_2$  propice à la fixation de  $N_2$  comme visible sur la Figure 1-4. Ce gradient est permis par la sécrétion de léghémoglobine, une protéine qui capture et transporte l' $O_2$ , dans le nodule (Burriss & Roberts, 1993). Ce gradient permet à la fois la fixation de  $N_2$  par les bactéries fermentaires anaérobies et par les bactéries aérobies qui ont besoin d' $O_2$  pour leur respiration.

### 1.3.2. Bactéries libres du sol fixatrice de $N_2$

Dans le sol, d'autres micro-organismes peuvent fixer l'azote moléculaire ( $N_2$ ) sans endosymbiose avec les plantes, ce sont les bactéries libres du sol (Bagali, 2012). La communauté des bactéries fixatrices libres du sol comprend différents types métaboliques : des chimiolithotrophes, des hétérotrophes ou des phototrophes (Smercina et al., 2019). Ces différents types permettent de répondre à la demande en énergie de la fixation de  $N_2$ . En effet, la fixation d'un gramme d'azote a besoin de l'équivalent de 28 à 400g de glucose comme source d'énergie et de carbone pour les bactéries libres du sol (Dynarski & Houlton, 2018). Cette demande correspond à un équivalent de 10 g de glucose par gramme d'azote fixé dans le cas d'associations symbiotiques entre bactéries et plantes (Dynarski & Houlton, 2018). Cette efficacité différente pour l'utilisation du carbone pourrait être en partie due aux besoins en énergie des méthodes de protection de la nitrogénase à différents facteurs comme l' $O_2$  qui sont pris en charge par la plante dans le cas de la fixation symbiotique (Smercina et al., 2019). On notera également que la fixation par les bactéries libres, bien que moins efficaces pour l'utilisation du carbone, représente au moins autant d'azote fixé que les bactéries symbiotiques en quantité fixée dans les sols à échelle globale (Smercina et al., 2019). On retrouve ces bactéries fixatrices libres sur les racines des plantes ou à proximité de celles-ci, mais on en retrouve aussi en absence de plantes si des sources d'énergie et de carbone suffisantes sont disponibles (Smercina et al., 2019).



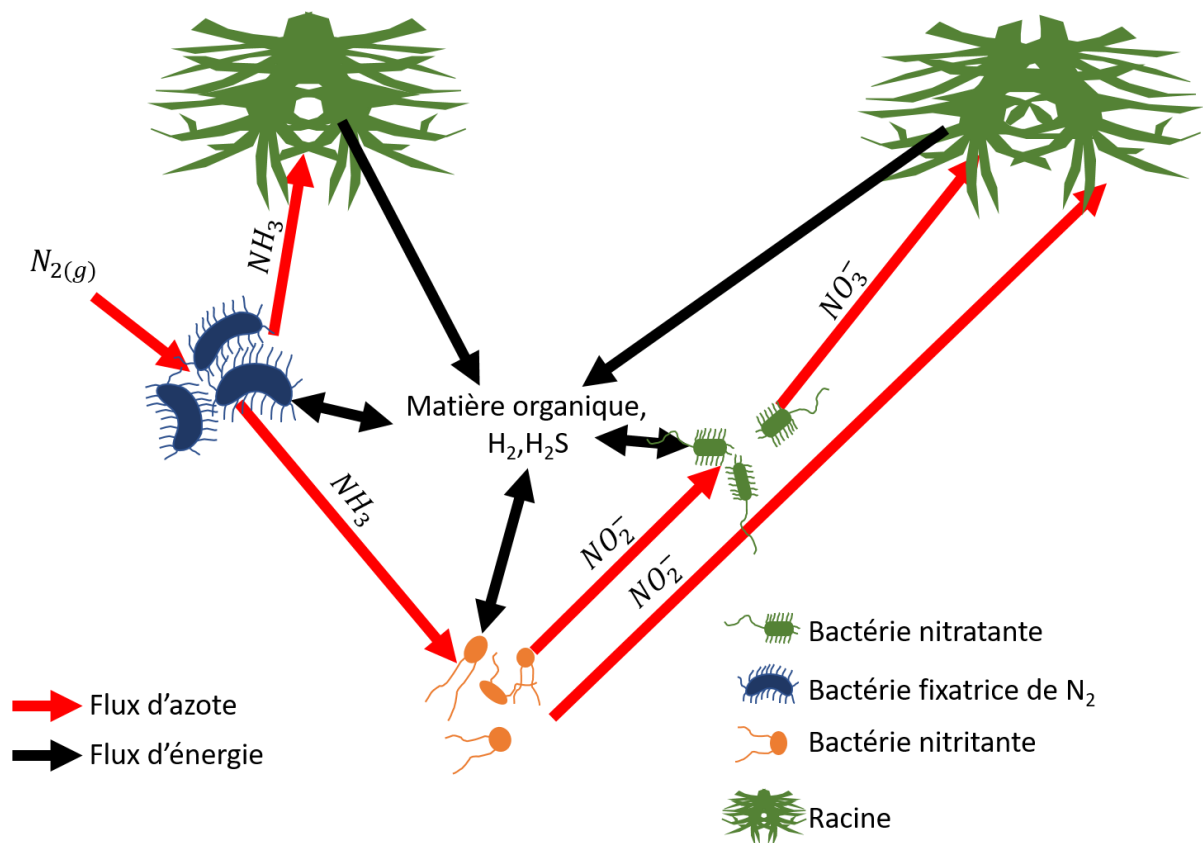


Figure 1-5 : Cycle de l'azote dans les sols et interactions entre bactéries fixatrices libres et les plantes.

### 1.3.2.1 Source d'énergie

Pour obtenir l'énergie et le pouvoir réducteur nécessaires à la fixation, les microorganismes mettent en œuvre plusieurs mécanismes. Par exemple, les bactéries hétérotrophes peuvent utiliser la matière organique des organismes morts et les exsudats des plantes comme sources de carbone organique (Smercina et al., 2019).

#### 1.3.2.1.1. En présence d' $O_2$

##### 1.3.2.1.1.1. Hétérotrophes

En présence d'accepteur d'électrons comme  $O_2$ , la matière organique permet l'apport d'énergie et de pouvoir réducteur. Les bactéries du genre *Azotobacter*, qui est un genre couramment retrouvé dans les communautés microbiennes fixant l'azote de manière asymbiotique (Bagali, 2012) ont, par exemple, un métabolisme strictement aérobie. Elles utilisent l' $O_2$  comme accepteur d'électrons en présence de source d'énergie suffisante (Moshiri et al., 1994). L'énergie est apportée par la matière organique du sol comme les exsudats de certaines plantes contenant par exemple des sucres.

Toutes ces sources d'énergie ou de carbone ne sont pas équivalentes pour réduire le  $N_2$  (Yu & Zhuang, 2020). La nature de la molécule organique utilisée a en effet un impact sur la fixation

de N<sub>2</sub>. À titre d'exemple, l'efficacité de fixation est plus élevée avec le glucose qu'avec l'acétate (Rao, 1978). Le rapport C/N du substrat sur l'azote assimilable a également un impact sur la fixation de N<sub>2</sub>. Dans les travaux de Inomura et al. (2018), la fixation de N<sub>2</sub> a été évaluée chez *Azotobacter vinelandii* en présence de différents niveaux de saccharose, de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> et d'O<sub>2</sub> (Inomura et al., 2018). Ils ont pu déterminer qu'en conditions microaérobies (5% O<sub>2</sub>) la fixation de N<sub>2</sub> apporte plus de 80% de l'azote de la biomasse des bactéries pour un rapport C/N supérieur à 8. En conditions aérobies, la fixation de N<sub>2</sub> est alors devenue la source principale d'azote de la biomasse avec un rapport C/N supérieur à 14 (Inomura et al., 2018).

#### 1.3.2.1.1.2. Chimolithotrophes

En absence de carbone organique, le CO<sub>2</sub> peut servir de source de carbone pour la croissance des bactéries. Dans ce cas, la fixation d'azote est associée à l'utilisation de molécules inorganiques comme donneurs d'électrons (H<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>S) (Bertics et al., 2013). Parmi les bactéries chimolithotrophes, on retrouvera surtout des bactéries hydrogénotrophes comme *Xanthobacter autotrophicus* qui peut fixer N<sub>2</sub> et CO<sub>2</sub> à partir d'H<sub>2</sub> et pouvant utiliser O<sub>2</sub> en faible quantité comme accepteur d'électrons. Le soufre (S) a également été observé comme donneur d'électron pour des bactéries isolées de résidus miniers (Sun et al., 2020). D'autres éléments minéraux comme l'antimoine (Sb) et l'arsenic (As) ont montré un potentiel de donneurs d'électrons pour des bactéries fixatrices d'azote (Y. Li et al., 2023).

#### 1.3.2.1.2. En conditions anaérobies

##### 1.3.2.1.1.1. Hétérotrophes

En conditions anaérobies, en présence de matière organique, d'autres accepteurs d'électrons peuvent être disponibles comme le sulfate SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> utilisés par les bactéries sulfato-réductrices. Des bactéries de ce type ont été retrouvées dans des sédiments de marais salants et reportées comme fixatrices anaérobies de N<sub>2</sub> (Nedwell & Azni bin Abdul Aziz, 1980). Des processus de fermentation peuvent aussi se mettre en place à partir de la matière organique du sol. La Figure 1-5 présente les interactions existant entre bactéries libres du sol et les racines des plantes (Smercina et al., 2019). Ici, les racines peuvent être source d'énergie avec l'apport de matière organique dans le sol pour les bactéries hétérotrophes (Smercina et al., 2019). On retrouve, par exemple, un métabolisme fermentaire chez les familles *Heliobacteriaceae* et *Clostridia* (Jia et al., 2020).

#### 1.3.2.1.1.2. Chimiolithotrophes

En absence de matière organique, ce sont des processus chimiolithotrophie avec l'utilisation d' $H_2$  (par exemple issu de la fermentation) qui servent de donneur d'électrons à la chaîne respiratoire microbienne (Burriss & Roberts, 1993). Pour l'accepteur final d'électrons, les bactéries sulfato-réductrices pouvant utiliser le  $H_2$  comme donneur d'électrons utilisent  $SO_4^{2-}$  pour obtenir l'énergie nécessaire à la fixation d'azote (Bertics et al., 2013). On peut citer le genre des *Desulfovibrio* qui contient plusieurs espèces ayant montré des capacités dans l'utilisation d' $H_2$  comme donneur et  $SO_4^{2-}$  comme accepteur d'électrons en absence de carbone organique et en parallèle d'une fixation de  $N_2$  (Lespinat et al., 1987).

#### 1.3.2.1.3. Phototrophes

En absence d' $O_2$  ou dans le cas où il n'y aurait pas assez de matière organique pour servir de source d'énergie, certaines bactéries phototrophes utilisent la photosynthèse pour produire de l'énergie (Burriss & Roberts, 1993). Ceci concerne certaines cyanobactéries, les bactéries de la famille des *Heliobacteria* et les bactéries sulfureuses ou non sulfureuses (vertes et pourpres) (Gallon, 2001). Elles peuvent éventuellement utiliser des donneurs d'électrons inorganiques comme  $H_2$  dans un mécanisme respiratoire de photolithotrophie (Burriss & Roberts, 1993). Enfin, des photohétérotrophes comme certains genres de la famille des *Rhodospirillaceae* peuvent utiliser à la fois du carbone organique et l'énergie de la lumière pour la fixation de  $N_2$  (Baldani et al., 2014).

#### 1.3.2.2 Protection face à l'oxygène

Pour protéger les nitrogénases de la présence d' $O_2$ , plusieurs stratégies sont mises en place par les microorganismes. Une première protection consiste à s'éloigner des zones dans lesquelles les concentrations d' $O_2$  sont élevées pour les bactéries mobiles (Gallon, 1981). Ces bactéries peuvent ainsi migrer vers des zones dans lesquelles la pression en  $O_2$  permet la fixation de  $N_2$ . C'est notamment cette stratégie qu'utilisent de nombreuses bactéries anaérobies strictes (Gallon, 1981). Une autre stratégie consiste à utiliser une protection autour des nitrogénases. C'est par exemple le cas des hétérocystes retrouvées chez les cyanobactéries (Burriss & Roberts, 1993). De plus, certaines bactéries aérobies strictes comme certains *Azotobacter* ont besoin d' $O_2$  comme accepteur final d'électrons dans leur chaîne respiratoire (Gallon, 1981). Les *Azotobacter*, et notamment *A. vinelandii*, possèdent une protéine FeSII qui permet de réduire le risque d'inactivation des nitrogénases par  $O_2$  par un changement de conformation de celles-ci (Moshiri et al., 1994). Ce changement de conformation inactive la nitrogénase mais protège les sites actifs normalement détruits par

O<sub>2</sub>. Dans d'autres cas, cette protection peut être apportée par la présence d'une hydrogénase unidirectionnelle pour des bactéries oxydantes d'H<sub>2</sub>. Cette hydrogénase va permettre l'oxydation du H<sub>2</sub> produit en parallèle de la fixation de N<sub>2</sub>. Les électrons récupérés lors de cette oxydation vont alors passer dans la chaîne respiratoire jusqu'à l'O<sub>2</sub>, permettant la régénération de l'ATP utilisé pour la formation d'H<sub>2</sub> et réduisant la pression en O<sub>2</sub> (Gallon, 1981). Enfin, dans certains cas isolés comme *Anabaena flos-aqua*, une expression en continu de la nitrogénase permet de palier à la perte de nitrogénase en continu en présence d'O<sub>2</sub> (Gallon, 1981).

### 1.3.3. Fixation biologique de N<sub>2</sub> dans les eaux

Comme vu avec *Anabaena azollae*, la fixation de l'azote est également possible dans les océans et dans les eaux en général. Cette fixation de l'azote est presque identique à celle des bactéries du sol (Bagali, 2012).

#### 1.3.3.1 Sources d'énergies et d'électrons

Les cyanobactéries sont des micro-organismes fixant l'azote avec un métabolisme phototrophe et à partir d'H<sub>2</sub> ou de matière organique (Meyer et al., 1978). Elles sont responsables de la majeure partie de la fixation biologique de l'azote dans les océans et dans les eaux en général (Bagali, 2012). Les bactéries des genres *Cyanothece* et *Trichodesmium* sont des exemples de cyanobactéries présentes dans les océans et capables de fixer N<sub>2</sub> (Bagali, 2012). Les *Cyanothece* sont des cyanobactéries photohétérotrophes qui utilisent une source de carbone organique pour la photosynthèse et la fixation de N<sub>2</sub> (Reddy et al., 1993). Les bactéries du genre *Trichodesmium* sont capables d'utiliser le CO<sub>2</sub> comme source de carbone pour la photosynthèse (Hutchins et al., 2007). *Trichodesmium* est capable d'utiliser la lumière et la respiration comme source d'électron pour la fixation de N<sub>2</sub> et CO<sub>2</sub> (Kranz et al., 2010). Pour compléter les besoins en énergie et en électrons pour la fixation de l'azote, ces cyanobactéries peuvent se reposer sur l'utilisation de donneurs d'électrons tels que H<sub>2</sub> (Bothe et al., 2010). Comme pour les bactéries fixatrices libres du sol, elles vont entrer en interaction avec d'autres bactéries non fixatrices d'azote mais capables d'apporter d'autres éléments, comme la cyanobactérie UCYN-A qui dépend d'interactions pour obtenir son carbone (Bagali, 2012; Tripp et al., 2010). Ces interactions sont possibles entre cyanobactéries et d'autres bactéries, des plantes, ou bien même des champignons (Bagali, 2012).

D'autres bactéries sont également capables de fixer le N<sub>2</sub> avec des procédés de photosynthèse et de respiration en milieu aquatique. C'est le cas des bactéries sulfureuses (vertes et pourpres) de la famille des *Chlorobiaceae* (verte) (Wahlund & Madigan, 1993) ou la famille des

*Chromatiaceae* (Stacey et al., 1992). Ces bactéries sont capables de photosynthèse anoxygénique qui va permettre de garder la protection à l'O<sub>2</sub> de la nitrogénase tout en utilisant le CO<sub>2</sub> comme source de carbone, la lumière et la respiration du sulfure d'hydrogène (H<sub>2</sub>S) ou H<sub>2</sub> comme source d'énergie (Fay, 1992). L'accepteur final d'électrons est alors le CO<sub>2</sub>.

### 1.3.3.2 Protection face à l'oxygène

Pour les cyanobactéries, la protection face à l'O<sub>2</sub> est permise par la spécialisation de certaines cellules en hétérocystes (C.-C. Zhang et al., 2006). Ces cellules spécialisées possèdent des parois plus épaisses et sont dépourvues de capacité de photosynthèse, évitant ainsi la production cellulaire d'O<sub>2</sub> (C.-C. Zhang et al., 2006). La formation de ces hétérocystes est liée à la disponibilité en azote. Un faible niveau d'azote entraîne en effet la transcription du gène *hetR* responsable de la formation d'une enveloppe à deux couches (une couche de glycolipides et une de polysaccharide) qui permet la protection des nitrogénases vis-à-vis de l'O<sub>2</sub> (Nicolaisen et al., 2009).

Pour les bactéries sulfureuses pourpres et vertes et d'autres cyanobactéries, cette protection peut aussi se faire par une photosynthèse anoxygénique (Madigan, 1995). Le mécanisme utilise un autre donneur d'électrons que l'eau, sans production d'O<sub>2</sub> toxique pour les nitrogénases.

## 2. ENGRAIS AZOTES

Pour subvenir aux besoins des plantes en azote et ainsi garantir des rendements de cultures élevés dans un contexte d'augmentation de la population, l'utilisation d'engrais azotés est devenue un pilier de l'agriculture moderne. Les engrais azotés peuvent être classés en deux catégories : les engrais chimiques et les engrais organiques. La production d'engrais chimiques repose actuellement sur le procédé Haber Bosch qui est un procédé physico-chimique permettant de fixer l'azote atmosphérique pour produire du NH<sub>3</sub>. Les engrais organiques sont pour la plupart issus du recyclage de déchets agricoles (via le lisier, le compost, le digestat, etc.), mais de nouveaux procédés microbiens émergents pourraient permettre la production d'engrais organiques azotés par fixation biologique de l'azote atmosphérique.

## 2.1. Production industrielle d'engrais chimique

### 2.1.1. Le procédé Haber Bosch

#### 2.1.1.1 Présentation du procédé Haber-Bosch

Le procédé Haber-Bosch a grandement participé à la révolution agricole à partir du début du XX<sup>ème</sup> siècle en permettant l'industrialisation de la production d'engrais azotés (Kissel, 2014). Il a été découvert par Fritz Haber et Carl Bosch a permis son industrialisation (Kandemir et al., 2013). Ce procédé repose sur la réduction de  $N_2$  en  $NH_3$  en présence d' $H_2$  sur un catalyseur à base de fer dans des conditions de pression et température élevées. Les conditions optimales pour la réaction d'après les travaux de Fritz Haber (1908) sont obtenues à des pressions de 100-200 atm et une température de 500°C (Kissel, 2014) (Figure 1-6). Ce procédé permet aujourd'hui la production de 150 Mt/an de  $NH_3$  très majoritairement utilisées dans la synthèse d'engrais chimique (80-85%  $NH_3$  produit pour engrais) (U.S. Geological Survey, 2022). « Près de 50% de la production alimentaire dans le monde est liée aux engrais à base de  $NH_3$  » (Leigh Krietsch Boerner, 2021).

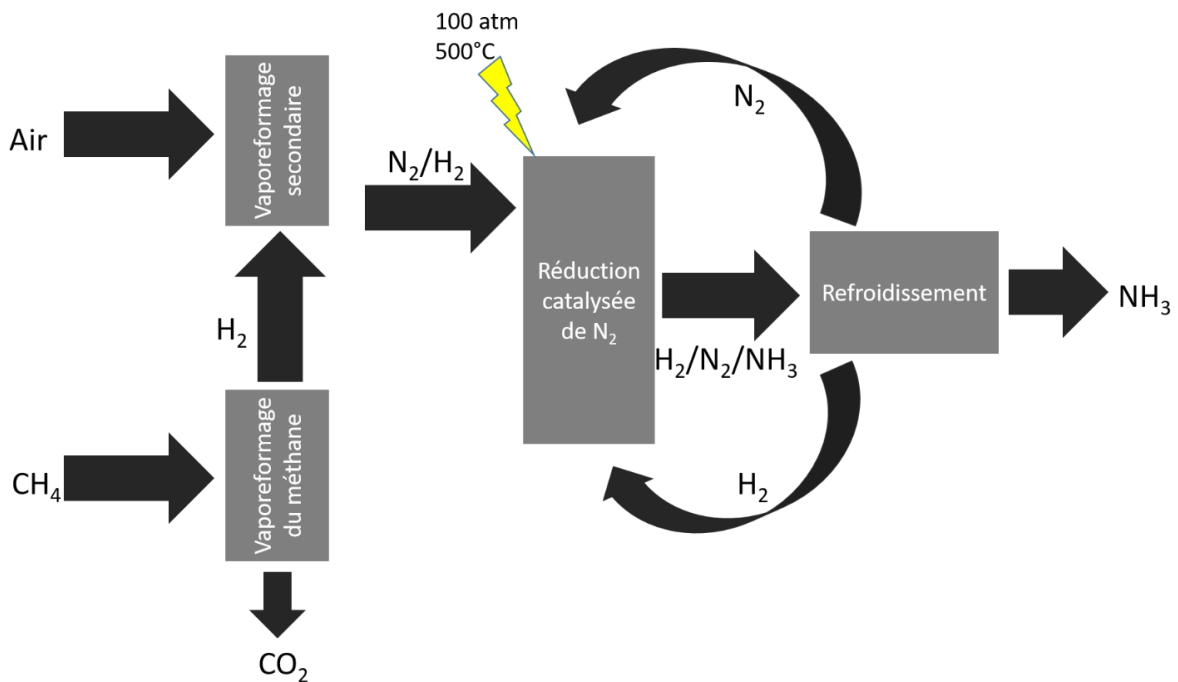


Figure 1-6 : Schéma simplifié du procédé Haber-Bosch. (Kissel, 2014; Rouwenhorst et al., 2021)

#### 2.1.1.2 Consommation d'énergie et rejet de gaz à effet de serre

Le procédé Haber-Bosch nécessite donc de grandes quantités d' $H_2$  et d'énergie pour atteindre les conditions de pressions et de températures optimales. De ce fait, ce procédé est reconnu comme énergivore, consommant près de 1 à 2% de l'énergie produite annuellement dans le

monde (Humphreys et al., 2021; MacFarlane et al., 2020). Il est également reconnu comme étant responsable de près de 1,2% des émissions mondiales de gaz à effet de serre du fait de la synthèse d' $H_2$  (MacFarlane et al., 2020). En effet, cette synthèse repose très largement sur les procédés de reformage à la vapeur du méthane ou du craquage du charbon qui sont tous deux sources d'importants rejets de gaz à effet de serre (IEA, 2022).

Pour réduire les émissions de ce procédé, il est possible d'utiliser l'électrolyse de l'eau pour produire le  $H_2$  nécessaire au procédé Haber Bosch. Il est notamment envisagé de convertir de l'énergie verte en  $H_2$ , mais les quantités d' $H_2$  nécessaires restent très importantes et en 2022 seul 4 % du  $H_2$  produit dans le monde provient de l'électrolyse de l'eau (IEA, 2022).

### 2.1.2. Les alternatives à Haber Bosch

#### 2.1.2.1 Réduction électrocatalysée de $N_2$

De nouveaux procédés visent à réduire les besoins en énergie en abaissant la température et la pression nécessaires pour la réaction de réduction de  $N_2$  grâce à l'électrocatalyse (electrocatalytic Nitrogen Reduction Reaction). Ces procédés reposent sur des catalyseurs très spécifiques et des matériaux d'électrodes particuliers qui permettent l'augmentation des rendements encore faibles (Huang et al., 2023). Ces rendements faibles s'expliquent par la difficulté d'avoir des catalyseurs sélectifs de la fixation de  $N_2$  par rapport à la production d' $H_2$ . De ce fait, ces procédés de réduction électro-catalytique en sont encore au stade des travaux de recherche et ne sont pas industrialisés (Huang et al., 2023).

#### 2.1.2.2 Réduction et oxydation de $N_2$ dans un plasma

D'autres procédés visent à proposer des alternatives moins gourmandes en énergie et reposent sur l'utilisation de plasma (Cherkasov et al., 2015). On distingue les procédés à plasma chaud et les procédés à plasma froid. Dans ces procédés, le produit final est l'acide nitrique  $HNO_3$  ou  $NH_3$  comme dans le procédé Haber Bosch. La fixation de  $N_2$  à plasma chaud (procédé Birkeland-Eyde) est le procédé le plus ancien des deux (H. Chen, Yuan, et al., 2021). Pour ce faire, de l'air est passé au travers d'un arc électrique avant la mise en contact avec de l'eau. Ce type de procédé est surtout utilisé pour la production de  $NO_3^-$  utilisable comme engrais avec une consommation de 3,4 à 4,1 MJ/mol  $HNO_3$  (Cherkasov et al., 2015). Avec optimisation, il est possible d'atteindre 0,9 MJ/mol (B. Patil et al., 2016). Pour les procédés à plasma froid, l'oxydation de  $N_2$  est possible, mais la réduction en  $NH_3$  également. Ce procédé peut atteindre une consommation énergétique de 0,29 MJ/mol  $HNO_3$  (Cherkasov et al., 2015) et 0,5 MJ/mol  $NH_3$  (B. Patil et al., 2016). A titre de comparaison, le procédé Haber-Bosch a une consommation de 0,5 MJ/mol  $NH_3$  (Huang et al., 2023). Les procédés utilisant des plasmas

chauds sont donc encore trop coûteux en énergie pour servir d'alternatives sérieuses au procédé Haber-Bosch, mais ils présentent l'avantage de pouvoir se passer de l'apport en H<sub>2</sub>. Pour les procédés à froid, les résultats montrent des fixations moins coûteuses en énergie et des rejets moindres en gaz à effet de serre. Cependant, ces procédés en sont encore aux stades expérimentaux (H. Chen, Yuan, et al., 2021) et en 2021, moins de 1 % du NH<sub>3</sub> produit provenait de procédés alternatifs à Haber-Bosch et à faible rejet en carbone (IEA, 2021). A titre de comparaison, la production de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> et NO<sub>3</sub><sup>-</sup> représentait un marché de 1,5 milliard de dollars contre 10,4 milliards pour le marché de NH<sub>3</sub> en 2021 (Simoes & Hidalgo, 2011).

### 2.1.2.3 Réduction photocatalysée de N<sub>2</sub>

Les procédés de réduction photocatalysée du N<sub>2</sub> sont une autre alternative intéressante sans émission de CO<sub>2</sub>. Ces procédés s'inspirent de la photosynthèse artificielle ou certains mécanismes de la photosynthèse sont remplacés par des catalyseurs chimiques comme TiO<sub>2</sub>. Cependant, ces procédés montrent des efficacités énergétiques encore faibles (Ziegenbalg et al., 2021). La photosynthèse artificielle qui utilise l'énergie solaire pour séparer le H<sub>2</sub> et le O<sub>2</sub> de l'eau (Berardi et al., 2014), a inspiré l'idée d'employer des catalyseurs appropriés, par exemple TiO<sub>2</sub>, pour rompre la triple liaison du N<sub>2</sub> lorsqu'il est mis en contact avec le H<sub>2</sub>, en vue de produire du NH<sub>3</sub> comme sur une nitrogénase (Ziegenbalg et al., 2021). Les premiers catalyseurs à cet effet tel que ZnO<sub>2</sub>, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ou TiO<sub>2</sub>, ont été découverts dès les années 1940, bien que la production de NH<sub>3</sub> par ce procédé demeure encore à un stade expérimental (Ziegenbalg et al., 2021).

### 2.1.3. Engrais chimique, utilisation et impact sur l'environnement

L'utilisation des engrais chimiques, que ce soit pour l'apport d'azote, phosphore, potassium ou soufre, a joué un rôle important dans la révolution agricole survenue entre le XVIII<sup>ème</sup> et XIX<sup>ème</sup> siècle. Ces engrais ont permis d'améliorer les rendements des cultures de céréales, par exemple, une augmentation d'un facteur cinq entre 1950 et 2007-2008 en Inde (R. Prasad, 2009).

#### 2.1.3.1 Impact sur la NUE

L'utilisation d'engrais azotés a toutefois causé d'importants problèmes environnementaux. En effet, l'azote apporté aux cultures n'est jamais complètement assimilé par les plantes (Qiu et al., 2022) et l'excès d'azote dans le sol peut générer des problèmes de pollution de l'eau par les dérivés azotés comme les nitrates (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) causant une dégradation des écosystèmes aquatiques (Pimentel, 1996). L'efficacité de l'utilisation de l'azote par les plantes est appelée



Nitrogen Use Efficiency (NUE) en anglais. Il permet de connaître la part d'engrais retrouvée dans la plante et celle qui est perdue dans le sol ou l'atmosphère (formation de  $N_2O$  par exemple) (Liao et al., 2021). La « NUE » dépend du type de plante cultivée (Qiu et al., 2022). Ainsi, elle n'est que de 35% pour les céréales (Omara et al., 2019) alors qu'il est en moyenne de 42% pour l'ensemble des cultures (X. Zhang et al., 2015). La NUE est variable d'une région à l'autre, avec un niveau plus élevé dans les pays développés que dans ceux en voie de développement (Udvardi et al., 2021). Les valeurs de NUE indiquent que la majorité de l'azote apporté sous forme d'engrais n'est pas assimilé par les plantes et participe à la pollution des eaux et des sols ainsi qu'au phénomène d'eutrophisation (Pimentel, 1996). De plus, il a été montré que la NUE diminuait avec l'utilisation d'engrais chimiques. Ainsi, une diminution de près de 50% de la NUE a été rapportée lors de l'utilisation d'engrais chimiques azotés ou complétés avec du potassium sur une période de presque 40 ans (Zhu et al., 2023).

#### 2.1.3.2 Changement de communauté microbienne et émission de gaz à effet de serre

L'apport d'engrais participe à l'enrichissement des sols en bactéries ne fixant pas l'azote, ce qui pourrait contribuer à augmenter les besoins en azote de cultures suivantes (Berthrong et al., 2014; H. Chen, Zheng, et al., 2021). Cette perte de bactéries fixatrices de  $N_2$  est liée à la réduction de la NUE observée.

Enfin, l'utilisation des engrais chimiques azotés entraîne les émissions de  $N_2O$  et  $CH_4$ , d'autres gaz à effet de serre (Ma et al., 2022). Il y a également une voie de perte d'azote qui diminue la NUE avec la volatilisation de  $NH_3$  et le lessivage des  $NO_x$  qui participe à l'eutrophisation des cours d'eau (Ma et al., 2022). Pour répondre aux besoins d'une utilisation plus durable des engrais, une amélioration de la NUE est recherchée par de meilleures pratiques agricoles (couplage de culture, moins d'apport d'engrais) ou l'utilisation d'engrais organiques.

## 2.2. Engrais organiques

Les engrais organiques présentent une alternative intéressante et/ou un complément aux engrais chimiques. Ils permettent de réduire l'impact environnemental de l'agriculture grâce à une meilleure NUE qu'avec les engrais chimiques (Zhu et al., 2023). Ces engrais comprennent les composts, les digestats, les lisiers ou les bio-engrais à base de micro-organismes (Chew et al., 2019). Comme les engrais chimiques, tous ces engrais ne sont pas utilisés pour les mêmes apports (Chew et al., 2019).

### 2.2.1. Intérêts des engrais organiques

Lors de l'utilisation conjointe d'engrais organiques et chimiques, des améliorations de NUE ont été observées. Ainsi, les travaux de Zhu et al. (2023) ont montré qu'un engrais composé de 20-30% d'engrais organiques complété d'engrais chimiques avait permis une meilleure NUE qu'avec des engrais séparés (Zhu et al., 2023). Ce résultat peut s'expliquer par la différence des cinétiques d'utilisation des éléments apportés entre les deux types d'engrais. En effet, les engrais organiques apportent des éléments plus lentement assimilables par la plante que les engrais chimiques (Sharma, 2017). Ainsi, avec un apport réduit d'engrais chimiques, consommés en premier, son temps de séjour dans le sol est réduit, de même que le risque de lessivage (Muschiatti-Piana et al., 2020). Les composés organiques restants dans le sol peuvent ensuite être utilisés après transformation par la biomasse du sol et ainsi participer à l'amélioration de la NUE.

### 2.2.2. Les grands types d'engrais organiques

#### 2.2.2.1 Lisiers

Les lisiers sont des effluents d'élevage composés principalement de déjection et d'eau. Par extension, on parlera de lisiers verts pour les lisiers végétaux (Carr et al., 2020). Les lisiers sont une source importante d'azote et de phosphate nécessaires à la croissance des plantes (Chew et al., 2019). Pour l'apport d'azote, les lisiers présentent les avantages de contenir plusieurs formes d'azote utilisables par les plantes comme l'urée ainsi que des bactéries aidant à son assimilation (Ritika & Utpal, 2014). Cet apport très riche est toutefois remis en cause pour son apport trop riche qui peut participer au phénomène d'eutrophisation et d'émission de gaz à effet de serre en cas de mauvaise gestion (Zubair et al., 2020). De plus, ces lisiers provenant de l'élevage, la présence d'antibiotique dans les apports participent au développement de l'antibiorésistance de certaines souches pathogènes (Zubair et al., 2020). On peut également retrouver certaines souches pathogènes, par exemple *Escherichia coli* O157:H7, dans les lisiers (Loss et al., 2019). Il est donc proposé d'utiliser ces lisiers riches en nutriments après une étape de digestion anaérobie et fermentation pour récupérer des digestats mieux équilibrés, en lien avec une production de biogaz ou du compost (Zubair et al., 2020).

#### 2.2.2.2 Compost

Les composts sont issus de la digestion de matière organique par des processus biologiques aérobies (Ayilara et al., 2020). C'est l'association de plusieurs organismes (exemples : bactéries, champignons, vers) qui permet la transformation de la matière organique (De Corato, 2020). La matière apportée contient de nombreux éléments organiques, avec une

majorité de carbone. En effet, un rapport de C/N de 30/1 dans la matière à composter est optimal pour le compostage (Ayilara et al., 2020). Les déchets utilisés pour la production de ces composts peuvent être des déchets agricoles ou d'autres sources de matières organiques (De Corato, 2020). L'utilisation de compost, par exemple de déchets municipaux, en présence d'engrais chimiques azotés, permet une meilleure assimilation des nutriments par la plante et le sol (Rajaie & Tavakoly, 2016). On retrouve également un grand nombre de microorganismes qui peuvent, au même titre que les lisiers, participer à une meilleure utilisation de l'azote apporté par les engrais chimiques (Ayilara et al., 2020). Des composts reposant sur des communautés enrichies peuvent même être utilisés pour réduire les risques d'infections de certaines plantes (De Corato, 2020). On peut noter l'exemple de plants de tomate avec utilisation de compost pour éviter les infections par *Fusarium oxysporum* (De Corato, 2020). Cependant, dans certains cas, la présence de pathogènes est également possible du fait du manque de contrôle sur les communautés biologiques (Ayilara et al., 2020). Un autre inconvénient est la durée nécessaire pour que les transformations biologiques du compost aient lieu, surtout en présence de déchets difficilement dégradables comme le bois (Ayilara et al., 2020). En effet, des durées allant de plusieurs semaines à plusieurs mois peuvent-être observées en fonction des méthodes de compostage et des déchets compostés (Misra et al., 2003).

#### 2.2.2.3 Digestat

On peut aussi parler de l'utilisation de digestats comme engrais qui apportent à la fois matière organique et bactéries (Samoraj et al., 2022). Cette source de matière organique provient de la digestion anaérobie de déchets pour la production de méthane (Tallou et al., 2020). Ce méthane est valorisable dans la production d'énergie et les digestats produits (liquides et solides) sont utilisables en fonction des besoins des plantes (Samoraj et al., 2022). Cet engrais organique est très riche en azote, avec un taux de près de 20% de la matière sèche et un rapport C/N de 1,2 pour du digestat liquide (Albuquerque et al., 2012). L'azote est principalement sous forme de  $\text{NH}_4^+$  dans les digestats avec une teneur de près de 70% de l'azote total ce qui en fait un très bon apport pour les plantes mais une possible source d'émission de  $\text{NH}_3$  (S. Kumar, 2012). Une mauvaise préparation de cette biomasse peut également être responsable d'émissions de gaz à effet de serre ( $\text{N}_2\text{O}$ ,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{CH}_4$ ) (Samoraj et al., 2022). De même que pour les composts, l'introduction de pathogène lors de l'utilisation comme engrais est possible (Samoraj et al., 2022).

#### 2.2.2.4 Bioengrais microbien

Les bioengrais sont des engrais contenant des microorganismes vivants. Les bioengrais microbiens sont composés de bactéries qui vont apporter aux plantes des nutriments ou rendre plus accessibles ceux présents dans le sol. Les bactéries fixatrices de  $N_2$  sont très souvent utilisées comme base de ces bioengrais. On peut citer l'exemple du genre *Azospirillum* qui est utilisé pour ses capacités de fixation de  $N_2$ , mais aussi pour d'autres avantages comme les capacités de promotion de la croissance des plantes (Y. Hafeez et al., 2006). Ces bioengrais peuvent être apportés directement sur des graines ou mélangés avec du compost ou une autre source de matière organique avant d'être apportés au sol (Kumawat, 2017).

Dans le but de réduire la perte de l'azote apporté dans le sol et réduire les phénomènes d'eutrophisation, l'utilisation de bactéries est reconnue comme bénéfique (Fatemi et al., 2023). Les bactéries fixatrices d'azote apportées au sol permettent une augmentation de la NUE (Chakraborty & Akhtar, 2021). Elles améliorent l'assimilation des nutriments par la plante en présence d'engrais organiques en sécrétant des facteurs de croissance qui vont augmenter la surface des racines et donc la surface d'échange de la plante (H. Prasad et al., 2017). C'est notamment le cas des bactéries du genre des *Azospirillum* qui secrètent des auxines et des cytokines qui vont participer au développement de la plante et à la formation des racines (Cruz-Hernández et al., 2022). Elles apportent également d'autres éléments favorisant le développement des plantes comme les phosphates que certaines bactéries peuvent solubiliser (Cassan & García de Salamone, 2008). Ces bioengrais sont également capables de rendre l'azote du sol assimilable par les plantes quand celui-ci est sous une forme qui n'est pas utilisable (Ritika & Utpal, 2014). C'est par exemple le cas de l'azote intégré dans des molécules organiques qui a besoin d'être préalablement minéralisé pour être rendu accessible à la plante.

De plus, l'un des défauts des précédents engrais organiques réside dans le besoin de contrôle de la communauté microbienne pour éviter la présence de bactéries pathogènes (Manzano-Gómez et al., 2023). Or, des bactéries sélectionnées et utilisées comme bioengrais évitent l'apport de pathogènes et peuvent même améliorer la résistance de l'écosystème récepteur à l'invasion de ces bactéries pathogènes (V. V. Kumar, 2018). De ce fait, les bioengrais sont envisagés pour réduire l'utilisation de pesticides (V. V. Kumar, 2018).

#### 2.3. Production de bactéries pour les bioengrais ou autre produit de la fixation biologique de $N_2$

Les bioengrais présentent donc différents avantages en comparaison à l'utilisation d'engrais chimiques ou d'engrais organiques seuls. Pour apporter une quantité suffisante de bactéries

et obtenir les effets désirés sur les plantes, ces bactéries doivent être produites. Pour ce faire, plusieurs procédés sont possibles en utilisant différentes sources de carbone, d'azote et d'énergie.

### 2.3.1. Avec le carbone organique comme source d'énergie

Le mode de production de bioengrais le plus utilisé consiste à sélectionner une souche pour ses capacités de fixation de  $N_2$ . Elle est cultivée dans un milieu riche en nutriments pour atteindre une concentration suffisante (Vassilev et al., 2015). C'est le cas par exemple des genres *Azospirillum* ou *Azotobacter* déjà utilisés en agriculture (Sivasakthivelan & Saranraj, 2013). Un autre exemple est celui de la production de *Rhodopseudomonas palustris* PS3 (Lo et al., 2020). Un milieu de culture a été mis au point pour la production de *R. palustris*, contenant des sources d'azote et de carbone organique pour utiliser la biomasse produite comme possible bioengrais sans fixation de  $N_2$  (Lo et al., 2020). Des déchets (ex : lisiers) peuvent notamment servir à ces apports. C'est également ce qui a été utilisé pour une bactérie de l'espèce *Pseudoxanthomonas indica* qui a été cultivée avec différentes sources d'azote et de carbone pour maximiser sa production de biomasse et la rendre utilisable comme bioengrais et biopesticide (Morales-Borrell et al., 2020).

Il est également possible d'utiliser des déchets très pauvres en azote pour favoriser la croissance de bactéries fixatrices de  $N_2$  pour la production de bio-engrais. On peut par exemple noter les travaux de J. Harindintwali et al. (2022) utilisant la lignocellulose comme source de carbone pour des bactéries fixatrices de  $N_2$ . La biomasse produite est alors utilisable pour la production de différents produits comme des biocarburants ou comme amendement dans les sols (Harindintwali et al., 2022).

### 2.3.2. Avec des sources d'énergie inorganiques

Zhang et al. (2021), en utilisant du  $NO_3^-$  et une autre source de N utilisable (1-aminocyclopropane-1-carboxylate ACC) ont réalisé l'enrichissement de bactéries sur  $H_2$  et  $CO_2$  dans le but de les utiliser comme bio-engrais (W. Zhang et al., 2021). Ces travaux ont montré une dominance d'*Azospirillum lipoferum* dans les communautés enrichies, espèce qui appartient à un genre bactérien déjà utilisé comme bio-engrais pour ses capacités de fixation de  $N_2$  et de solubilisation des phosphates (Cassan & García de Salamone, 2008; Steenhoudt & Vanderleyden, 2000).

D'autres bactéries hydrogénotrophes diazotrophes ont aussi été enrichies pour la production de protéines issues de la fixation de  $N_2$  sans ajout de carbone organique (X. Hu et al., 2020). Dans ces travaux, des bactéries initialement enrichies pour oxyder le  $H_2$  ont été enrichies pour

la fixation de  $N_2$  en comparaison avec des enrichissements témoins en présence de  $NH_4^+$ . Les protéines produites sont une source d'azote et les bactéries fixatrices de  $N_2$  présentaient aussi un intérêt pour une utilisation en tant que bioengrais. Pour la production de biomasse utilisable comme bioengrais, Liu et al (2017) ont également proposé d'utiliser le  $H_2$  produit à la cathode d'un électrolyseur pour apporter du pouvoir réducteur à des bactéries autotrophes diazotrophes (Liu et al., 2017). Dans ces travaux, une électrode polarisée a permis l'électrolyse de l'eau et la production d' $H_2$  utilisée par *Xanthobacter autotrophicus* pour fixer  $CO_2$  et  $N_2$  pour sa croissance (Liu et al., 2017). L'électricité apportée était fournie par un panneau solaire et la biomasse obtenue a pu être utilisée comme engrais.

Enfin, d'autres bactéries peuvent utiliser la lumière comme source d'énergie pour leur croissance et la fixation de  $N_2$ . C'est notamment ce qui a été utilisé dans les travaux de Soundararajan et al. (2019) qui ont montré la possibilité d'utiliser la capacité de fixation de  $N_2$  de *Rhodospseudomonas palustris* avec la lumière comme source d'énergie et le  $H_2$  comme seule source d'électrons (Soundararajan et al., 2019). Dans ce cas, le  $H_2$  utilisé était produit sur une cathode présente dans le réacteur avec lequel *R. palustris* a été cultivée (Soundararajan et al., 2019). Dans ces travaux, la biomasse obtenue par les fixations de  $N_2$  et  $CO_2$  a été envisagée comme source d'engrais après digestion (Soundararajan et al., 2019).

### 3. LES SYSTEMES DE BIOELECTROCHIMIE MICROBIENS POUR LA FIXATION BIOLOGIQUE DE $N_2$ ET LA CROISSANCE DE BIOMASSE

Les systèmes bioélectrochimiques offrent divers avantages pour l'étude et l'exploitation de la fixation biologique de l'azote. C'est pourquoi notre attention s'est portée sur ces systèmes, qui créent des conditions favorables à la fixation de  $N_2$ , ainsi que sur les bactéries capables d'utiliser des électrodes comme matériau donneur ou accepteur d'électrons.

#### 3.1. Avantages des systèmes de bioélectrochimie microbien pour la fixation de $N_2$

##### 3.1.1. Dans les systèmes anodiques

Comme précédemment décrit lors de la présentation des nitrogénases et de la fixation biologique de  $N_2$  (Figure 1-3 et Équation 1), cette réaction est non seulement inhibée par la présence d' $O_2$ , mais nécessite aussi un apport en énergie et en pouvoir réducteur conséquent (Équation 1).

Or, ces conditions se retrouvent dans les technologies des systèmes bioélectrochimie microbiens (présentés en Annexe Chapitre 6 - 1), notamment à l'anode qui joue le rôle

d'accepteur final d'électrons. La présence de cet accepteur d'électrons va permettre d'éviter les interactions avec l'O<sub>2</sub>, qui n'est pas nécessaire comme accepteur d'électron, tout en maintenant un processus de respiration à l'anode (Jing et al., 2022). L'apport de matière organique comme donneur d'électrons et de carbone va permettre l'apport en énergie et le pouvoir réducteur nécessaire au fonctionnement des nitrogénases (Ortiz-Medina et al., 2019). En plus d'offrir des conditions favorables à la fixation de N<sub>2</sub> à l'anode, ces systèmes présentent l'avantage de permettre la production de courant et d'H<sub>2</sub> à la cathode (voir « Annexe L'électrochimie »). Comme vu précédemment, l'apport de matière organique est nécessaire et il est possible de se servir de résidus organiques pour la culture de bactéries diazotrophes anodophiles. Une telle bioanode permettrait la production d'un bioengrais fixateur de N<sub>2</sub> tout en produisant du H<sub>2</sub> depuis l'oxydation de la source de carbone organique.

### 3.1.2. Dans les systèmes cathodiques

Les systèmes anodiques permettent la protection face à O<sub>2</sub> en permettant une respiration bactérienne en absence d'O<sub>2</sub> et en apportant des sources de carbone organique. Or comme vu précédemment, des bactéries cultivées à partir d'H<sub>2</sub> comme source d'énergie et de pouvoir réducteur est possible mais il faut là aussi éviter la présence d'O<sub>2</sub>. Une cathode à un potentiel assez bas pourrait permettre cette protection contre l'O<sub>2</sub>. En effet, à un potentiel suffisamment bas, les traces d'O<sub>2</sub> sont réduites sur la cathode, ce qui réduit sa présence pour des bactéries fixatrices de N<sub>2</sub>. Son utilisation comme accepteur final d'électrons par des bactéries modèles de la fixation de N<sub>2</sub> comme les bactéries du genre *Azotobacter* ou *X. autotrophicus*, des conditions de microaérobies ont montré la possibilité de former des zones de microaérobies en présence d'O<sub>2</sub> pour favoriser la formation de biomasse diazotrophe (Lu et al., 2020).

En ce qui concerne l'apport en énergie, ces systèmes présentent l'avantage d'utiliser la cathode comme donneur d'électrons et le CO<sub>2</sub> peut servir comme accepteur. La cathode fournit les électrons aux bactéries directement ou par des intermédiaires comme le H<sub>2</sub> (Lovley, 2022). L'utilisation de CO<sub>2</sub> comme accepteur d'électrons en fait également un vecteur potentiel d'énergie dans ces systèmes. En effet, la fixation du CO<sub>2</sub> réalisée par électrosynthèse microbienne permet la production de carbone organique, par exemple sous la forme d'acétate (CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>) (Mohanakrishna et al., 2020). Dans une communauté complexe établie sur une cathode, le CO<sub>2</sub> utilisé comme accepteur final d'électrons va pouvoir servir de source d'énergie sous forme de carbone organique pour des bactéries ne pouvant fixer le CO<sub>2</sub> mais fixant le N<sub>2</sub>. Ces échanges se rapprochent des conditions retrouvées dans les sols pour la

fixation de N<sub>2</sub> avec des interactions plus ou moins fortes entre les différents membres de la communauté ou les plantes (Smercina et al., 2019).

### 3.2. *Bactéries électroactives et transfert d'électrons avec une interface solide*

#### 3.2.1. *Transfert d'électrons*

Certaines bactéries et archées sont capables d'échanger des électrons avec le milieu extracellulaire ; et sont dites électroactives (Logan et al., 2019). Les bactéries électroactives peuvent échanger des électrons avec des surfaces inorganiques ou des accepteurs/donneurs d'électrons moléculaires (Shi et al., 2016). Certains mécanismes ont été identifiés pour ce transfert extracellulaire d'électrons (EET) (Shi et al., 2016). Ils peuvent être directs ou indirects. Le transfert direct d'électrons utilise le cytochrome c ou l'enzyme d'oxydoréduction de la membrane externe (Shi et al., 2016). Ce transfert présenté dans la Figure 1-7 nécessite un lien direct avec la surface abiotique (a) et les bactéries qui se développent se structurent souvent en biofilm (c) sur l'électrode. Des échanges entre bactéries peuvent alors avoir lieu dans le biofilm qui échange des électrons avec l'électrode. Un autre transfert direct est possible pour les EAB à l'aide de pili conducteurs qui permettent d'étendre la longueur de l'EET (b).

D'autre part, le transfert indirect/médié d'électrons est basé sur la sécrétion (d) ou l'ajout (e) de molécules actives sur le plan de l'oxydoréduction pour transporter les électrons au niveau extracellulaire (Shi et al., 2016). Tous ces processus de transfert sont connus pour se produire dans la chambre anodique et dans la chambre cathodique. Les bactéries électroactives sont appelées bactéries exoélectrogènes quand celles-ci libèrent des électrons vers l'anode et bactéries électrotrophes quand elles utilisent les électrons apportés à la cathode (Lapinsonnière, 2013; Moscoviz et al., 2019). L'enrichissement de communautés électroactives sur des électrodes permet de sélectionner des EAB présent dans les inoculums microbiens (Pisciotta et al., 2012).



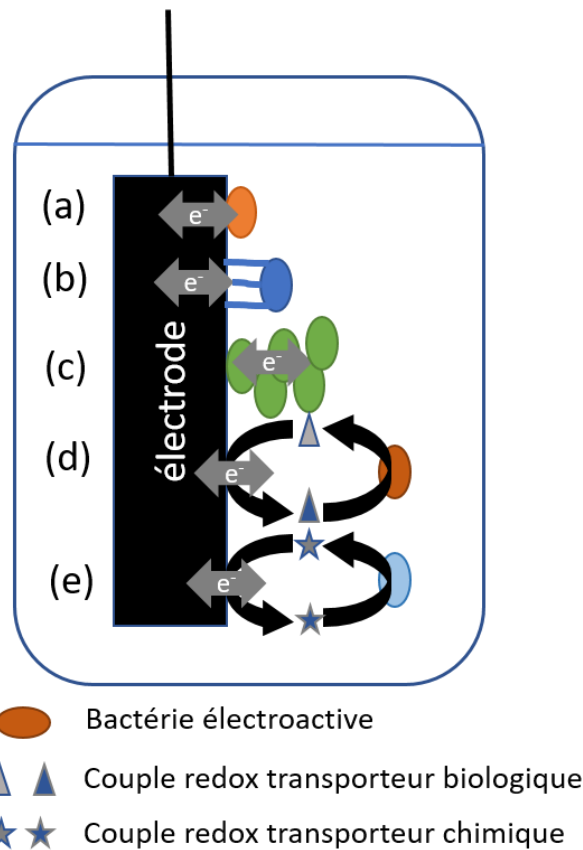


Figure 1-7: Schéma des Transferts d'Electron Extracellulaires (Extracellular Electron Transfer) possibles dans un système bioélectrochimique microbien à l'anode et à la cathode (Arunasri & Mohan, 2019; Moscoviz et al., 2019).

### 3.2.2. Exemple de bactéries exoélectrogènes

*Geobacter sulfurreducens* est une bactérie électrogène modèle qui est retrouvée dans de nombreuses communautés pouvant oxyder de la matière organique et transférer des électrons vers une électrode solide (Logan et al., 2019; Sydow et al., 2014). D'autres bactéries électroactives comme *Shewanella oneidensis* sont également présentées dans l'arbre phylogénique de la Figure 1-8 proposé par Lovley & Holmes (2022). On y voit une diversité importante des espèces bactériennes capables d'utiliser des accepteurs d'électrons divers comme une électrode solide. Cette capacité permet, en anaérobiose, de continuer à faire fonctionner la chaîne respiratoire bactérienne avec de la matière organique comme donneur d'électrons et une anode comme accepteur final d'électrons. Les conditions anaérobies, la présence de carbone organique et d'accepteurs d'électrons sont favorables à la fixation de  $N_2$  (voir 1.3). Les systèmes utilisant des anodes en anaérobiose comme accepteur final d'électrons pour des bactéries exoélectrogènes semblent donc favorables à la fixation de  $N_2$ .

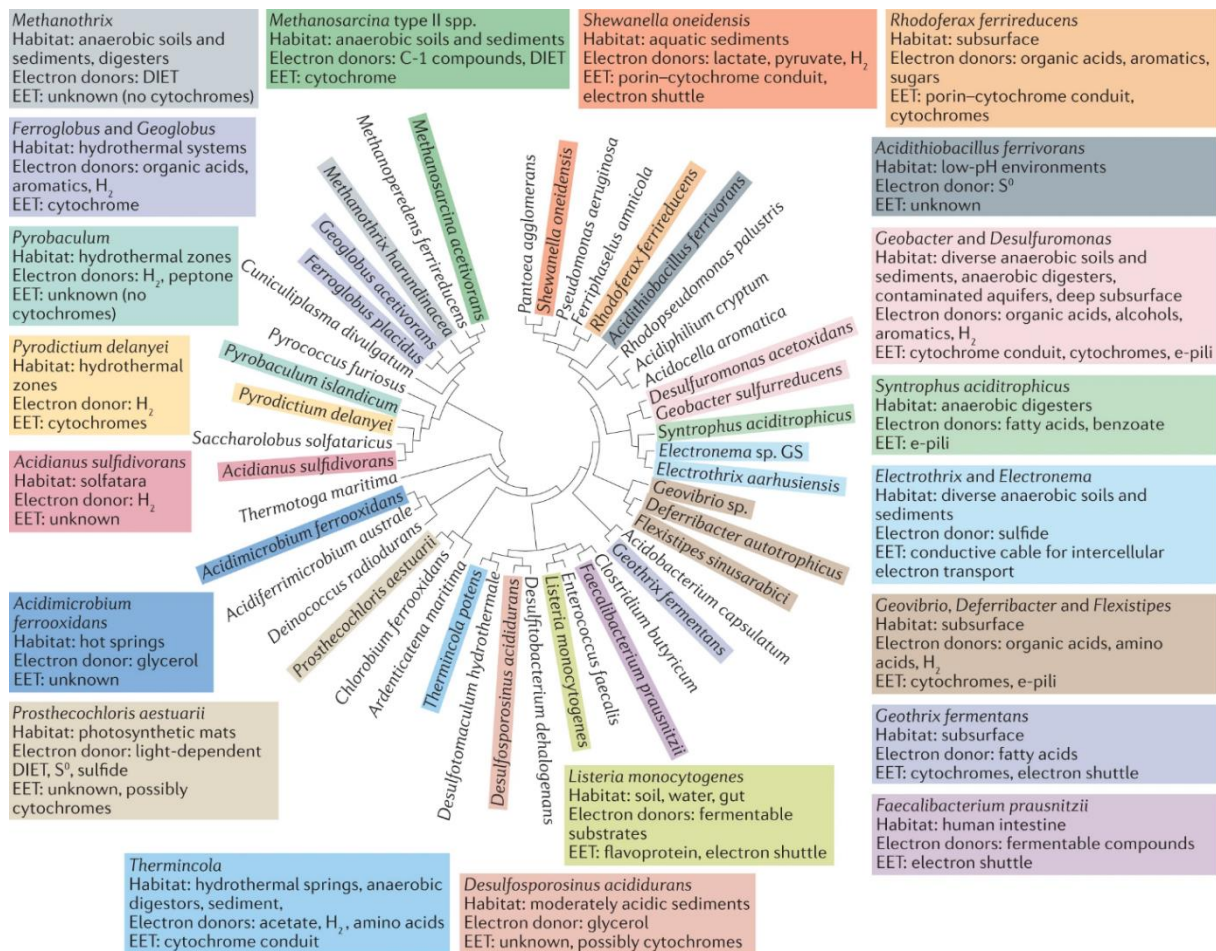


Figure 1-8 : Arbre phylogénique d'espèces bactériennes représentant des bactéries électroactives proposé par Lovley & Holmes (2022). Arbre basé sur des données de séquençage de génome entier et de metagenomics. Des détails sur les niches écologiques, les donneurs et accepteurs d'électron sont présentés ainsi que les hypothèses de chemin de transfert d'électron externe (EET) pour les bactéries les mieux connues (importance phylogénétique, environnemental ou EET les plus étudiés). Les EET cytochromes et e-pili font références aux cytochrome type-c et au pili conducteur (Lovley & Holmes, 2022).

### 3.2.3. Exemple de bactéries électrotrophes

Concernant les bactéries électrotrophes, certaines bactéries sulfato-réductrice (SRB) comme *Desulfovibrio* ont été précédemment décrites (Lovley, 2022). On retrouve quelques membres des genres *Geobacter* et *Shewanella* comme ceux présentés dans la Figure 1-8 (Lovley, 2022). Mais les modèles de bactéries électrotrophes généralement cités sont les *Sporomusa ovata* ou certaines *Clostridium* souvent utilisées pour l'électrosynthèse microbienne d'acides gras volatils (AGV) (Nevin et al., 2011). Ces bactéries électrotrophes, à l'inverse des bactéries exoélectrogènes, vont pouvoir utiliser des éléments inorganiques comme source d'électrons, comme le H<sub>2</sub> ou une cathode (Lovley, 2022). A noter qu'à un potentiel assez bas, la cathode va produire du H<sub>2</sub> utilisable par les bactéries comme le présente la Figure 1-9. Cette figure nous apprend que la production d'H<sub>2</sub> a lieu à un potentiel plus faible que les réactions de réduction d'O<sub>2</sub> vers H<sub>2</sub>O. Ainsi, le O<sub>2</sub> est réduit lorsqu'un potentiel permettant la réaction

d'évolution d' $H_2$  est utilisé (voir Annexe). Une cathode polarisée assez bas permet donc l'élimination des traces d' $O_2$ , en plus de servir de source d'électrons aux bactéries électrotrophes, créant un gradient propice à la fixation de  $N_2$  (voir Annexe : Inhibition des nitrogénases). Les systèmes utilisant une cathode en présence de bactéries électrotrophes diazotrophes pourraient permettre la conversion d'énergie électrique en énergie chimique sous la forme  $NH_3$  en apportant les conditions favorables pour celle-ci.

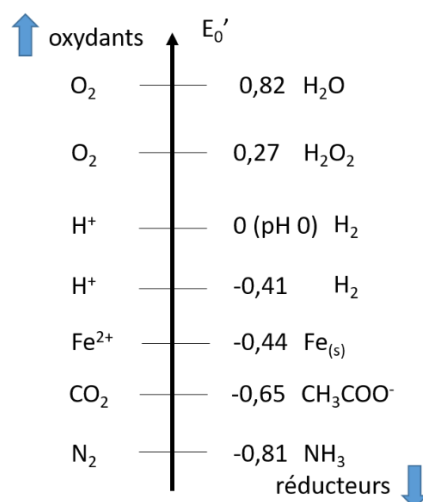


Figure 1-9 : Echelle de quelques potentiels standards de couple redox à pH=7, 25°C et  $P_{ATM}$ . On retrouve les potentiels des couples  $O_2/H_2O$ ,  $O_2/H_2O_2$ ,  $H^+/H_2$ ,  $CO_2/CH_3COO^-$ ,  $N_2/NH_3$  et  $Fe^{2+}/Fe_{(s)}$ . On retrouve les oxydants à gauche de l'axe. Les oxydants les plus forts se trouvent en haut. On retrouve les réducteurs à droite. Les réducteurs les plus forts sont vers le bas.

### 3.2.4. Bactéries hydrogénotrophes à la cathode

Dans les chambres cathodiques, des bactéries chimiolithotrophes non électrotrophes peuvent utiliser les produits de réduction abiotique comme le  $H_2$  pour leur métabolisme, comme dans les travaux de Liu et al (2017) portant sur *Xantobacter autotrophicus*. Par exemple, *Shewanella oneidensis* et certaines *Geobacter* peuvent utiliser le  $H_2$  comme donneur d'électrons (voir Figure 1-8). On notera aussi l'exemple des travaux de Villano et al. (2010) pour la production de méthane par une communauté hydrogénotrophe utilisant  $H_2$  ou l'électrode à partir de -0.65 V vs SHE (Villano et al., 2010). Lu et al. (2020) ont démontré l'intérêt d'utiliser une cathode dans un objectif de production de bactéries fixatrices de  $N_2$ . Ils ont démontré que les cathodes permettaient la formation de zones microaérobies favorables à la fixation de  $N_2$  (Lu et al., 2020). Dans ces travaux, des cathodes de platine (Pt) ont été utilisées pour éviter le dépôt de biomasse et pour la réduction d' $O_2$  et la production d' $H_2$  (Lu et al., 2020). C'est le  $H_2$  produit qui, comme dans les travaux de Liu et al. (2017) sur *X. autotrophicus*, a servi de source d'énergie et de pouvoir réducteur aux bactéries hydrogénotrophes (Liu et al., 2017; Lu et al., 2020). Ces travaux ont mis en évidence la possibilité de convertir de l'électricité en biomasse par l'intermédiaire du  $H_2$  produit sans intervention de bactéries. Cependant, d'autres formes

d'échanges peuvent avoir lieu entre l'électrode et les bactéries électroactives. Les différents types de transfert d'électron et de niches écologiques présentées dans la Figure 1-8 suggèrent la possibilité de trouver de nombreuses bactéries électroactives capables de fixer le N<sub>2</sub>. Plusieurs travaux se sont donc intéressés à la fixation de N<sub>2</sub> dans les systèmes de bioélectrochimie microbiens, à l'anode ou la cathode, avec des communautés enrichies ou des cultures de souches pures. En effet, les anodes permettent de se passer d'O<sub>2</sub> comme accepteur final d'électrons en utilisant de la matière organique comme source d'énergie et de carbone. Les cathodes permettent la formation de zones microaérobie tout en apportant du pouvoir réducteur pour la fixation de N<sub>2</sub> et/ou CO<sub>2</sub>.

### 3.3. Exemple des systèmes bioélectrochimique microbiens pour la fixation de N<sub>2</sub> en culture de souche pure

#### 3.3.1. Biocathode

À la suite des travaux réalisés par Liu et al. (2017) sur *Xanthobacter autotrophicus* dans un électrolyseur à eau produisant de l'H<sub>2</sub>, Soundararajan et al (2019) ont étudié un autre type de métabolisme avec une bactérie phototrophe (Liu et al., 2017; Soundararajan et al., 2019). Ils ont utilisé *Rhodospseudomonas palustris* TIE-1 dans un système hybride de photo-électro réacteur utilisé comme un électrolyseur pour fournir du H<sub>2</sub> à *R. palustris* capable de fixer N<sub>2</sub> et CO<sub>2</sub> avec la lumière et H<sub>2</sub> (Soundararajan et al., 2019). La fixation de N<sub>2</sub> a alors représenté jusqu'à 8.5% des électrons échangés dans le système. Après ces travaux sur des cathodes utilisées pour apporter du H<sub>2</sub> à des souches pures, Chen et al. (2020) ont mis en évidence un phénomène d'électrosynthèse microbienne (MES) avec *Pseudomonas stutzeri* (S. Chen et al., 2020). Ils ont appliqué un potentiel ne permettant pas l'évolution d'H<sub>2</sub> en absence de catalyseurs (-0.3 V vs SHE) et s'assurer de l'utilisation directe de la cathode comme source d'électrons. Ils ont pu mettre en évidence un rendement faradique de 20% pour une concentration de 2,5 mg/L de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (S. Chen et al., 2020).

#### 3.3.2. Bioanode

Des anodes ont été étudiées dans les travaux de Jing et al (2022) avec une MFC. Dans ces travaux, la fixation de N<sub>2</sub> et son interaction avec l'anode a été étudiée avec *G. sulfurreducens*. Cette fixation a permis le fonctionnement de la pile microbienne sans apport d'autre source d'azote (comme des sels de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>). Ils ont surtout mis en évidence des changements de métabolisme de *G. sulfurreducens* pour s'adapter à la respiration de l'anode et permettre un rendement faradique stable avec ou sans source d'azote assimilable (Jing et al., 2022). Un schéma du fonctionnement de ces échanges entre anode et *G. sulfurreducens* est présenté

sur la Figure 1-10. Ortiz Medina et al (2019) ont également identifié *G. sulfurreducens* comme capable de fixer  $N_2$  dans un biofilm anodique d'une MEC (Ortiz-Medina et al., 2019). Après des travaux complémentaires sur la souche pure, ils ont pu mettre en évidence le faible impact de la fixation sur les rendements et la production d' $H_2$  à la cathode (Ortiz-Medina et al., 2023). Ils ont également étudié l'impact des différents potentiels appliqués à l'électrode (de -0,15V à +0,15V vs SHE) et ont mis en évidence une expression plus forte des gènes de nitrogénases au potentiel le plus bas. Ils ont alors fait l'hypothèse que le métabolisme de *G. sulfurreducens* se serait adapté pour garantir la production d'énergie (Jing et al., 2022; Ortiz-Medina et al., 2023).

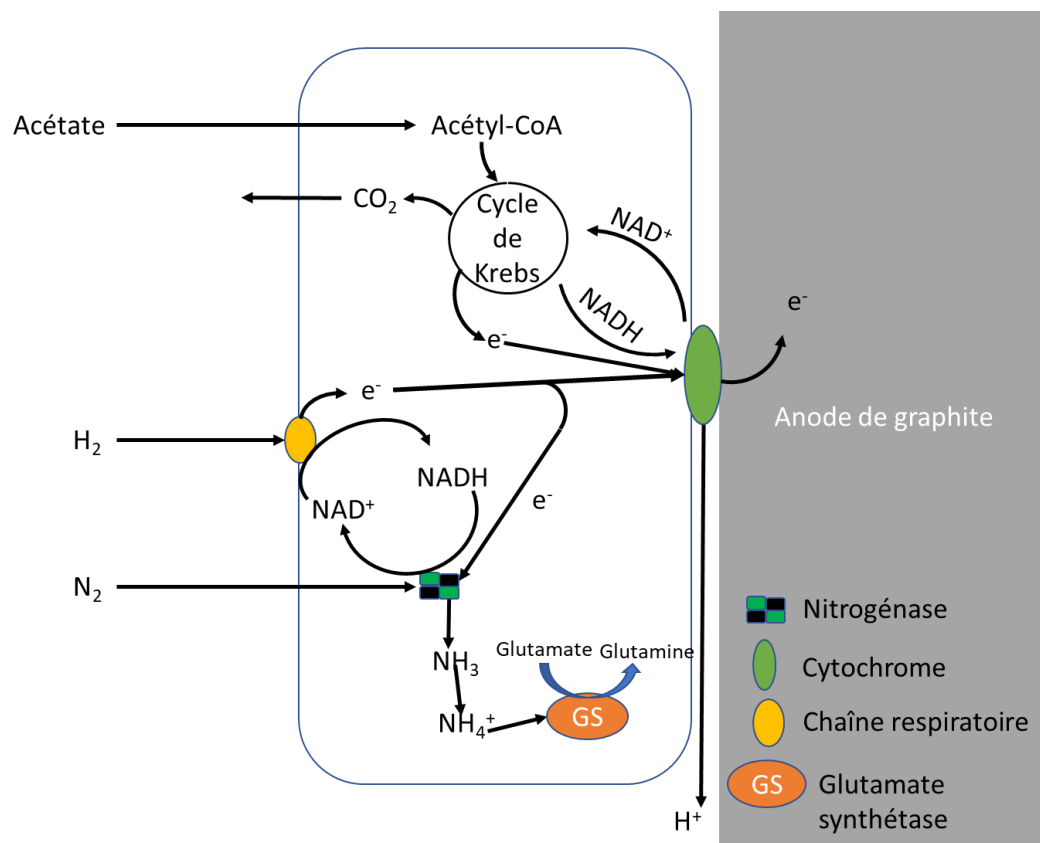


Figure 1-10: Schéma du métabolisme de *G. sulfurreducens* en présence d'une anode et en condition de fixation de  $N_2$  avec l'oxydation de l'acétate. Cette figure s'inspire des écrits et des figures de Esteve-Núñez et al. (2005) et de Jing et al. (2022).

### 3.4. En communauté microbienne mixte

#### 3.4.1. Communauté anodique

En parallèle des études sur des cultures de souches pures bactériennes, des travaux ont également été réalisés sur des communautés complexes. En 2014, Wong et al. ont mis au point un enrichissement d'une communauté bioanodique capable de fixer l'azote. Ils ont alors observé le genre *Clostridium* comme étant majoritaire (Wong et al., 2014). Comme vu avec les

souches pures, Ortiz Medina et al. (2019) avaient aussi mis en évidence la fixation de  $N_2$  dans une bioanode majoritairement colonisée par *G. sulfurreducens* (Ortiz-Medina et al., 2019).

### 3.4.2. Communautés cathodiques

Pour les cathodes, Rago et al. (2019) ont mis en évidence pour la première fois la fixation de  $N_2$  dans un réacteur d'électrosynthèse microbienne (MES) avec une communauté (Rago et al., 2019). Ils ont alors nommé ce processus la fixation bioélectrochimique de l'azote (Bioelectrochemical nitrogen fixation, e-BNF). Ce nouveau type de procédé peut permettre de produire de la biomasse à partir de gaz avec un apport énergétique sous forme électrique pouvant être assuré par de petites unités de production comme des panneaux solaires (Rago et al., 2019). Cette biomasse peut ensuite être utilisée localement comme bioengrais avec un impact moindre sur l'environnement que l'utilisation d'engrais chimiques (Rago et al., 2019; Y. Hafeez et al., 2006). Bien que la preuve de concept ait été faite pour ce procédé, les interactions entre microorganismes qui permettent la fixation de  $N_2$  dans ce genre de système restent encore à explorer. Ainsi, on peut envisager la fixation de  $N_2$  : (i) par une seule souche capable de fixer le  $N_2$  et le  $CO_2$  en utilisant l'électrode comme source d'énergie comme montré par les travaux de Chen et al (2020), (ii) par une interaction entre des bactéries diazotrophes hétérotrophes qui peuvent utiliser le C organique produit par des bactéries électro-autotrophes, (iii) par une interaction entre archées méthanogènes et des méthanotrophes qui utiliseraient ce  $CH_4$  comme source d'énergie pour la fixation de  $N_2$  et (iv) par un transfert direct d'électrons entre espèces (DIET) entre les bactéries électro-autotrophes et les bactéries diazotrophes (Rago et al., 2019). Une meilleure compréhension de ces interactions pourrait aider à optimiser la fixation de  $N_2$  dans ce type de système pour améliorer la vitesse de fixation et étudier le potentiel d'application de ces systèmes. Yadav et al. (2022) ont utilisé la fixation biologique de  $N_2$  dans un système de MES de l'acétate pour assurer l'apport en azote du système (Yadav et al., 2022). Cette utilisation de bactéries fixatrices de  $N_2$  utilisant des cathodes permettrait de remplacer le besoin en sels de  $NH_4^+$  qui présentent les mêmes inconvénients que les engrais azotés pour leur production. Ils ont obtenu des rendements faradiques de 85% et 0,5% respectivement pour l'acétate  $CH_3COO^-$  et l'ammonium  $NH_4^+$  (Yadav et al., 2022). Li et al. (2022) ont montré l'importance des interactions entre communautés autotrophes et hétérotrophes lors de la fixation de  $CO_2$  et  $N_2$  dans des réacteurs à un seul compartiment avec anode et biocathode. Enfin, Zhang et al. (2022) ont, eux aussi, mis en évidence l'importance des interactions bactériennes et ont observé une production de  $NH_4^+$  représentant jusqu'à 20% des électrons apportés à la cathode. Ces travaux utilisant des communautés mixtes ont permis de mettre en lumière les interactions entre plusieurs bactéries présentant des métabolismes différents.

## Présentation du manuscrit

Ces travaux de thèse sur l'étude du potentiel des systèmes bioélectrochimiquee microbiens pour la fixation biologique de  $N_2$  visent à étudier la fixation de  $N_2$  en BES mis en évidence par L. Rago et al (2019) sur des biocathodes et Wong et al sur des bioanodes (2014) (Rago et al., 2019; Wong et al., 2014). Une meilleure caractérisation des réactions en jeu permettrait d'envisager des applications possibles et d'évaluer son potentiel vis-à-vis des méthodes actuelles de production d'azote assimilable.

Suite à la partie de présentation du sujet, le chapitre 2 s'intéressera à décrire les différentes méthodes utilisées dans le travail de thèse. Les éléments nécessaires à la culture de communautés de bactéries électroactives fixatrices de  $N_2$  sont présentés dans cette partie. Les méthodes d'analyse nécessaires au suivi des cultures et leur développement sont également présentés. Les calculs utilisés sont expliqués dans cette partie.

La suite du manuscrit décrit et analyse les résultats obtenus. Les premiers travaux présentés dans le chapitre 3 visent à étudier la fixation de  $N_2$  par *Geobacter Sulfureducens* à l'anode.

Le chapitre 4 vise à mieux comprendre les interactions dans une communauté bactérienne enrichie pour la fixation de  $N_2$  sur une cathode. Afin d'étudier ces interactions, une nouvelle méthode d'enrichissement de ce type de communauté a été développée en s'inspirant de méthodes d'enrichissement de bactéries électroactives, de bactéries autotrophes et de bactéries diazotrophes. Cet enrichissement a alors été comparé avec un enrichissement de bactéries hydrogénotrophes et diazotrophes en absence d'une électrode. Les biofilms obtenus ont été caractérisés en termes de communautés microbiennes et un modèle d'interactions a alors été proposé.

Ce modèle a servi de base de travail dans les travaux présentés dans le chapitre 5 visant à valider ou invalider le modèle en utilisant des cultures pures, puis pour la reconstruction d'une communauté bactérienne fixant  $N_2$  sur une cathode.

Enfin, le dernier chapitre correspond à une discussion sur l'utilisation de la bioélectrochimie microbienne dans le cadre de la fixation biologique de l'azote sur la base des résultats obtenus. De futures pistes de recherches pour la fixation de  $N_2$  en système de bioélectrochimie sont proposées.

## Chapitre 2 - Matériel et méthodes

### 1. DIPOSITIFS ELECTROCHIMIQUES MICROBIENS

Trois types d'électrolyseurs microbiens (MEC) ont été utilisés dans ces travaux : un pour les cultures de bioanode avec *Geobacter sulfurreducens*, un pour les enrichissements en compartiment cathodique et un pour la culture de souche pure de *Xanthobacter autotrophicus* et *Desulforamulus ruminis* en compartiment cathodique.

#### 1.1. Méthodes électrochimiques

Les phénomènes électrochimiques microbiens ont été étudiés dans des réacteurs grâce un montage à trois électrodes qui comportait une électrode de travail en plaque de graphite (Mersen, 0,2 cm d'épaisseur) ou feutre de carbone (AvCarb, G600A non activée, 0,5 cm d'épaisseur), une contre-électrode sous forme de grille de Pt/Ir (Heraeus, diamètre fil 0,25 mm, diamètre maille 0,75 mm, 100 mailles/cm<sup>2</sup>) et une électrode de référence au calomel saturé (SCE, Origasens OGR003 et R1/HG/A, longueur 120 mm et 175 mm, diamètre inférieur 8 mm et 10mm, diamètre supérieur 12 mm et 14mm). Les électrodes de références ont été prolongées (en longueur) à l'aide d'un pont électrolytique (Origasens AL120) rempli d'une solution de KCl saturée pour les enrichissements (électrode référence OGR003) mais pas pour la culture de *G. sulfurreducens* avec des électrodes assez longues (électrode référence R1/HG/A). Les électrodes de références ont vu leur potentiel vérifié avec le pont quand celui-ci était utilisé. Les électrodes de travail étaient connectées au circuit externe par une tige de titane (GoodFellow, diamètre 2mm) et les contres électrodes par un filament de Pt/Ir (Heraeus, 90/10 %). Différentes méthodes électrochimiques ont été appliquées au moyen d'un potentiostat VMP3 (BioLogic SAS) à l'aide du logiciel propriétaire EC-Lab.

Le suivi du courant au cours du temps a été réalisé par la technique de chronoampérométrie, qui consiste à imposer un potentiel constant à l'électrode de travail. Dans le cas des cultures de bactéries à l'anode, les électrodes de travail ont été polarisées à +0,44 V vs SHE (+0,2 V vs SCE). Pour les travaux de culture à la cathode, les électrodes de travail ont été polarisées à -0.7 V vs SHE (-0,94 V vs SCE). L'intensité moyenne du courant a été mesurée toutes les 10 minutes pendant toute la durée des cultures avec une précision de 50µV sur le potentiel appliqué. La densité de courant a alors été calculée en utilisant la surface projetée des électrodes de travail. Ce suivi de la densité de courant nous informe sur les réactions à l'anode ou à la cathode. En effet, la densité de courant pour les bactéries à l'anode nous renseigne sur la disponibilité en substrat et sur les électrons échangés lors de l'oxydation de ce substrat (ex :



CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>). À la cathode, une augmentation de l'intensité de courant en valeur absolue est synonyme d'une augmentation des réactions de réduction, abiotiques ou non.

Les propriétés électrochimiques des systèmes microbiens ont également été étudiées par la méthode de voltamétrie cyclique qui consiste à mesurer la réponse en courant du système lorsque le potentiel varie. Pour les travaux sur l'anode, la gamme de potentiel balayée était de -0,26 V vs SHE (-0,5 V vs SCE) à 0,64 V vs SHE (0,4 vs SCE). Pour les cathodes, la gamme de potentiel balayée était de -0,76 V vs SHE à 1,24 V vs SHE (-1 à 1 V vs SCE). Dans tous les cas, la vitesse de balayage était de 1 mV/s. Pour chaque voltamétrie, le balayage a été répété deux fois. La courbe intensité-potentiel obtenue était considérée comme correcte au deuxième balayage.

### *1.2. Dispositif dédié à l'étude des bioanodes*

Quatre réacteurs ont été utilisés pour les cultures de bioanodes (Figure 2-1). Ces réacteurs étaient composés de deux chambres séparées par une membrane échangeuse d'anion (AEM, fumasep<sup>®</sup> FAB-PK-130, disque de 9cm de diamètre dont 6.5 cm de diamètre en contact avec les électrolytes) pour éviter la migration de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> à la cathode. Un exemple de l'aspect de ces réacteurs est proposé en Figure 2-2. Chaque chambre avait un volume de 1 litre au total et était remplie de 750mL de milieu homogénéisé avec des agitateurs magnétiques (Fischer Scientific, Heating Magnetic Stirrer pour les gros réacteurs et 2Mag, Mix drive 1 ECO pour les petits) à environ 200 RPM. Les électrodes de travail utilisées dans ces réacteurs étaient des plaques de graphite de 5 cm × 5 cm × 0,2 cm polies au papier de verre avant utilisation. Les contre-électrodes étaient des grilles de Pt/Ir de 2,5 cm × 2,5 cm pour catalyser la formation d'H<sub>2</sub> en conditions abiotiques. Des canules, visibles sur la Figure 2-2, ont été utilisées pour prélever du milieu au centre de chaque chambre. Une troisième canule a été utilisée pour maintenir la contre électrode en place.

La mesure du H<sub>2</sub> produit à la cathode a été réalisée grâce une éprouvette graduée remplie d'eau et retournée dans un bac, lui aussi rempli d'eau. L'éprouvette était reliée à la chambre cathodique par un tube de néoprène. Le volume d'eau déplacé correspondait ainsi au volume de gaz produit à la cathode.

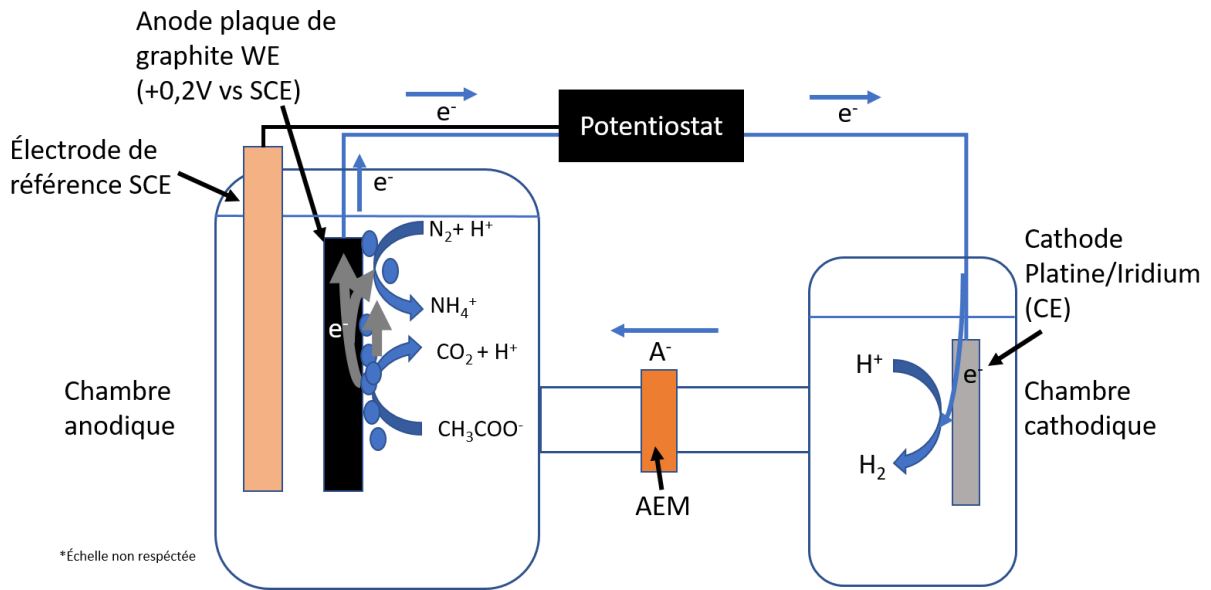


Figure 2-1: Schéma des cellules d'électrolyse microbienne (MEC) utilisées pour la culture de *G. sulfurreducens*



Figure 2-2: Réacteur utilisé pour la culture de *G. sulfurreducens* à l'anode. La chambre anodique est à gauche et la chambre cathodique à droite. Les tiges des électrodes et les canules sont passées au travers de bouchons à rabats étanches. L'étanchéité autour de l'électrode de référence est réalisée grâce à un bouchon GL25 et joint associé.

### 1.3. Dispositif dédié à l'étude des enrichissements en compartiment cathodique

Quatre réacteurs ont été utilisés dans les travaux d'enrichissement en compartiment cathodique. Ces réacteurs étaient composés de deux chambres séparées par une membrane échangeuse d'anions (AEM, fumasep<sup>®</sup> FAB-PK-130, disque de 9cm de diamètre dont 6.5 cm de diamètre en contact avec les électrolytes) comme le présente la Figure 2-3. La membrane AEM a été utilisée pour éviter la migration des ions  $\text{NH}_4^+$  vers l'anode. Les deux chambres de ces réacteurs contenaient des agitateurs magnétiques agitant à environ 200 RPM pour permettre une homogénéisation des milieux. Les électrodes de travail utilisées étaient en feutre de carbone de taille 5 cm × 5 cm × 0,5 cm. Les électrodes de feutre de carbone ont été préparées avec un traitement chimique à HCl 1M, un rinçage à l'éthanol et un traitement thermique à +400°C comme décrit par Paul *et al* (Paul et al., 2018). Les contre-électrodes utilisées étaient toutes des grilles d'alliage platine et iridium 90/10 % de 3,5 cm x 3.5 cm.

L'apport en  $\text{CO}_2$  a été réalisé par un système de bullage et de recirculation du gaz. Ce système reposait sur une bouteille de 650 mL de volume et une éprouvette graduée retournée dans un bac d'eau et contenant 500 mL de gaz. Les bouteilles et les espaces de tête des réacteurs étaient reliés en deux points avec une pompe péristaltique (Masterflex, Economy ou Console Drive ou LongerPump, tête de pompe modèle 7014-20) permettant le transport du gaz de la bouteille au milieu de la chambre cathodique à une vitesse d'environ 10 mL/min comme présenté dans la Figure 2-4. Ce transport a été fait dans des tuyaux de norprène de taille 14 (Masterflex, norprène, 06404-14). Les éprouvettes étaient reliées aux bouteilles pour apporter le  $\text{CO}_2$  et suivre le volume de gaz utilisé. Par la suite, des sacs pour le gaz (Restek, TEDLAR gas sample bags) ont été utilisés, notamment pour l'apport d'acétylène  $\text{C}_2\text{H}_2$  à la place des éprouvettes avec des volumes de 2 à 10L dont le volume était mesuré par un système identique à celui avec l'éprouvette.

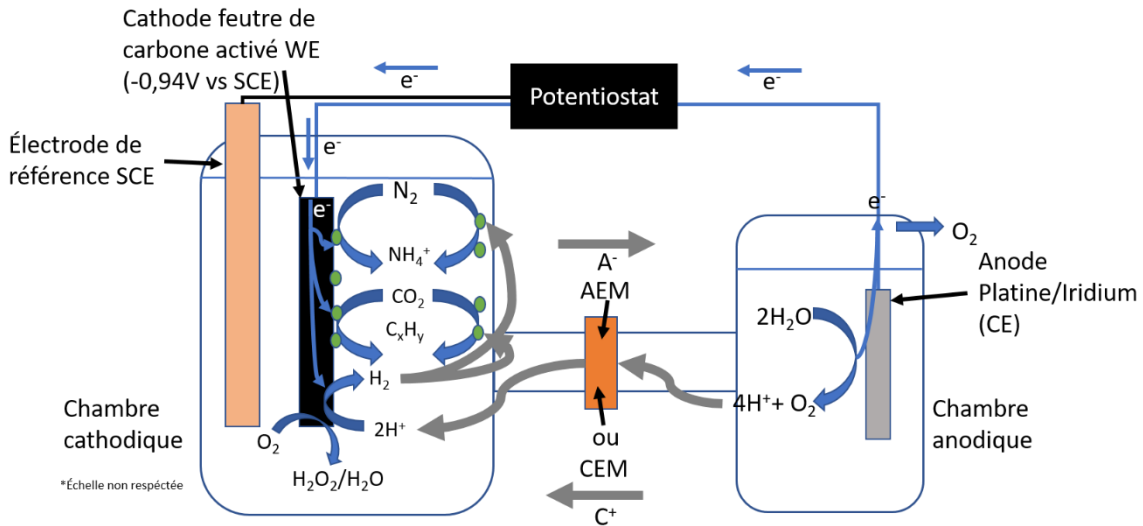


Figure 2-3: Schéma des cellules d'électrolyse microbienne (MEC) utilisées pour l'enrichissement de bactéries autotrophes et diazotrophes.

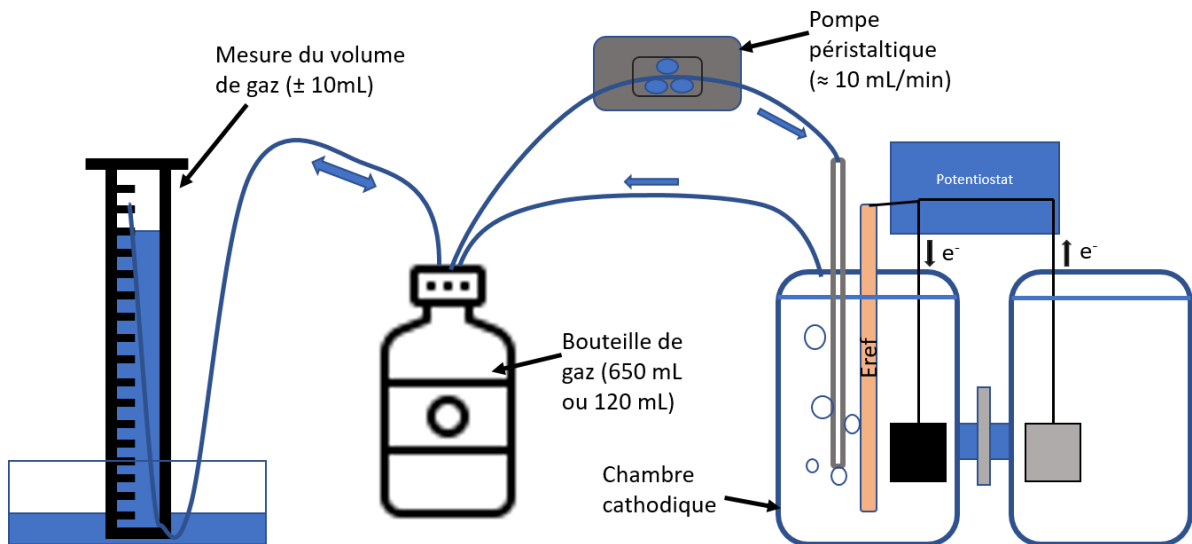


Figure 2-4: Dispositif de recirculation de gaz avec de gauche à droite, l'éprouvette pour le suivi des variations de volume de gaz dans le dispositif, la bouteille contenant 120 à 650 mL de gaz (petit et grand réacteur), la pompe à une vitesse de 10mL/min et le réacteur. Tous les tuyaux utilisés sont des tuyaux néoprène® de 1,4 mm de diamètre.

#### 1.4. Dispositif dédié à l'étude des souches pures en compartiment cathodique

Les réacteurs utilisés pour l'étude des souches pures à la cathode correspondaient à des réacteurs de petit volume composés de deux chambres, séparées par une membrane échangeuse d'ions (AEM FAB-PK-130, disque de 5,5 cm de diamètre dont 4cm de diamètre était en contact avec les électrolytes pour le premier batch, puis CEM FKB-PK-130, 5,5 cm de diamètre pour empêcher la diffusion de CO<sub>2</sub> aqueux dans un deuxième batch) (Figure 2-5). Les

chambres avaient un volume de 175 mL avec 150mL de milieu pour 25mL d'espace de tête. Des barreaux aimantés ont été ajoutés pour servir d'agitateurs magnétiques avec une vitesse de rotation de 200 RPM. Les électrodes de travail étaient en feutre de carbone de 2,5×2,5 cm<sup>2</sup> de surface projeté et 2×1,5 cm<sup>2</sup> pour les contre électrode en Pt/Ir.

Comme pour les enrichissements, un système de recirculation et de mesure du gaz des espaces de tête a été utilisé (Figure 2-4). Ce système de recirculation consistait en une boucle reliant l'espace de tête des chambres cathodiques à des bouteilles uniquement remplies de gaz (120mL pour les travaux de culture de souche pure). Une éprouvette était reliée à chaque bouteille pour suivre l'évolution du gaz. Ce système a été utilisé pour permettre un renouvellement facile du CO<sub>2</sub> en ne remplaçant que les bouteilles ou en remplissant les éprouvettes. Une pompe péristaltique a été utilisée sur la boucle pour garantir la circulation du gaz. La vitesse de recirculation était de 10mL/min. Dans le dernier batch avec ces réacteurs, le système de gaz a été remplacé par un apport en continu de N<sub>2</sub> et CO<sub>2</sub>, le premier par le système de N<sub>2</sub> (Linde gas, grade 4.5) du laboratoire et le second par les pompes péristaltiques.



Figure 2-5 : Petits réacteurs utilisés pour la culture de souche pure avec l'électrode de référence au premier plan. A) La chambre cathodique est à gauche de la photo (électrode en feutre de carbone + référence au premier plan) et la chambre anodique à droite. L'électrode de référence est maintenue en place à l'aide d'un bouchon GL18. B) Le côté opposé des réacteurs où l'on retrouve la canule d'apport de gaz qui est en verre et bouchée par un septum comme pour les grands réacteurs. Ces canules permettent l'apport de gaz au centre de la chambre cathodique. Les prélèvements sont fait au travers du septum bleu présent tout à droite de la photo. Les sorties des réacteurs non utilisées sont fermées par des bouchons GL14.

### 1.5. Procédure de stérilisation

Tout le matériel utilisé pour les réacteurs, à l'exception des électrodes de références, a été stérilisé par autoclave 20 min à 121 °C dans un autoclave de paillasse (Tuttnauer, 2540ML). Pour stériliser les réacteurs, ceux-ci ont été fermés sans membrane entre les deux chambres et assemblés avec des colliers de serrage métalliques. Les bouchons et canules visibles sur la Figure 2-5 ont tous été mis en place et le bouchon GL25 (et GL18 sur petit réacteur) servant pour l'électrode de référence a été bouché par du coton et recouvert d'aluminium. Les membranes (AEM et CEM) ont été stérilisées hors des réacteurs dans une solution de NaCl 0.5%. L'assemblage et le remplissage ont ensuite été réalisés sous poste de sécurité microbiologique (PSM) : les membranes étaient mises en place entre les deux chambres des réacteurs et collées à l'aide d'une graisse adaptée (Dow Corning, High Vacuum Grease). L'électrode de référence a été insérée après lavage à l'éthanol (96%) et rinçage à l'eau osmosée stérile. Enfin, les milieux stérilisés ont été ajoutés. Pour les microbes nécessitant des conditions anaérobies strictes, le remplissage a été réalisé à proximité d'une flamme avec un flush en continu de la bouteille de milieu et du réacteur par du N<sub>2</sub>.

## 2. CULTURES BACTERIENNES DE BIOANODES ET BIOCATHODES POUR LA FIXATION DE N<sub>2</sub>

### 2.1. Bioanode avec *Geobacter sulfurreducens*

#### 2.1.1. *Geobacter sulfurreducens*

Pour les travaux sur bioanode, s'inspirant des travaux d'Ortiz-Medina et al (2019), le choix a été fait d'utiliser *Geobacter sulfurreducens*. La souche utilisée provenait de la banque allemande DSMZ s'agissant de *Geobacter sulfurreducens* PCA (DSM 12127) déjà disponible au laboratoire. Cette espèce bactérienne est utilisée comme modèle de bactérie capable d'utiliser une électrode solide comme accepteur final d'électrons (exoélectrogène) et possède les gènes nécessaires à la formation de nitrogénases.

#### 2.1.2. Milieu de culture

Le milieu utilisé pour la culture de *G. sulfurreducens* était composé de 4,58g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,45g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,28g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,75g KCl, 0,26g MgCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O, 2,9mg CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O, 0,3g L-cystéine, 0,2g d'extrait de levure, 10mL de solution de minéraux et 10mL de solution de vitamine pour 1 litre d'eau osmosée. Cette base de milieu était celle utilisée pour la culture de *G. sulfurreducens* et *Clostridium pasteurianum* décrit par Moscoviz et al. (2017) avec retrait du glycérol (donneur d'électron pour *C. pasteurianum*) et avec 0,3g L-cystéine au lieu de 0,5g (Moscoviz et al.,

2017). 0,2g d'extrait de levure ont également été rajoutés ici. Le pH était à 6,8 avant inoculation. La solution de minéraux était composée de 1,5g d'acide nitrilotriacétique, 3g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,5g  $MnSO_4 \cdot H_2O$ , 1g NaCl, 0,1g  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,18g  $CoSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,1g  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ , 0,18g  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,01g  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ , 0,02g  $KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$ , 0,01g  $H_3BO_3$ , 0,01g  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ , 0,03g  $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ , 0,3g  $Na_2SeO_3 \cdot 5H_2O$  et 0,4g  $Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$  pour 1 litre d'eau osmosée. La solution de vitamines était composée de 2mg biotine, 2mg acide folique, 10mg Pyridoxine-HCl, 5mg Thiamine-HCl, 5mg riboflavine, 5mg acide nicotinique, 5mg D-Ca-pentothénate, 0,1mg vitamine B12, 5mg acide aminobenzoïque et 5mg d'acide lipoïque pour 1 litre d'eau. Les solutions de vitamines et d'éléments traces provenaient du milieu DSM141 de la banque de souche DSMZ. De la résazurine 1% a été utilisée à 0,5mL/L comme indicateur de la présence en  $O_2$ . Du Na-acétate a été ajouté comme donneur d'électron jusqu'à une concentration de 20 mM de Na-acétate dans les cultures. Pour ce faire, 8,5mL d'une solution stock de Na-acétate 2M ont été ajoutés. Du fumarate a également été utilisé à une concentration de 40mM dans les cultures hors système de bioélectrochimie comme accepteur d'électrons. Du  $NH_4Cl$  a été utilisé à 2 g/L sauf pour les MEC inoculées par *G. sulfurreducens* pour la fixation de  $N_2$ . Il sera indiqué quand le  $NH_4Cl$  était présent ou quand le milieu était en absence d'azote utilisable autre que  $N_2$ . Les solutions de vitamines, d'acétate stock et de fumarate ont été stérilisées séparément du reste du milieu stérilisé par autoclave à 131°C 20min. La solution de vitamines a été stérilisée par filtration sur filtre stérile de 0,2  $\mu m$ . Les solutions d'acétate et fumarate ont été stérilisées à l'autoclave.

## 2.2. Procédure de culture des bioanodes à *G. sulfurreducens*

*G. sulfurreducens* a été mise en culture en bouteille de 120 mL pour obtenir une biomasse suffisante avant inoculation des chambres anodiques. Une solution de  $NH_4Cl$  a été utilisée pour éviter la perte d'énergie des bactéries dans la fixation de  $N_2$  pendant la culture en bouteille. Ces cultures ont été conduites pendant trois jours ou jusqu'à obtention d'une absorbance de 0,3 lors de la mesure de densité optique à 600nm. Les cultures ont été incubées à +37°C avec une agitation de 250 rpm. Les chambres anodiques ont ensuite été inoculées avec 50mL des pré-cultures en bouteilles pour 700mL de milieu propre.

Pour faciliter la formation du biofilm sur l'électrode de travail (anode), une solution de  $NH_4Cl$  a été ajoutée au milieu de toutes les cellules d'électrolyse microbienne (MEC) lors du premier batch de sept jours comme le montre la Figure 2-6. Le milieu anodique a été renouvelé après chaque batch de sept jours. 8,5mL d'acétate à 2M ont été ajoutés dans les chambres anodiques au début et 4mL ont été rajoutés après 3-4 jours pour chaque batch. Au total, cinq batches ont été réalisés par réacteur avec le premier batch en présence de N assimilable ( $NH_4Cl$ )

pour tous les réacteurs. Les quatre batches suivants ont été utilisés pour évaluer la fixation de  $N_2$  par *G. sulfurreducens* sur une anode comme présenté en Figure 2-6. Sur les quatre MEC construites, deux ont été utilisées pour l'observation de *G. sulfurreducens* avec  $N_2$  comme seul source d'azote et les deux autres ont été utilisées comme témoin du développement de *G. sulfurreducens* en absence de fixation  $N_2$  avec du  $NH_4Cl$  dans la préparation des milieux.

### Culture Anodique de *G. sulfurreducens*

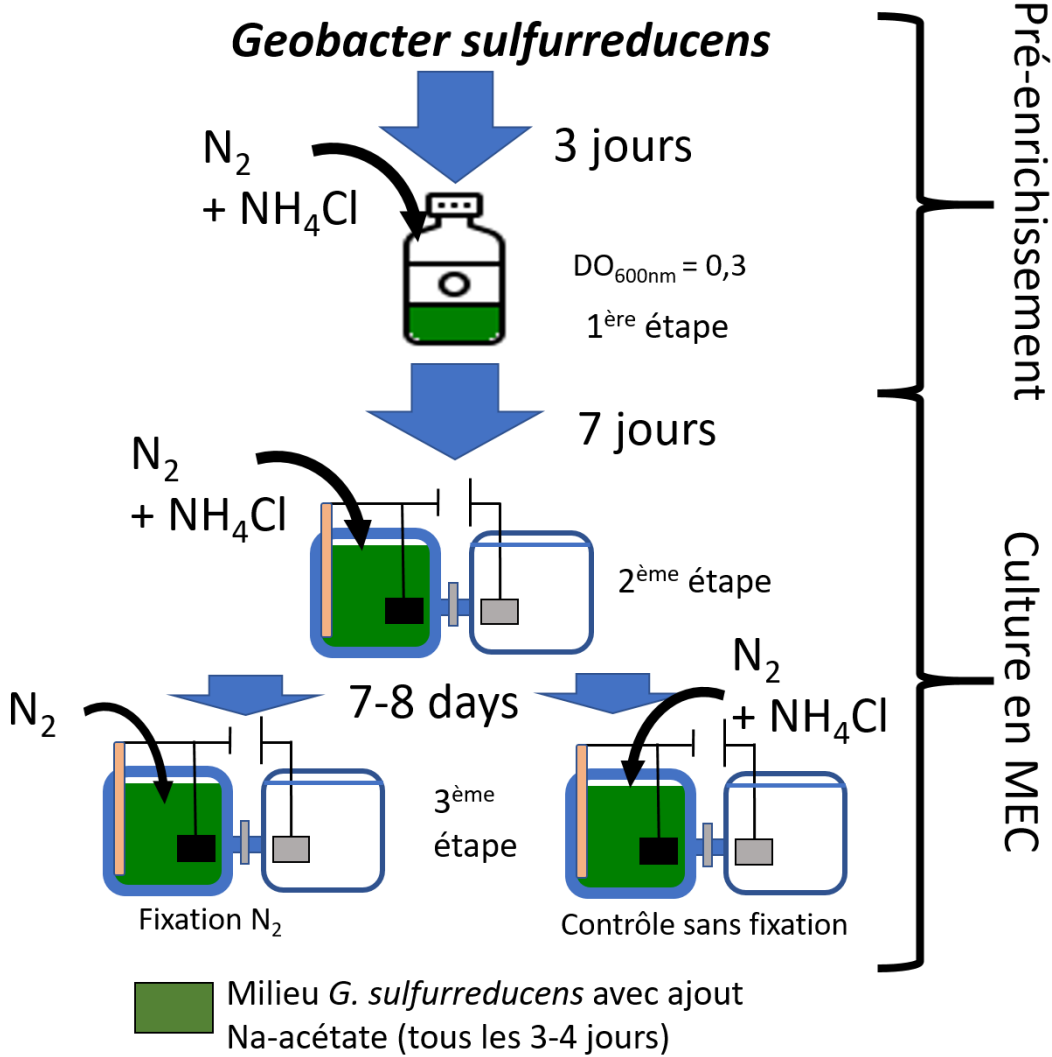


Figure 2-6: Déroulement des cultures de *Geobacter sulfurreducens* pour la formation de biofilm anodique pour la fixation de  $N_2$



### 2.3. *Enrichissements de bactéries autotrophes diazotrophes*

#### 2.3.1. *Inoculum*

Des échantillons de sols provenant d'une forêt, de rhizosphère de culture de haricots et de terreau commercial ont été utilisés comme sources d'inoculum. Les échantillons ont été récoltés dans des forêts et des jardins de La Haute vallée de l'Aude en France. La localisation exacte est indiquée dans le dépôt NCBI (voir analyse partie analyse des communautés). Ces sources ont été sélectionnées en fonction de leur abondance supposée en bactéries fixatrices de N<sub>2</sub> et leur rapport C/N théorique issu de la littérature (Khan et al., 2016). Les échantillons de sols ont été prélevés par carottage à une profondeur de 5 à 15 cm. Chaque prélèvement a été homogénéisé avant récupération de 1-2mg de chacune des trois sources. Les prélèvements de chaque source ont été mélangés pour obtenir les inocula pour 50 mL de milieu d'enrichissement.

#### 2.3.2. *Milieu d'enrichissement*

Le milieu de culture a été formulé sur la base du milieu H3 (81 DSMZ) pour l'enrichissement des bactéries chimiolithotrophes du sol. La base du milieu était composée de 2,3g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> et 2,9g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O par litre comme tampon, 0,5g MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 0,01g CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O, 0,005g MnCl<sub>2</sub> 4H<sub>2</sub>O, 0,005g NaVO<sub>3</sub> H<sub>2</sub>O et 5mL de solution d'éléments traces SL-6 et 5mL de solution de vitamine par litre d'eau osmosée. Du citrate de fer a été ajouté dans les bouteilles d'enrichissement à une concentration de 0,05 g/L mais pas dans les MEC pour utiliser la cathode comme seule source d'électron. La solution de C organique était composée d'extrait de levure, de Na-acétate, d'acide DL-malique, de Na-lactate, de Na-pyruvate et de D-mannitol avec une concentration finale de 1g/L chacun et 2g/L de D-glucose dans le milieu total. Du NH<sub>4</sub>Cl a été ajouté à 1 g/L pour l'enrichissement des bactéries sans fixation de N<sub>2</sub>. La solution d'élément trace SL-6 était composée de 0,1g ZnSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 0,03g MnCl<sub>2</sub> 4H<sub>2</sub>O, 0,3g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0,2 CoCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O, 0,01g CuCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O, 0,02g NiCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O et 0,03g Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O par litre de solution et la solution de vitamine 10 mg de Riboflavine, 50 mg de Thiamine-HCl 2H<sub>2</sub>O, 50 mg d'acide nicotinique, 50 mg de Pyridoxine HCl, 50 mg de Ca-pantothenate, 0,1 mg de Biotine, 0,2 mg d'acide folique et 1 mg de vitamine B<sub>12</sub> pour 1 L d'eau osmosée. Toutes les expériences d'enrichissement ont été maintenues à +30°C et le pH a été ajusté à 6,8 avec du NaHCO<sub>3</sub> dans la MEC et l'enrichissement sans C organique. Lorsque la solution de C organique a été utilisée, le pH était compris entre 6,3 et 6,5. Les solutions de tampon, de citrate de fer, de vitamines et la solution de C organique ont été stérilisées séparément du reste du milieu passé à l'autoclave 20 min 121°C. Le tampon, le citrate de fer et les solutions de C organique ont été

stérilisées à l'autoclave 20 min 121 °C et la solution de vitamine a été filtré sur filtre stérile 0,2µm.

### 2.3.3. Procédures

Deux procédures de pré-enrichissement ont été utilisées et sont présentées sur la Figure 2-7. Pour la première procédure, les trois sources d'inoculum ont été utilisées pour ensemercer trois bouteilles différentes contenant le même milieu. Après un batch de 20 jours, de nouvelles bouteilles de culture ont été ensemençées avec 2mL de chacune des bouteilles de la première culture. La seconde procédure de pré-enrichissement s'est faite avec l'inoculation d'une bouteille avec 1-2 mg de chacun des échantillons alors mélangés. Ces deux-pré-enrichissements ont été faits avec le milieu minéral ou avec le milieu minéral supplémenté de sources de carbone organique comme donneurs d'électrons. Les pré-enrichissements en milieu minéral ont été à la base de l'enrichissement de bactéries hydrogénotrophes diazotrophes hors système bioélectrochimique et les pré-enrichissements en présence de source de C organique ont été à la base des enrichissements en système bioélectrochimique. Pour tous les travaux sur biocathode, une première chronoampérométrie a été réalisée sur deux jours dans les électrolyseurs microbiens (MEC) avec du C organique dans le milieu pour connaître l'intensité du courant en absence de bactéries avant inoculation. Deux réacteurs abiotiques ont été mis en œuvre pour connaître la densité de courant dans un milieu sans C organique pendant 15 jours. Dans l'objectif de valider le rôle de la cathode comme seule source d'électron, deux réacteurs à potentiel de circuit ouvert (OCV) ont été utilisés. La densité de courant mesurée dans les réacteurs abiotiques sur de courtes durées a alors été utilisée comme référence pour être ensuite comparé avec les densités de courant mesurées après inoculation et suivre l'augmentation des activités de réduction à la cathode.

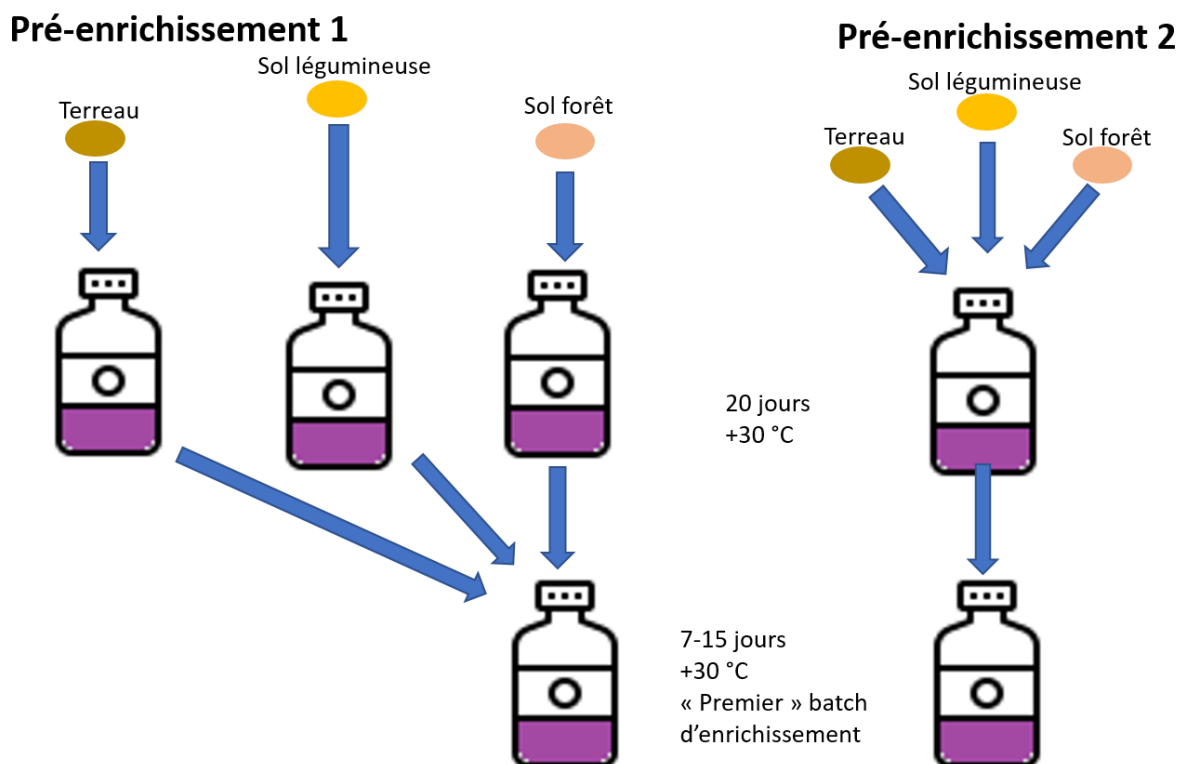


Figure 2-7: Schéma du déroulement des deux procédures de pré-enrichissement utilisées

Deux procédures d'enrichissements ont été utilisées. Ces procédures reposent sur un principe d'enrichissement séquentiel en enrichissant séparément les traits recherchés dans nos communautés, à savoir la fixation de  $N_2$  et l'utilisation d'une source d'électron inorganique.

La première méthode d'enrichissement, en présence de cathodes polarisées ou non, dénommé PCE et nPCE (Polarized Cathode enrichment et non-Polarized Cathode enrichment), a été réalisée en trois étapes :

- Une première étape en bouteille de 120 mL avec le milieu inorganique N free complété par une source de C organique. Cette première étape a été utilisée pour sélectionner les bactéries fixatrices de  $N_2$  en utilisant du carbone organique comme source d'électron. L'espace de tête était composé d'un mélange  $Ar/O_2/N_2$  (80/5/15) à 0,5 bar (pression absolue) pour éviter une surpression dans les bouteilles. Les cultures ont été faites dans des bouteilles contenant 50 mL de liquide et 70 mL d'espace de tête. Des repiquages de ces enrichissements ont été faits tous les 7 jours pendant 6 semaines. Le temps entre 2 repiquages a ensuite été réduit à 3-4 jours en utilisant 10% du volume de la culture précédente (5mL/50mL).
- Après 55 jours d'enrichissement en 10 batchs successifs, les cultures enrichies ont été utilisées comme inoculum des chambres cathodiques des MEC (PCE) et OCV (nPCE) pour la seconde étape de l'enrichissement. Les MEC PCE et nPCE contenaient le même milieu inorganique complété par 10% de la source de C organique chaque semaine

pour commencer l'enrichissement des bactéries autotrophes. L'inoculation des chambres cathodiques de MEC (PCE et nPCE) en présence de carbone organique a été faite pour accélérer la croissance des bactéries sur les cathodes. 80% du milieu a été renouvelé toutes les deux semaines pour favoriser la croissance du biofilm sur la cathode. La composition de l'espace de tête a été suivie par CPG avec l'objectif de maintenir un niveau d'O<sub>2</sub> inférieur à 10% du volume de gaz avec un flush au N<sub>2</sub> si la pO<sub>2</sub> devenait trop importante.

- Pour la dernière étape de cet enrichissement, le CO<sub>2</sub> a été utilisé comme source de carbone comme présenté en Figure 2-8. L'apport en C organique a alors été interrompu lorsqu'une densité de courant significative était mesurée dans les MEC PCE par rapport aux électrolyseurs abiotiques et les membranes ont été changées pour éviter le carbone organique pouvant être déposé dessus. Cette étape a été utilisée pour ne sélectionner que les bactéries pouvant utiliser les électrons fournis par la cathode soit directement, soit par des intermédiaires comme le H<sub>2</sub> ou par des échanges avec des bactéries récupérant les électrons de la cathode. Une atmosphère de 80/20 CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub> a été imposée dans l'espace de tête lorsque le milieu a été remplacé, avec des traces d'O<sub>2</sub> maintenues à moins de 5%. Les milieux ont ensuite été renouvelés tous les 15-30 jours. Le récipient de recyclage des gaz a été rempli de CO<sub>2</sub> et était remplacé par un neuf lorsque l'O<sub>2</sub> représentait plus de 5% du volume en raison de la diminution du volume de gaz et/ou de fuites d'air. Les témoins OCV (nPCE) ont suivi le même enrichissement que les MEC polarisées (PCE) mais sans suivi des densités de courant. Aucune source d'énergie n'était disponible dans les témoins OCV (nPCE) à l'exception du C organique utilisé au début de l'enrichissement. Ce pré-enrichissement dans un milieu supplémenté en C organique était inspiré des travaux de Z. Zaybak (2013) sur l'enrichissement de bactéries autotrophes facultatifs sur une biocathode pour la fixation du CO<sub>2</sub> (Zaybak et al., 2013). Cette procédure a été utilisée ici pour permettre un développement du biofilm plus rapide que dans un milieu inorganique pour l'enrichissement de bactéries chimolithotrophes. Elle a également été utilisée pour confirmer la pertinence d'utiliser une MEC pour enrichir efficacement les bactéries autotrophes facultatives depuis des échantillons de sol. De plus, certaines des bactéries autotrophes enrichies dans les enrichissements PCE sont supposées électrotrophes, apportant une nouvelle méthode d'enrichissement des bactéries électrotrophes depuis des échantillons de sol.

Dans la deuxième méthode d'enrichissement avec apport d'H<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>E, H<sub>2</sub>-fed enrichment), des bactéries autotrophes diazotrophes ont été enrichies à partir d'échantillons de sols dans un milieu inorganique avec du H<sub>2</sub> exogène apporté comme seule source d'électrons. Ces

enrichissements ont été obtenus par pré-enrichissement des bactéries strictement autotrophes en utilisant 50 ml de milieu inorganique dans une bouteille de 120 ml. L'espace de tête était constitué d'un mélange de 75/15/8/2 H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> à 1,5 bar (pression absolue) au départ. Deux batchs de deux semaines ont été réalisés avec du NH<sub>4</sub>Cl comme source d'azote en première étape de cet enrichissement comme le présente la Figure 2-8. Cette source d'azote a ensuite été remplacée par du N<sub>2</sub> comme seule source d'azote pour enrichir les bactéries fixatrices de N<sub>2</sub> dans la deuxième étape de l'enrichissement. Une centrifugation (10min, 7500 RPM, ~7500 g) de 80% du milieu initial (40mL) a été faite à chaque repiquage, tous les 15-30 jours, pour conserver une biomasse suffisante. Les culots obtenus après centrifugation ont été suspendus dans 5 ml de milieu stérile avant de servir pour les repiquages. La croissance attendue était plus longue que pour les enrichissements avec du C organique comme source de carbone et d'électrons (PCE et nPCE).

Après environ 398 jours d'enrichissement dont 343 en MEC, les communautés bactériennes enrichies par PCE (polarized cathode enrichment) ont servi d'inocula pour de nouvelles MEC en utilisant le même milieu minéral. Ainsi, après le batch se terminant au 398<sup>ème</sup> jours d'enrichissement, 200mL du milieu cathodique des communautés enrichies ont été utilisés pour l'inoculation de nouvelles MEC identiques à celles des enrichissements (deux nouvelles MEC polarisées et pas de nouvelles OCV). Ces deux nouveaux réacteurs, appelés PCE B (PCE Bulk) ont été utilisés pour observer la formation du biofilm en suivant la fixation de N<sub>2</sub> par la même méthode que celle utilisée à la fin des enrichissements pendant 80 jours. Cette méthode de mesure de la fixation de N<sub>2</sub> n'a pu être appliquée aux enrichissements qu'après 340 jours d'enrichissement et n'a donc pas pu être suivi lors du développement des biofilms en enrichissement. Les cathodes des enrichissements PCE après 398 jours ont été utilisés dans des MEC appelées PCE E (PCE Electrode). Ces nouveaux réacteurs apportent des résultats complémentaires sur la vitesse de formation d'un biofilm avec fixation de N<sub>2</sub> sur une cathode. Les enrichissements ont été suivis pendant 482 jours au total (hors pré-enrichissement) avec 365 jours environ en MEC avec CO<sub>2</sub> comme seule source de carbone. Un échange des membranes a également eu lieu entre les réacteurs des cathodes des enrichissements PCE (PCE E) et les réacteurs inoculés avec les milieux (PCE B) pour vérifier si une perte de densité de courant observée pendant les enrichissements pouvaient être en lien avec les membranes.

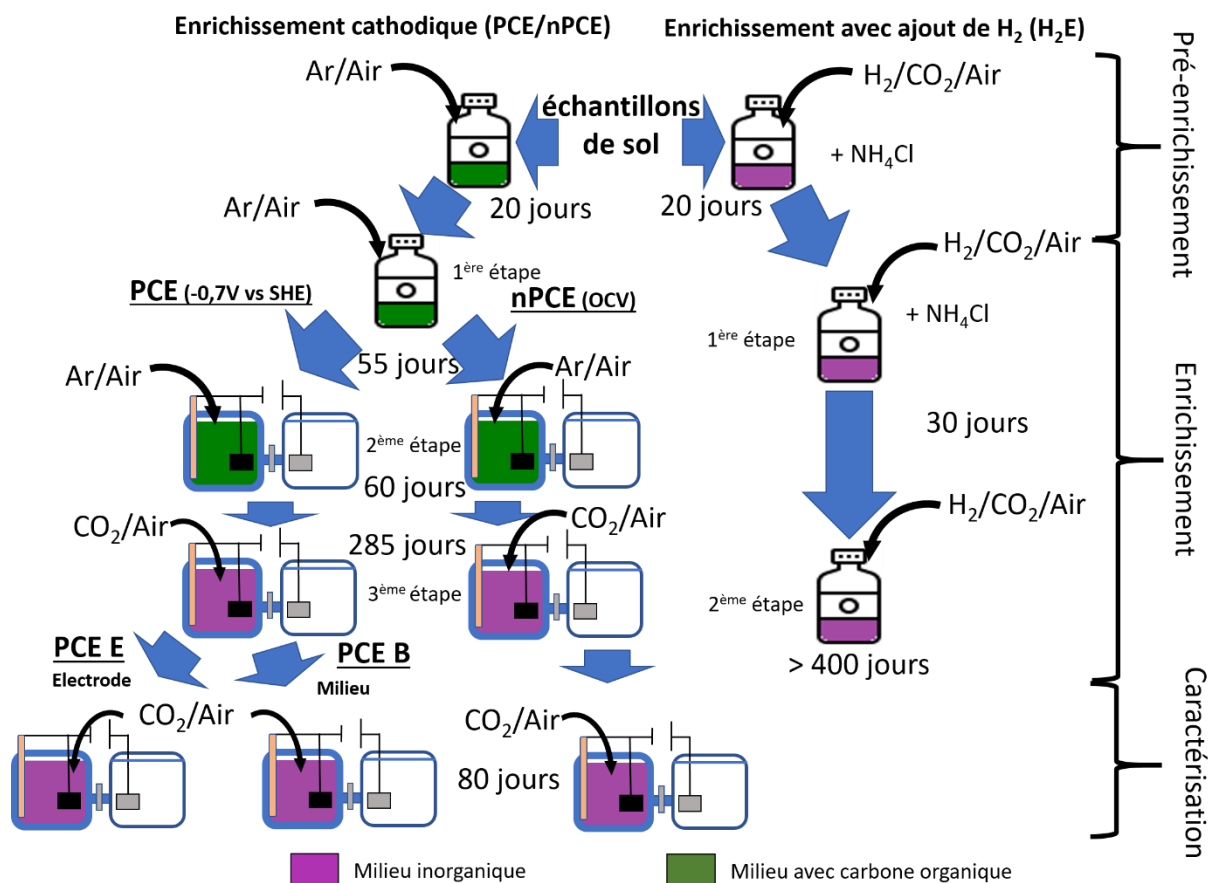


Figure 2-8: Schéma résumé du déroulement des enrichissements de bactérie fixatrice de  $N_2$  et autotrophe avec et sans cathode

#### 2.4. Souches pures pour la reconstruction d'une biocathode fixant $N_2$

Pour la formation de biocathodes, les souches utilisées ont été sélectionnées sur la base de nos hypothèses sur le fonctionnement des communautés microbiennes préalablement enrichies. Ces souches ont été choisies comme modèles de différents métabolismes qui semblaient être importants pour la fixation de  $N_2$  sur une biocathode. Toutes les souches utilisées pour la reconstruction de biocathode ont été reçues au laboratoire en milieu liquide ou gélosé. Les souches ont toutes été cultivées dans les milieux conseillés par la banque DSMZ pendant quatre batchs successifs. Les deux premiers batchs ont été faits en tube Hungate pendant trois jours chacun avec plusieurs dilutions (0, 10<sup>ème</sup>, 100<sup>ème</sup>) pour *Desulforamulus ruminis* à cause d'une coloration du milieu et c'est la dilution au dixième qui a été utilisée pour le repiquage en bouteille. Les autres souches, arrivées sur gélose, n'ont pas eu de dilution. Pour *Azospirillum lipoferum*, arrivée plus tardivement que les autres souches, un batch en tube Hungate a été omis. Le troisième batch a été fait en bouteille pendant quatre jours avant repiquage pour une nuit dans une bouteille de milieu propre avant la mise en cryobanque. Les cryobanques ont été préparées avec des aliquots de 1mL de culture par tube de cryobanque.

1mL de milieu propre avec 20% (v/v) de glycérol a été ajouté pour obtenir 2mL de milieu par cryobanque à 10% de glycérol. Les tubes utilisés pour la cryobanque ont ensuite été stockés à -80°C. Les cultures sont donc issues de ces cryobanques, sauf mention contraire, comme le présente le résumé de la Figure 2-9.

#### 2.4.1. *Xanthobacter autotrophicus*

*Xanthobacter autotrophicus* (depuis DSMZ, souche 7C DSM 432) a été utilisé comme modèle de bactérie hydrogénotrophe diazotrophe. Cette souche a été choisie pour les tests en culture pure car, selon les analyses de fragments d'ADNr 16S, une souche proche a été retrouvée de façon abondante dans les milieux des enrichissements en cathode polarisée (PCE) ou en bouteille avec H<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>E). De plus, Liu et al. (2017) avaient déjà montré sa capacité à fixer l'azote et le carbone à partir d'H<sub>2</sub> produit sur une cathode. Elle a donc été choisie pour sa capacité connue à fixer N<sub>2</sub> sur H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>.

Le milieu utilisé pour la mise en culture de *X. autotrophicus* pour la préparation de cryobanque et les repiquages après réception de DSMZ consistait à 5g de peptone et 3g d'extrait de viande pour 1 L d'eau osmosée. Ce milieu a été stérilisé par autoclave de 121°C 20min avant utilisation

#### 2.4.2. *Desulforamulus ruminis*

*Desulforamulus ruminis* (*Desulfotomaculum ruminis* jusqu'en 2021, depuis DSMZ, souche DL DSM 2154) est une bactérie sulfato-réductrice diazotrophe. Elle est très proche d'un genre (*Desulfotomaculum*) déjà retrouvé dans des systèmes de bioélectrochimie (Zaybak et al., 2013). Ce genre comprend également plusieurs espèces pouvant utiliser H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> comme seule source d'énergie (Aullo et al., 2013). Des bactéries de ce genre microbien sont connues pour pouvoir fixer le CO<sub>2</sub> et le réduire en acétate par le cycle de Calvin-Benson-Bassham (Aullo et al., 2013). *D. ruminis* peut également utiliser H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> cependant il semble que l'acétate, même en faible quantité, soit nécessaire comme source de carbone (1mM) (Watanabe et al., 2020). Cette souche a été choisie pour les tests en culture pure car, selon les analyses de fragments d'ADNr 16S, une souche proche a été retrouvée de façon abondante dans les enrichissements en cathode polarisée (PCE) ou en bouteille (H<sub>2</sub>E).

*D. ruminis* a été cultivé dans un milieu pour *Desulfovibrio* de Postgate modifié soit 0,5 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1g NH<sub>4</sub>Cl, 1g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,1g CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O, 2g MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 2g Na-DL-lactate, 1g d'extrait de levure, 0,5g FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 0,5g de L-cystéine et 0.5mL de resazurine à 0,1% pour 1 litre d'eau osmosée. Ce milieu a été utilisé pour le repiquage depuis la préparation de la cryobanque et pour les repiquages de *D. ruminis* en condition propice à la croissance. La cystéine et le sulfate

de fer ont été ajoutés au milieu après avoir fait bouillir et purgé celui-ci au N<sub>2</sub>. Le milieu a ensuite été passé à l'autoclave pour être stérilisé à 121°C pendant 20min.

Au cours de la première série de batchs en milieu minéral avec H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> seul comme source d'énergie et de carbone, la souche de *Desulforamulus ruminis* a été utilisée en décalé par rapport aux autres souches pour valider la procédure (sept jours d'avance). Un décalage sur le temps entre les prélèvements de cette souche par rapport aux autres souches est visible dans les résultats. Après utilisation des lavages, avec ou sans acétate, toutes les cultures ont été faites en même temps.

#### 2.4.3. *Comamonas testosteroni*

*Comamonas testosteroni* (depuis DSMZ, DSM 50244) a été utilisée comme modèle de bactérie hétérotrophe diazotrophe d'après sa présence dans nos enrichissements et son métabolisme hétérotrophe reconnu (Willems & Gillis, 2015). On suppose que cette bactérie a utilisé l'acétate produit dans le milieu en se servant de l'O<sub>2</sub> comme accepteur final d'électrons pour obtenir l'énergie nécessaire à la fixation de N<sub>2</sub>. Cette souche de *C. testosteroni* a été choisie pour les tests en culture pure car, selon les analyses de fragments d'ADNr 16S, une souche proche a été retrouvée de façon abondante dans les enrichissements en cathode polarisée (PCE).

Le milieu utilisé pour le repiquage de *C. testosteroni* est le même que pour *X. autotrophicus*, à savoir 5 g de peptone et 3 g d'extrait de viande par litre d'eau osmosée. Ce milieu a été stérilisé par autoclavage à 121°C 20 min.

#### 2.4.4. *Azospirillum lipoferum*

Enfin, *Azospirillum lipoferum* (depuis Institut Pasteur, CIP 106280 souche Sp. 59b) a été utilisé comme bactérie mixotrophe diazotrophe. En effet, ce genre bactérien est connu pour une fixation de N<sub>2</sub> en présence d'H<sub>2</sub> mais son métabolisme est plus rapide en présence de carbone organique et l'utilisation d'H<sub>2</sub> est inhibé (Fu & Knowles, 1988). Cette souche a été choisie pour les tests en culture pure car, selon les analyses de fragments d'ADNr 16S, une souche proche a été retrouvée de façon abondante dans les enrichissements en cathode polarisée (PCE).

*A. lipoferum* a été cultivée dans un milieu contenant 0,1g NaCl, 0,4g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,1g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,2 MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 0,02g CaCl<sub>2</sub>, 0,01 FeCl<sub>3</sub>, 0,002g Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O, 5g Na-malate et 0,05g d'extrait de levure pour 1 litre d'eau osmosée. Ce milieu a été stérilisé à l'autoclave pendant 20min à 121°C et utilisé pour la préparation de la cryobanque de cette souche. Les cultures de reprise d'*A. lipoferum* ont été faites dans le même milieu que les enrichissements en présence de carbone organique. Ce milieu contenait 2,3g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> et 2,9g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O par litre comme



tampon, 0,5g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,01g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,005g  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0,005g  $\text{NaVO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  et 5mL de solution d'éléments traces SL-6 et 5mL de solution de vitamine par litre d'eau osmosée. Du citrate de fer a été ajouté dans les bouteilles d'enrichissement à une concentration de 0,05 g/L. Et la solution de C organique contenait de l'extrait de levure, du Na-acétate, de l'acide DL-malique, du Na-lactate, du Na-pyruvate et du D-mannitol à une concentration finale de 1g/L chacun et 2g/L de D-glucose. Les compositions des solutions de vitamine et d'éléments traces sont données dans le paragraphe sur le milieu des enrichissements. Ce milieu a été stérilisé en séparant le tampon, la solution de C organique et la solution de vitamine de la base du milieu. Toutes les solutions ont été passées à l'autoclave 20 min à 121°C à l'exception de la solution de vitamine qui a été filtrée à 0,2 $\mu\text{m}$ .

#### 2.4.5. Procédure

Après repiquage des cryobanques de chaque souche dans les milieux conseillés, des lavages des cultures entre les deux milieux (riches et minéral) ont été faits quand indiqués dans les résultats et comme présentés dans la Figure 2-9. Ces lavages consistaient en la centrifugation d'une partie des cultures (10 à 20mL) à 2000 g pendant cinq minutes puis un remplacement du surnageant par du milieu minéral propre (10 à 20mL). Après ajout du milieu neuf, une nouvelle centrifugation à 2000 g a été effectuée avant un nouveau changement de milieu par du milieu minéral. Pour les cultures en bouteille, des triplicats ont été réalisés pour chaque souche. Lors de la mesure de la fixation de  $\text{N}_2$  par la méthode ARA, une bouteille a été gardée sans acétylène pour servir à la mesure d' $\text{H}_2$  et pour les repiquages de la première série de batchs.

Pour contrôler le rôle des interactions supposées d'après les communautés enrichies, plusieurs cultures ont été réalisées. Chaque souche a d'abord été cultivée seule dans le même milieu que les enrichissements en bouteille avec  $\text{H}_2$  apporté ( $\text{H}_2\text{E}$ ) en repiquant successivement les souches d'un batch à l'autre pendant trois batchs de 7 à 30 jours. Ce milieu était le même que pour les repiquages depuis la cryobanque de *A. lipoferum* sans la solution de carbone organique mais avec  $\text{H}_2$  et  $\text{CO}_2$  comme sources d'électrons et de carbone. Il s'agissait du même milieu que dans les enrichissements en MEC (PCE). À la suite de ces cultures et pour s'assurer de l'absence de métabolites carbonés issus des cultures en milieu riche, les lavages présentés précédemment ont été utilisés pour trois batchs. Ces trois batchs ont tous utilisé comme inoculum des cultures fraîches en milieu riche issues des cryobanques. Il n'y a donc pas eu de repiquages successifs, comme le présente la Figure 2-9. Le premier de ces batchs a duré sept jours, le second présenté a été plus long et a duré 34 jours. Enfin, le

dernier batch a duré 15 jours, mais avec une réduction de la quantité d'O<sub>2</sub> apporté en passant de 5% du mélange à moins de 3% en moyenne.

Le deuxième type de culture a été réalisé en cultivant les souches dans le même milieu inorganique avec un supplément de Na-acétate jusqu'à 0,5 g/L. Ces cultures ont duré 7, 8 et 14 jours. Le même mélange gazeux a été utilisé dans l'espace de tête, à savoir CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>/N<sub>2</sub> à 30/40/5/25 préparé à partir d'un mélange commercial à 50/50 H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>. Les bouteilles ont été dégazées avec le mélange H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> pendant 15-20 minutes avant d'ajouter de l'air jusqu'à une pression de 1.5 bar (absolu). La composition des espaces de têtes a alors été relevée après 12-24h pour attendre l'équilibre entre les phases aqueuse et gazeuse. Afin d'étudier l'impact de la présence d'O<sub>2</sub> dans l'espace de tête, un batch sur H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub> seul a été fait avec un niveau en O<sub>2</sub> inférieur à 3% et un batch supplémentaire a été réalisé pour *D. ruminis*, bactérie anaérobie, en absence complète d'O<sub>2</sub> en bouteille et en MEC. Toutes ces cultures ont été réalisées en bouteilles de 120 mL avec 50 mL de milieu, à +30°C et sans agitation (pour favoriser les gradients en O<sub>2</sub>). Le pH initial étant compris entre 6,5 et 6,8 sur H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> et a pu descendre jusqu'à 6,2 avec Na-acétate avant ajustement avec quelques gouttes de NaOH à 6M. Le troisième et dernier batch avec Na-acétate a vu aussi l'utilisation d'une dilution au dixième au moment du lavage pour les cultures de *D. ruminis* et au demi pour les autres souches. Pour ce faire, 2 mL de culture de *D. ruminis* ont été mélangés à 18 mL de milieu minéral stérile et 10 mL dans 10 mL pour les autres souches avant la première centrifugation. Cette dilution avait pour objectif de faire commencer toutes les souches à des densités optiques équivalentes.

Enfin, une dernière culture en bouteille a été réalisée avec un mélange de *A. lipoferum* et *D. ruminis* d'après les hypothèses sur les interactions dans la communauté enrichie. Cette culture a été réalisée en bouteille de 120 mL avec inoculation des deux souches à même densité optique (0,2-0,3). Les inocula étaient issus de souches en culture riche depuis la cryobanque. Après trois jours, des bouteilles de milieu pauvre ont été inoculées avec 5 mL de culture riche en gardant séparé les deux souches. Après une journée, 10 mL de culture d'*A. lipoferum* et 5 mL de culture de *D. ruminis* dilué dans 5 mL de milieu propre stérile anaérobie sont centrifugés à 2000g pendant cinq minutes. Après élimination du surnageant, les culots ont respectivement été suspendus dans 10 mL de culture d'*A. lipoferum* et dans 5 mL de culture de *D. ruminis* de nouveau dilué dans 5 mL de milieu propre stérile anaérobie. Les cultures sont centrifugées à 2000g pendant 5 min avant élimination du surnageant remplacé par 10 mL de milieu pauvre stérile (et anaérobie pour *D. ruminis*) avant une dernière centrifugation à 2000g cinq minutes. Enfin, après élimination du surnageant, 5 mL de milieu stérile ont été utilisés pour la remise en suspension de chacun des culots bactériens. Ces 5mL ont ensuite été utilisés pour l'inoculation des bouteilles de coculture.

*D. ruminis* et *X. autotrophicus* ont aussi été utilisés pour l'inoculation de la chambre cathodique d'électrolyseurs. Les deux souches en MEC ont été cultivées séparément pour l'étude des interactions entre cathode et bactéries. En effet, *X. autotrophicus* était censé utiliser le H<sub>2</sub> formé abiotiquement et *D. ruminis* était supposé utiliser le H<sub>2</sub> ou l'électrode comme donneur d'électrons. Trois batches ont été faits avec un premier de 26 jours et le deuxième de 31 jours avec l'apport de CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> dans l'espace de tête à 65/30/5. Le troisième batch a été fait sur un seul réacteur inoculé par *D. ruminis* avec un apport de gaz en continu de N<sub>2</sub> et CO<sub>2</sub> sans O<sub>2</sub>. Cet apport était à un ratio de 50/50 à 40/60. Des tests d'arrêt de l'apport de CO<sub>2</sub> et/ou de N<sub>2</sub> ont été faits sur ce réacteur pour voir l'impact de ces gaz sur la densité de courant.

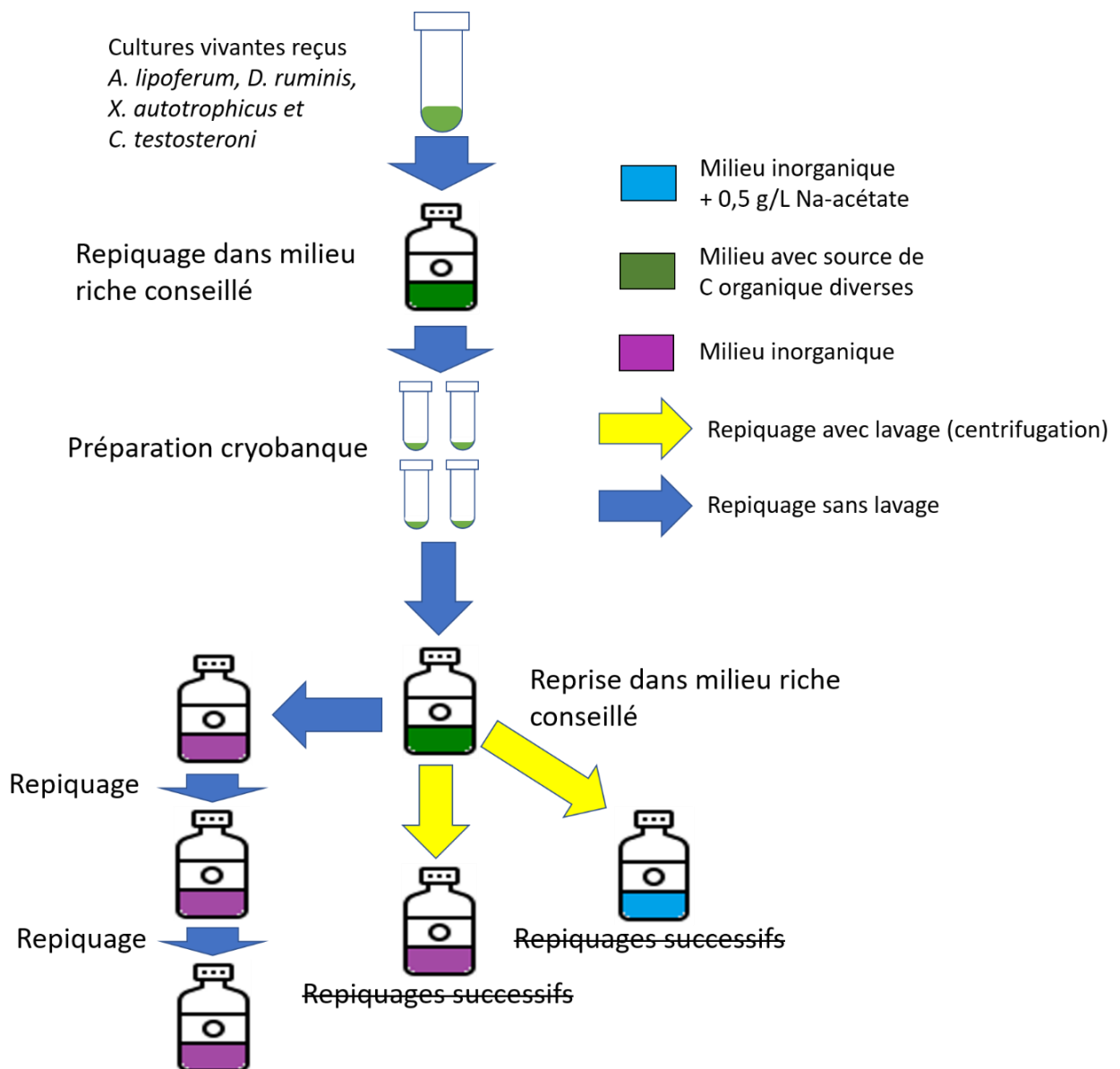


Figure 2-9: Schéma du déroulement des cultures de souches pures réalisées

### 3. MÉTHODES D'ANALYSE

#### 3.1. Analyses chimiques des milieux

Les concentrations de  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$  et  $\text{NO}_3^-$  ont été mesurées dans les milieux de culture à l'aide d'un analyseur séquentiel Gallery+ (Thermo Fisher Scientific) et de kits Hach Lange LCK 303 (2-47 mg/L  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ) et LCK 304 (0.015-2 mg/L  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ) pour  $\text{N-NH}_4^+$ . Les kits ont été utilisés pour les analyses des milieux des cellules colonisées par *G. sulfurreducens* à partir du troisième batch et l'analyseur séquentiel Gallery+ pour les MEC d'enrichissement et les travaux sur souches pures cathodiques. Des dilutions au centième et au millième ont été appliquées aux prélèvements des MEC à *G. sulfurreducens* pour permettre leur lecture dans la gamme des kits. Ces deux méthodes reposent sur des analyses colorimétriques avec une quantification de 0,2 mgN- $\text{NH}_4^+$ /L à 10 mg N- $\text{NH}_4^+$ /L pour le kit utilisé sur analyseur séquentiel Gallery+ et de 0,2 à 5 mgN- $\text{NO}_3^-$ /L. Un étalonnage avec des solutions de concentrations connues a été utilisé pour la calibration de l'appareil. Des prélèvements de 1-2mL ont été réalisés dans les milieux après passage aux MEC sans C organique et au cours de certains batchs d'enrichissement en  $\text{H}_2$  pour les enrichissements cathodiques. Pour les cultures de *G. sulfurreducens*, deux prélèvements de 1 à 2 mL ont été réalisés par réacteur avec l'utilisation de 2 kits par prélèvements (soit quatre mesures par réacteur). Ces échantillons ont été centrifugés à 13500 RPM (~12300g) puis filtrés à 0.2 $\mu\text{m}$  avec des membranes de nylon avant d'être stockés à 4°C. Les culots restants ont été conservés à -20°C et utilisés pour les analyses des communautés. Les AGV et autres composés carbonés ont été mesurés sur CPG Clarus 580 équipée d'un FID et une HPLC Dionex UltiMate 3000 comme présenté dans les travaux de R. Moscoviz et al. et A. Carmona-Martínez (Carmona-Martínez et al., 2015; Moscoviz et al., 2019).

L'azote présent dans la biomasse (biofilm et planctonique) a été estimé à partir de la quantification de l'ADNr 16S par qPCR pour les enrichissements et les souches pures. La base de données rrnDB-5.7 pantaxa a été utilisée pour estimer la quantité bactérienne réelle à partir de la qPCR de l'ADNr 16S en utilisant le nombre de copies théoriques de gène ADNr 16S par espèce, genre ou famille donné par la base de donnée et les résultats du séquençage nos communautés microbiennes (Stoddard et al., 2015). Ensuite, les quantités théoriques de bactéries ont été utilisées pour déterminer l'azote dans la biomasse en utilisant la masse sèche moyenne théorique d'une cellule d'*Escherichia coli* de  $216 \times 10^{-15}$  g/bactérie et avec une masse relative théorique de l'azote dans la biomasse de 11.4% selon la formule de biomasse  $\text{CH}_{1.8}\text{O}_{0.5}\text{N}_{0.2}$  (Heldal et al., 1985; Loferer-Kröbächer et al., 1998). Pour les travaux sur *G. sulfurreducens*, la masse utilisée est de  $2,25 \times 10^{-15}$  g/bactérie (Moscoviz et al., 2017). L'azote présent dans la biomasse a donc été estimé en utilisant l'Équation 2 :

Équation 2: Calcul de la quantité théorique de N d'après la quantification en bactérie

$$N_{\text{biomasse}} = \text{nombre de bactérie théorique} \times \text{masse } E. coli \\ \times \text{Masse relative de N dans la biomasse}$$

Avec  $N_{\text{biomasse}}$  la concentration en azote dans la biomasse en  $\text{mg}_N/\text{L}$ , le *bacteria count* est basé sur le calcul de la concentration en bactérie d'après les résultats de qPCR et séquençage des gènes d'ADNr 16S en bactérie/L, *masse de 1 E. coli* une constante de  $2,16 \times 10^{-10} \text{ mg}/\text{cell}_{E. coli}$  et la *Masse relative de N dans la biomasse* qui est de 11,4% de la masse sèche bactérienne.

Cette méthode d'estimation de l'azote dans la biomasse repose donc sur plusieurs hypothèses qui peuvent apporter un biais dans les résultats calculés. En effet, des variations sur la quantité d'azote entre différentes espèces bactériennes existent, de même que pour les masses des bactéries. Toutefois, cette méthode a pu être utilisée pour calculer l'azote attendu par la perte d'une certaine quantité de biomasse et montrer des résultats très proche de la quantité retrouvée. Ainsi, cette estimation permet de se rapprocher des quantités d'azote réelles.

Pour le suivi de l'oxydation de l'acétate dans les réacteurs à *G. sulfurreducens* et dans les cultures de souches pures avec un apport d'acétate, la concentration en acétate a été mesurée dans les chambres anodiques en début ( $t_0$  ou  $t_1$ ) et en fin de culture ou sur la période correspondant à la culture entre deux ajouts d'acétate (à  $t_0$  et  $t + 3-4$  jours pour *G. sulfurreducens* et 7-14 jours pour les souches pures en bouteilles). L'ajout d'acétate réalisé après 3-4 jours a été pris en compte quand nécessaire. Pour les enrichissements, le point initial permet de confirmer l'absence de sources de carbone et d'azote utilisables par les bactéries. Une mesure des masses sèches de *G. sulfurreducens* en fin de culture a également été effectuée en récupérant la biomasse d'une face d'électrode dans 40 mL de solution saline (9g/L NaCl). 10mL ont alors été prélevés et centrifugés (10 min, 3350 g). Le surnageant a été éliminé et remplacé par 10mL de solution saline propre avant une nouvelle centrifugation (10min, 3350 g). Cette opération de lavage avec la solution saline a été réalisée trois fois avant de laisser sécher l'ensemble à une étuve à  $+60^\circ\text{C}$  pendant 48h. Les contenants ont été pesés avant ajout des liquides, avec les 10mL de solution saline + *G. sulfurreducens* et après le séchage pour calculer le poids sec des biofilms.

En parallèle, la quantité d'azote total du milieu dans la MEC a également été estimée à l'aide de l'analyseur élémentaire CHNS Flashsmart (Thermo Fisher Scientific). L'analyse CHNS est une technique d'analyse élémentaire complémentaire aux techniques d'analyses moléculaires. L'échantillon (2,5 mg) est pesé avec une grande précision dans une capsule d'étain qui est introduite dans un réacteur d'oxydation/réduction chauffé à  $950^\circ\text{C}$ . Un apport contrôlé d'oxygène provoque l'oxydation de l'étain, réaction exothermique qui augmente la

température jusqu'à 1800°C. A cette température, les substances organiques et inorganiques sont converties en gaz ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{N}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{SO}_2$ ), qui, après réduction, sont séparés sur une colonne de chromatographie en phase gazeuse (CPG), détectés par un détecteur à conductibilité thermique (TCD) puis quantifiés par intégration d'un pic résultant de la variation de conduction. 200 mL de milieu ont été récupérés à chaque changement de milieu (15-30 jours, remplacement à 80%). Ces prélèvements ont été séchés sans filtration pendant 4-5 jours dans un incubateur à 60°C. Les masses sèches ont été mesurées sur ces échantillons avant de les lyophiliser. Les échantillons lyophilisés ont ensuite été broyés avec un mortier et 2-4mg de chaque échantillon ont été utilisés dans l'analyseur CHNS. Le taux d'azote mesuré est alors comparé au poids sec mesuré avant la lyophilisation pour connaître la masse d'azote se retrouvant dans le milieu. Aucune analyse CHNS n'a été faite sur l'enrichissement  $\text{H}_2\text{E}$ , les cultures de souches pures et les travaux sur anode en raison d'un volume de culture trop faible (50mL) et de la centrifugation de 80% du milieu pour les repiquages ( $\text{H}_2\text{E}$ ).

### 3.2. Analyse des gaz

Le  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2$  et  $\text{N}_2$  utilisés dans l'espace de tête des enrichissements provenaient de Linde Gas en qualité laboratoire ( $\text{N}_2$  4.5,  $\text{CO}_2$  (>99.5%), mélanges  $\text{CO}_2/\text{H}_2$  50/50  $\pm 1\%$  et 20/80  $\pm 1\%$ ). L'éthylène pur pour l'étalonnage de la mesure de l'éthylène sur chromatographie en phase gazeuse provenait également de Linde ( $\text{C}_2\text{H}_2$  3.0).

Les bilans de gaz ont été réalisés par analyse des compositions des espaces de têtes et mesure des pressions des bouteilles et MEC tous les 1-3 jours pour toutes les cultures. La pression a été mesurée manuellement à l'aide d'un manomètre Keller LEO 2 (KELLER AG, Wintherthur, Switzerland). Les analyses de composition ont été faites sur une CPG Perkin Elmer Clarus 580 équipé de colonnes RT-Q-Bond et RT-MSieve 5Å avec un TCD permettant la quantification d' $\text{H}_2$ ,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{N}_2$ ,  $\text{O}_2$  et  $\text{CH}_4$  avec Ar comme gaz vecteur comme décrit par A. Carmona-Martínez (Carmona-Martínez et al., 2015). Les mesures d'acétylène et d'éthylène utilisées pour la méthode ARA (décrite ci-dessous) ont été réalisées sur une CPG Perkin Elmer Clarus 480 équipé de colonnes RT-U-Bond et RT-MSieve 5Å avec un TCD et He comme gaz vecteur avec l'utilisation d'un gradient de température dans le four (40°C à 55°C) nécessaire pour la mesure d'acétylène et éthylène.

La présence d'azote dissous dans le milieu peut être due à plusieurs mécanismes comme la mort bactérienne qui va libérer l'azote emmagasiné pendant la croissance. On pourrait alors le retrouver sous forme de  $\text{NH}_4^+$ , ou bien dans des acides aminés et protéines. C'est pourquoi il a été nécessaire d'utiliser une méthode spécifique pour suivre et valider la fixation de  $\text{N}_2$  dans nos enrichissements. La méthode Acetylene reduction assay (ARA) vise à quantifier la

vitesse de fixation de N<sub>2</sub> grâce à la capacité des nitrogénases à réduire l'acétylène en éthylène. Cette réaction se fait à une vitesse proportionnelle à la vitesse de fixation de N<sub>2</sub> selon le rapport théorique C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>:N<sub>2</sub> (3:1) (Bergersen, 1970; Soper et al., 2021). Les concentrations en acétylène ont été calculées comme présentées ici :

*Équation 3: Calcul de la quantité d'éthylène*

$$n_{C_2H_4} = \frac{P_{NaOH} V_{C_2H_4}}{RT} = \frac{(P_{total} - P_{CO_2}) \times V \times \%_{C_2H_4}}{RT}$$

Avec ( $P_{total}$  la pression dans l'espace de tête,  $P_{CO_2}$  la pression partielle en CO<sub>2</sub> mesurée sans piège à soude,  $V$  le volume de gaz de l'espace de tête,  $\%_{C_2H_4}$  la part d'éthylène mesuré dans l'espace de tête,  $R$  la constante des gaz parfaits et  $T$ , la température des réacteurs.

Et la vitesse de production d'éthylène :

*Équation 4: Vitesse de production d'éthylène*

$$\Delta[C_2H_4] = \frac{[C_2H_4]_{t1} - [C_2H_4]_{t0}}{t1 - t0} = \frac{\frac{n_{C_2H_4_{t1}}}{V} - \frac{n_{C_2H_4_{t0}}}{V}}{t1 - t0}$$

Avec  $\Delta[C_2H_4]$  la vitesse de production d'éthylène en  $\mu\text{mol/L/j}$ ,  $t0$  la dernière mesure sans C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> observé,  $t1$  la première mesure de C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> de l'espace de tête et  $V$  le volume de liquide qui est constant entre deux mesures de la méthode ARA.

L'éthylène produit peut être converti en N<sub>2</sub> fixé théorique en utilisant le facteur de conversion théorique (3:1) (Soper et al., 2021). L'activité spécifique de la fixation de N<sub>2</sub> a ensuite été calculée avec les bactéries fixatrices de N<sub>2</sub> mesurées par quantification du gène *nifH* (voir ci-dessous) utilisé comme marqueur de ces bactéries. Cette activité spécifique correspond à la vitesse de production d'éthylène par bactérie capable de fixer N<sub>2</sub> mesuré par la qPCR du gène *nifH*. L'acétylène utilisé pour le test de réduction de l'acétylène (ARA) a été obtenu en ajoutant du carbure de calcium (CaC<sub>2</sub>) dans de l'eau et recueilli dans un sac pour les gaz. La composition de gaz dans le sac a ensuite été mesurée par chromatographie en phase gazeuse. Le volume de gaz dans le sac a été mesuré par mesure du volume de déplacement dans une éprouvette avec une pompe péristaltique pour le calcul de la quantité de gaz. Le gaz du sac a été ajouté à chaque enrichissement pour atteindre une composition de 10% V/V d'acétylène après retrait d'une quantité équivalente de gaz des espaces de tête. La production d'éthylène a ensuite été suivie quotidiennement pendant 7 jours dans les MEC et 15 dans les bouteilles d'H<sub>2</sub>E par la

CPG Perkin Elmer Clarus 480 avec TCD. Pour assurer la séparation de l'éthylène du CO<sub>2</sub> sur la colonne RT-U-Bond, un piège à CO<sub>2</sub> avec de la soude (NaOH 6M) a été utilisé au moment du prélèvement et est pris en compte dans les calculs. Après la fin de l'utilisation de la méthode ARA, les espaces de têtes ont été flushés avec du N<sub>2</sub> et le système de recyclage de gaz a été changé.

La méthode ARA n'a été réalisée qu'après 18 cycles de batch pour l'enrichissement H<sub>2</sub>E et 11 batchs en MEC avec CO<sub>2</sub> (340 jours).

La méthode ARA n'a pas été réalisée pour la mesure de fixation de N<sub>2</sub> par *G. sulfurreducens* car celle-ci n'était pas encore développée au laboratoire.

La méthode ARA a été réalisée sur les cultures de souches pures à l'exception du cinquième batch sur H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> et du batch avec *D. ruminis* sans O<sub>2</sub> qui ont été utilisés pour suivre la production de biomasse. En bouteille, deux des triplicats ont été utilisés avec le remplacement de 10% du volume de gaz par de l'acétylène, la dernière bouteille étant utilisée pour le repiquage et la mesure d'H<sub>2</sub> dans l'espace de tête (mesure impossible avec acétylène C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> (dommage colonne) sur nos CPG pour la lecture d'H<sub>2</sub>). Le H<sub>2</sub> est estimé sur les bouteilles utilisées pour la méthode ARA d'après la différence entre volume de gaz mesuré par l'appareil et volume injecté pour être retiré de la quantité de gaz pour le calcul de la quantité réelle d'acétylène C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>. L'ajout d'acétylène a été fait après un à deux jours de culture puis a été mesuré au même moment que les autres mesures (Densité optique, gaz) soit une mesure par bouteille tous les 1 à 3 jours. Le nombre de répétition dépend de la durée des batchs. Pour la coculture *D. ruminis* et *A. lipoferum* et le deuxième batch en MEC, la fixation de N<sub>2</sub> a été évaluée dans tous les réacteurs (électrochimiques et bouteilles). L'ajout d'acétylène a été fait après 20 et 26 jours de culture (coculture et MEC respectivement) et les mesures ont été faites pendant quatre à six jours.

### 3.3. Séquençage des communautés et quantification des bactéries

Les quantités de bactéries des communautés obtenues dans les enrichissements et des travaux sur souches pures à la cathode ont été quantifiés selon leur ADNr 16S pour connaître la concentration en bactéries totales. Le gène *nifH* a également été suivi pour la quantification des bactéries fixatrices de N<sub>2</sub> au cours des enrichissements. Ces quantifications ont été suivies par un séquençage de l'ADNr 16S pour connaître les membres importants de chaque communauté enrichie et identifier les rôles possibles. Ce séquençage a été nécessaire pour convertir la quantité d'ADNr 16S en bactéries totales à l'aide de la base de donnée rrnDB-5.7 pantaxa. Pour *G. sulfurreducens*, seul l'ADNr 16S a été quantifié par qPCR et il n'y a pas eu de séquençage pour tous les travaux sur souche pure en milieu pauvre (*G. sulfurreducens* et



souches pures cathodiques). Un échantillon par cryobanque a été utilisé pour inoculer un batch de trois jours en milieu riche avant la prise d'échantillon pour séquençage des cultures de souches pures. Pour analyser les communautés présentes en suspension, 1,8 mL des milieux des MEC (PCE, nPCE et souches pures) et bouteilles de cultures (enrichissement H<sub>2</sub>E et souches pures) ont été prélevés pour la qPCR. Pour les cathodes, 1 cm<sup>2</sup> a été récupéré à plusieurs moments. Le morceau de feutre de carbone a ensuite été finement découpé à l'aide d'un scalpel stérile avant d'être plongé dans 20 mL de milieu inorganique stérile. 1,8 mL a ensuite été récupéré après agitation des 20 mL pour remettre en suspension un maximum de biomasse. Ces échantillons ont ensuite été centrifugés 10 min 13500 RPM (12340g). Le surnageant a été éliminé et les culots conservés pour les extractions d'ADN. Pour les anodes des cultures de *G. sulfurreducens*, une des faces de l'électrode est grattée pour récupérer le biofilm dans 40 mL de solution saline à 9g/L de NaCl. 1,8 mL sont alors prélevés et centrifugés (5000rpm, 10min). 1.8mL ont également été prélevés dans les milieux à la fin des premiers et deuxièmes batchs. Après qPCR, les concentrations mesurées dans les échantillons d'électrodes sont rapportées au volume de milieu.

L'ADN génomique a été extrait à l'aide du kit d'échantillonnage pour l'isolement de l'ADN PowerSoil™ (MoBio Laboratories, Inc., Carlsbad, CA, USA) conformément aux instructions du fabricant. Le programme d'amplification qPCR a été réalisé dans un thermocycleur BioRad CFX96 Real-Time Systems C1000 Touch (Bio-Rad Laboratories, USA). Pour l'analyse des bactéries totales, les amorces 330F (ACGGTCCAGACTCCTACGGG) et 500R (TTACCCPGGCPGTCPGTGCPGAC) ont été utilisées. Pour le mélange qPCR des bactéries : SsoAdvanced™ Universal SYBR Green Supermix (Bio-rad Laboratories, USA), amorce 330F (200 nM), amorce 500R (200 nM), 2 µL d'ADN et de l'eau ont été utilisés jusqu'à un volume de 12 µL. Le cycle de qPCR était le suivant : incubation de 2 min à 95 °C et 40 cycles d'étapes de dissociation (95 °C, 10 s) et d'élongation (61 °C, 20 s). Les résultats ont ensuite été comparés à une courbe standard pour obtenir le nombre de copies de la cible dans l'échantillon. La concentration d'ADNr 16S du milieu des MEC et des cathodes sont tous deux pris en compte dans le calcul de la concentration d'ADNr 16S total des MEC. Ces concentrations sont utilisées comme indicateur de la biomasse présente et l'utilisation d'une base de données du nombre d'opérons 16S par génome bactérien a été utilisé pour estimer la quantité de bactérie réelle. La présence de bactéries fixatrices de N<sub>2</sub> a été contrôlée par qPCR du gène *nifH* de la sous-unité Fe-Fe des nitrogénases (Dos Santos et al., 2012; Gaby & Buckley, 2012). Le gène *nifH* est connu comme un marqueur des bactéries fixatrices d'azotes, commun aux nitrogénases, et est utilisé pour la quantification des bactéries fixatrice de N<sub>2</sub> car il fait partie des gènes nécessaires à la fixation de N<sub>2</sub> (Dos Santos et al., 2012; Gaby & Buckley, 2012). Tous les programmes d'amplification par qPCR ont été réalisés dans un thermocycleur BioRad CFX96

Real-Time Systems C1000 Touch (Bio-Rad Laboratories, USA). Les amorces PolF-TCPGGAYCCSAARCPGBGACTC et PolRmodify inverse-AGSCPGCATCATYTCRCCGGA ont été utilisées (doi : 10.1128/AEM.67.5.2255-2262.2141)(Poly et al., 2001). Le mélange : SsoAdvanced™ Universal SYBR Green Supermix (Bio-rad Laboratories, USA) 6µl, amorce F (500 nM), amorce R (500 nM), 2 µL d'ADN et de l'eau a été utilisé jusqu'à un volume de 12 µL. Le cycle de qPCR était le suivant : incubation de 2 min à 95°C et 40 cycles d'étapes de dissociation (95 °C, 30 s) et d'élongation (60 °C, 30 s). Ensuite, les résultats ont été comparés à une courbe standard pour obtenir le nombre de copies de la cible dans l'échantillon. Ces deux quantifications nous permettent de calculer les ratios de bactéries fixatrices de N<sub>2</sub> par bactérie totale des enrichissements à différents points pour suivre l'enrichissement en bactérie fixatrice de N<sub>2</sub>. Ce ratio peut aussi nous aider à dégager des hypothèses sur le fonctionnement de nos communautés qui pourront être complétés par l'analyse des communautés lors du séquençage.

Après quantification, nos communautés enrichies ont été séquencées selon leur ADNr 16S et les résultats sont disponibles sur la banque NCBI PRJNA976100, Biosample SAMN28447998-SAMN28448066. La région V3-V4 de l'ADNr 16S a été amplifiée par PCR en utilisant des amorces universelles telles que reportées ailleurs (Carmona-Martínez et al., 2015). Le mélange PCR était composé de MTP Taq DNA Polymerase (Sigma-Aldrich, Allemagne) (0,05 u/µL) avec un tampon enzymatique, des amorces avant et arrière (0,5 mM), des dNTP (0,2 mM), de l'ADN de l'échantillon (5-10 ng/µL) et de l'eau jusqu'à l'obtention d'un volume final de 60 µL. 30 cycles de dénaturation (95 °C, 1 min), de recuit (65 °C, 1 min) et d'élongation (72 °C, 1 min) ont été réalisés dans un thermocycleur Mastercycler (Eppendorf, Allemagne). Une étape d'extension finale a été ajoutée pendant 10 min à 72 °C à la fin du 30<sup>ème</sup> cycle d'amplification. Les amplifications PCR ont été vérifiées par le bioanalyseur 2100 (Agilent, USA). La plateforme GenoToul (Toulouse, France <http://www.genotoul.fr>) a utilisé un séquenceur Illumina Miseq (2 x 340 pb paired-end run) pour la réaction de séquençage. Les séquences brutes obtenues ont été analysées à l'aide des outils bioinformatiques. Mothur version 1.39.5 a été utilisé pour le nettoyage, l'assemblage et la vérification de la qualité des lectures. L'alignement a été réalisé avec SILVA version 128 (cette dernière a également été utilisée comme contour taxonomique). Les communautés enrichies séquencées à partir des fins de pré-enrichissement en bouteille ont été utilisées comme communauté initiale avant les enrichissements. Pour les MEC, PCE et nPCE, les communautés séquencées viennent des biofilms formés sur les électrodes à différents moments de l'enrichissement. Deux réplicats par potentiel ont été utilisés. Pour les enrichissements en bouteilles H<sub>2</sub>E, trois à six bouteilles ont été utilisées pour le séquençage et les qPCR de chaque point temporel. Pour les pré-enrichissement, les séquences obtenues correspondent aux communautés pré-enrichies issues de chaque

échantillon de sol et du mélange tel que présenté Figure 2-7. Les communautés enrichies dans les bouteilles d'enrichissements contenant des sources de carbone organique sont également présentées avec le séquençage de 3 bouteilles en fin de premier batch après les pré-enrichissements et après environ 200 jours d'enrichissement dans ces conditions. Les communautés issues des milieux des enrichissements PCE qui ont été utilisées comme inoculum de nouvelles MEC ont également été séquencées. Les communautés formées sur les électrodes de ces nouvelles MEC ont été séquencées en fin de premier batch après inoculation et après deux batchs supplémentaires. Ces séquençages des nouvelles MEC sont utilisés pour suivre les changements de communautés en parallèle de la formation du biofilm sur les cathodes.

## 4. ANALYSE DES DONNÉES

Tous les résultats ont été analysés en utilisant Excel, R (4.2.0) et Rstudio (2022.07.1) pour les calculs et la représentation graphique. Le package Tidyverse a été utilisé pour la manipulation des données. Les packages ggplot2, ggpubr, scales, cowplot, corrplot et palettetown ont été utilisés pour les représentations graphiques. Les analyses statistiques sont basées sur des analyses en composantes principales (ACP) et des tests de Student (*t*-test). La représentation visuelle des abondances relatives bactériennes a été réalisée avec le package phyloseq (McMurdie et Holmes, 2013). Le logiciel Inkscape a également été utilisé pour éditer les graphiques lorsque cela était nécessaire. Les incertitudes indiquées pour les valeurs présentées correspondent aux écart-types.

### 4.1. Calcul du rendement Faradique

L'efficacité des systèmes électrochimiques microbiens peut être évaluée à partir de différents facteurs, à commencer par le rendement faradique anodique  $CE_{An}$  qui correspond au rapport entre la quantité d'électrons ayant transité par le circuit électrique de la chambre anodique à la chambre cathodique et la quantité d'électrons théorique attendue calculée pour la quantité de substrat oxydé. Pour les travaux sur bioanode, le substrat est l'acétate et la quantité d'électrons transférée d'une chambre à l'autre qui est calculée en intégrant le courant mesuré. On a ainsi l'équation 5 pour calculer le rendement faradique des MEC à bioanode.

*Équation 5 : Calcul du rendement faradique anodique de la MEC colonisée par G. sulfurreducens*

$$CE_{An} = \frac{n_{CE}}{n_s}$$

avec

$$n_{C_E} = \frac{\int_{t=0}^t Idt}{F} \text{ et } n_s = \frac{b_s v_{An} \Delta C_s}{M_s}$$

Avec  $I$  l'intensité de courant mesuré,  $F$  la constante de Faraday ( $96485 \text{ C.mol}^{-1}$ ),  $b_s$  le nombre de mole d'électrons générés par l'oxydation d'une mole de substrat (8 moles d'électrons pour l'oxydation d'une mole d'acétate),  $v_{An}$  le volume de la chambre anodique (en L),  $C_s$  la concentration en substrat (en g/L) et  $M_s$  la masse molaire du substrat (59 g/mol pour l'acétate). L'intervalle utilisé pour le calcul d'intégral de l'intensité de courant correspond à celui entre deux mesures d'acétate qui sont celles utilisées pour le calcul de  $\Delta C_s$ .

Dans le cas des MEC pour les enrichissements de biocathodes ou la culture de souches en présence d'une cathode, le rendement faradique cathodique est calculé en suivant l'équation suivante où les électrons apportés théoriquement par le substrat correspondent aux électrons mesurés entre les deux chambres et les électrons calculés dans les produits correspondent alors à la quantité d'électron réellement retrouvé dans la chambre cathodique :

*Équation 6 : Calcul du rendement faradique cathodique dans les MEC colonisées à la cathode*

$$CE_{Ca} = \frac{n_p}{n_{C_E}}$$

avec

$$n_{C_E} = \frac{\int_{t=0}^t Idt}{F} \text{ et } n_p = \frac{b_p v_{Ca} \Delta C_p}{M_p}$$

Avec  $CE_{Ca}$  le rendement faradique en pourcentage d'électrons récupérés dans le circuit électrique,  $n_{C_E}$  calculé de même façon que pour les anodes et  $n_p$  le nombre de moles d'électrons utilisés pour la réduction des produits retrouvés à la cathode qui sont calculés à l'aide de  $b_p$  la stoechiométrie des équations de réduction à la cathode,  $v_{Ca}$  le volume de la chambre cathodique,  $\Delta C_p$  la variation de concentration des produits de réaction de réduction en g/L et  $M_p$  la masse molaire des produits de réduction. Dans le cas des travaux sur bioanode, la production d' $\text{H}_2$  est attendue à la cathode. En utilisant  $\text{H}_2$  comme produit des réactions de réduction à la cathode, les rendements faradiques cathodiques sont appelés rendement de récupération à la cathode et sont appelés  $CE_{H_2}$ . Ce rendement faradique pour la production d' $\text{H}_2$  aux cathodes nous permet de calculer le rendement faradique global du système  $CE_{Cell}$  par le produit du rendement faradique anodique et du rendement faradique cathodique pour

le H<sub>2</sub> ou rendement de récupération à la cathode. L'Équation 7 présente ce calcul du rendement faradique global.

*Équation 7 : Calcul du rendement global de la réaction des travaux sur bioanodes*

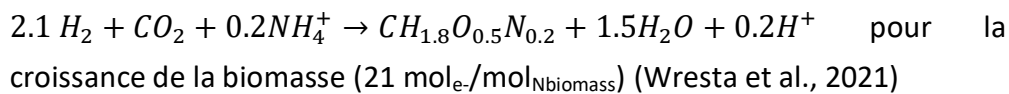
$$CE_{Cell} = CE_{An} \times CE_{H_2}$$

$$= \frac{n_{H_2}}{n_s}$$

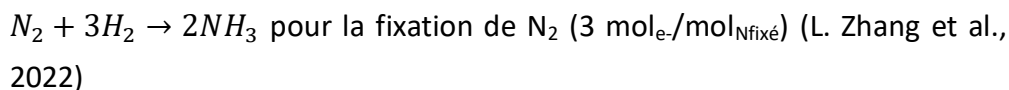
On peut voir au travers de l'Équation 7 que ce rendement est également calculé avec le rapport entre les moles d'électrons retrouvées sous forme d'H<sub>2</sub> après réduction à la cathode ( $n_{H_2}$ ) et les moles d'électrons attendues de l'oxydation du substrat à l'anode ( $n_s$ ).

L'intensité de courant mesurée nous renseigne sur la quantité d'électrons échangés entre les électrodes de travail et les contre-électrodes. L'énergie nécessaire pour la production des métabolites retrouvés dans nos milieux et pour la croissance de biomasse a alors été utilisée pour calculer l'efficacité faradique de nos MEC d'après les équations suivantes :

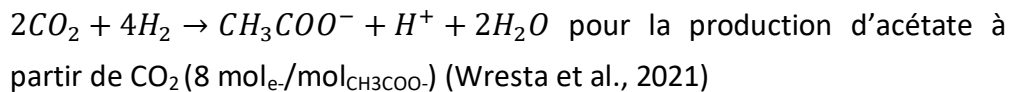
*Équation 8 : Croissance de bactéries autotrophes en anaérobie*



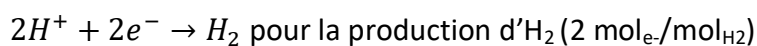
*Équation 9 : équation simplifiée de la fixation de N<sub>2</sub>*



*Équation 10 : Production d'actétate par réduction de CO<sub>2</sub>*



*Équation 11 : Production d'H<sub>2</sub> depuis la réduction des protons*



#### 4.2. Calcul du nombre de bactéries d'après la quantification du gène ADNr 16S par qPCR

Les bactéries ne possèdent pas le même nombre de copies du gène ADNr 16S dans leur génome. De ce fait, l'utilisation de la qPCR du gène ADNr 16S pour le dénombrement de communauté complexe rend discutable l'utilisation de ces résultats tels quels. Dans l'objectif de se rapprocher d'une quantification plus proche de la réalité pour ce type de communauté et en absence d'autres méthodes (surtout pour la quantification des bactéries déposées sur les électrodes), le choix a été fait d'utiliser une large base de données pour faire correspondre un nombre de copies du gène ADNr 16S et la proportion de chaque bactérie dans les communautés. Pour ce faire, nous avons utilisé la base de données rrnDB-5.7 pantaxa de NCBI qui contient une quantification du nombre de copies du gène d'ADNr 16S pour de nombreuses espèces, genres et familles. De là, à partir de nos résultats de séquençages faits jusqu'au rang du genre qui nous donnaient des abondances relatives et des quantifications des copies du gène ADNr 16S dans les communautés, nous avons calculé le nombre absolu de copies absolues de chaque genre. Après avoir calculé le nombre de copies du gène ADNr 16S par genre bactérien de nos communautés, nous avons pu utiliser la base de données de NCBI pour le calcul du nombre de bactéries de chaque genre et donc du nombre de bactéries totales. Les calculs utilisés pour parvenir à cette quantification absolue de nos communautés bactériennes est représenté dans l'Équation 12.

*Équation 12: Calcul de la quantité de bactérie totale selon les résultats de séquençage et qPCR des gènes ADNr 16S et la base de donnée rrndb-5.7*

$$n_{bactéries} = \sum \frac{n_{copies\ ADNr\ 16S} \times \%_{genre}}{n_{copies\ ADNr\ 16S/bactérie}}$$

Avec  $n_{bactéries}$  la quantité de bactéries totales,  $n_{copies\ ADNr\ 16S}$  la quantité totale de copies d'ADNr 16S mesuré par qPCR,  $\%_{genre}$  l'abondance relative d'une espèce en particulier d'après le séquençage des gènes d'ADNr 16S et  $n_{copies\ ADNr\ 16S/bactérie}$  le nombre de copies d'ADNr 16S par bactérie d'une espèce/genre/famille notamment selon la base rrndb-5.7. Le total est alors obtenu en faisant la somme des quantités de bactéries pour chaque espèce/genre/famille.

Cette méthode de quantification de nos bactéries est cependant discutable. En effet, la prise d'échantillon sur les cathodes, les étapes d'extraction de l'ADN et de séquençage peuvent apporter des biais. Cependant, les variations attendues sont supposées suffisamment faibles

pour que cette méthode de calcul permettent une meilleure estimation de la biomasse présente qu'avec l'utilisation de la quantification absolue des gènes ADNr 16S seule.

#### 4.3. Bilan matière

Les quantités de CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> et C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> ont été obtenues par le calcul après analyse de la composition des gaz par CPG. Ces quantités ont été calculées en suivant la loi des gaz parfait comme présenté dans l'Équation 13.

*Équation 13 : Calcul de la quantité de matière des gaz mesuré selon la loi des gaz parfaits.*

$$P_i = \%i \times P$$
$$n_i = \frac{P_i V}{RT}$$

Avec  $P_i$  la pression partielle du gaz  $i$ ,  $\%i$  la part d'un gaz  $i$  dans un mélange de gaz et  $P$  la pression totale en kPA,  $n_i$  la quantité en moles d'un des gaz,  $V$  le volume total occupé par l'ensemble des gaz,  $T$  la température en Kelvin (K) et la constante des gaz parfait  $R$  d'une valeur de 8,314 J/K.mol. Les parts de chacun des gaz en phase gazeuse et aqueuse, tout comme la part gazeuse des éléments volatils, ont été calculés en suivant la loi de Henry. Les coefficients utilisés ont été récupérés dans la base de donnée de l'institut de chimie allemand Max Planck (Sander, 2023). Ces concentrations liquides et/ou gazeuse ont été calculées en suivant l'Équation 14.

*Équation 14 : Calcul de la cocentration d'un gaz en phase aqueuse à partir de sa concentration en phase gazeuse à l'équilibre selon la loi de Henry.*

$$[S]_{aq} = H_s^{cp} \times P_s$$

Avec  $[S]_{aq}$  la concentration en solution d'une espèce  $S$  en mol/m<sup>3</sup>,  $H_s^{cp}$  le coefficient de Henry dont la valeur dépend de l'espèce  $S$  en question et exprimé en mol/m<sup>3</sup>/Pa. Et  $P_s$  la pression partielle de l'espèce  $S$  en Pa. Les coefficients de Henry utilisés dans ces travaux sont indiqués dans le Tableau 2-1.

Tableau 2-1 : Coefficients de Henry des espèces chimiques présentées au cours de ces travaux.

<b>ESPÈCE</b>	<b><math>H_s^{cp}</math> (mol/m<sup>3</sup>/Pa)</b>
<b>CO<sub>2</sub></b>	<b><math>3,3 \times 10^{-4}</math></b>
<b>H<sub>2</sub></b>	<b><math>7,7 \times 10^{-6}</math></b>
<b>N<sub>2</sub></b>	<b><math>6,4 \times 10^{-6}</math></b>
<b>O<sub>2</sub></b>	<b><math>1,3 \times 10^{-5}</math></b>
<b>CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup> (ACÉTATE)</b>	<b>60,2</b>
<b>C<sub>2</sub>H<sub>4</sub></b>	<b><math>4,5 \times 10^{-5}</math></b>



## Chapitre 3 - Bioanode à *Geobacter sulfurreducens* avec N<sub>2</sub> comme source de N

Ces travaux visaient à étudier la capacité de fixation de N<sub>2</sub> de *Geobacter sulfurreducens*, une bactérie diazotrophe exoélectrogène, dans une cellule d'électrolyse microbienne (MEC) et d'évaluer l'impact de cette fixation sur les rendements d'oxydation de l'acétate à l'anode et de production d'H<sub>2</sub> à la cathode. Quatre réacteurs à deux compartiments ont été utilisés avec des anodes en plaques de graphite. Ces réacteurs ont été suivis pendant cinq batchs successifs de sept à huit jours avec de l'acétate comme donneur d'électrons.

Après un premier batch en présence d'une source d'azote assimilable (NH<sub>4</sub>Cl), deux des réacteurs ont été placés en condition de fixation de N<sub>2</sub> et deux ont conservé l'apport de NH<sub>4</sub>Cl pour servir de réacteurs témoins. Les produits de la fixation de N<sub>2</sub>, la production de biomasse et les densités de courant des quatre réacteurs ont été suivies pour comparer les réacteurs avec fixation de N<sub>2</sub> et les témoins.

### 1. SUIVI DE LA DENSITE DE COURANT ET RENDEMENTS DE REACTION

Les densités de courant ont été suivies tout au long des différents batchs de culture de *G. sulfurreducens* (Figure 3-1). 20mM d'acétate était présent au dans les milieux au début de chaque batch et 10mM ont été ajoutés à chaque réacteur après trois à quatre jours (Procédure de culture des bioanodes à *G. sulfurreducens*). Lors du premier batch, les quatre réacteurs ont été opérés comme des réplicats, c'est-à-dire qu'ils ont tous reçu un apport en NH<sub>4</sub>Cl (pas de fixation de N<sub>2</sub>). Les densités de courant maximales mesurées étaient comprises entre 12,3 A/m<sup>2</sup> et 16,1 A/m<sup>2</sup>. À partir du deuxième batch, deux réacteurs ont été privés de NH<sub>4</sub>Cl (réacteurs de fixation de N<sub>2</sub>) et les deux autres réacteurs ont été opérés de la même façon que lors du premier batch (réacteurs témoins). Malgré cette différence, les profils de densités de courant mesurés au cours du second batch étaient similaires pour tous les réacteurs. Une densité de courant maximale de 20,5 A/m<sup>2</sup> a été observée pour l'un des réacteurs en présence de NH<sub>4</sub>Cl après une demi-journée de culture, mais les densités de courant maximales des trois autres réacteurs étaient très proches (16,1±0,4 A/m<sup>2</sup>). Au cours du troisième batch, des coupures de courant ont fait perdre la connexion entre les électrodes et le potentiostat. Cependant, les densités de courant ont atteint des valeurs maximales similaires de 17,7±1,3 A/m<sup>2</sup> à l'exception du premier réacteur en condition de fixation de N<sub>2</sub> (N<sub>2</sub> fix 1) dont la densité de courant maximale était seulement de 12,9 A/m<sup>2</sup>. Pour le quatrième batch, un réacteur témoin et un réacteur de fixation de N<sub>2</sub> se sont distingués avec des densités de courant

maximales de 11,9 et 15,2 A/m<sup>2</sup> respectivement. Les deux autres réacteurs présentaient une densité de courant maximale similaire de 9,0±0,3 A/m<sup>2</sup>. Enfin, au cours du dernier batch (batch 5), un des réacteurs témoins a vu sa densité de courant grandement diminuée par rapport aux autres réacteurs avec un maximum de 5,4 A/m<sup>2</sup> contre 8,2±0,1 A/m<sup>2</sup> pour N<sub>2</sub> fix 1 et témoin 1. Le maximum pour ce batch a été obtenu pour N<sub>2</sub> fix 2 avec 11,2 A/m<sup>2</sup>. Ces batchs successifs et les densités de courant mesurées nous ont appris qu'il n'y avait pas de différence significative (*t*-test, P = 0,4) sur la vitesse d'oxydation de l'acétate entre les deux conditions (N<sub>2</sub> comme seule source de N ou témoin).

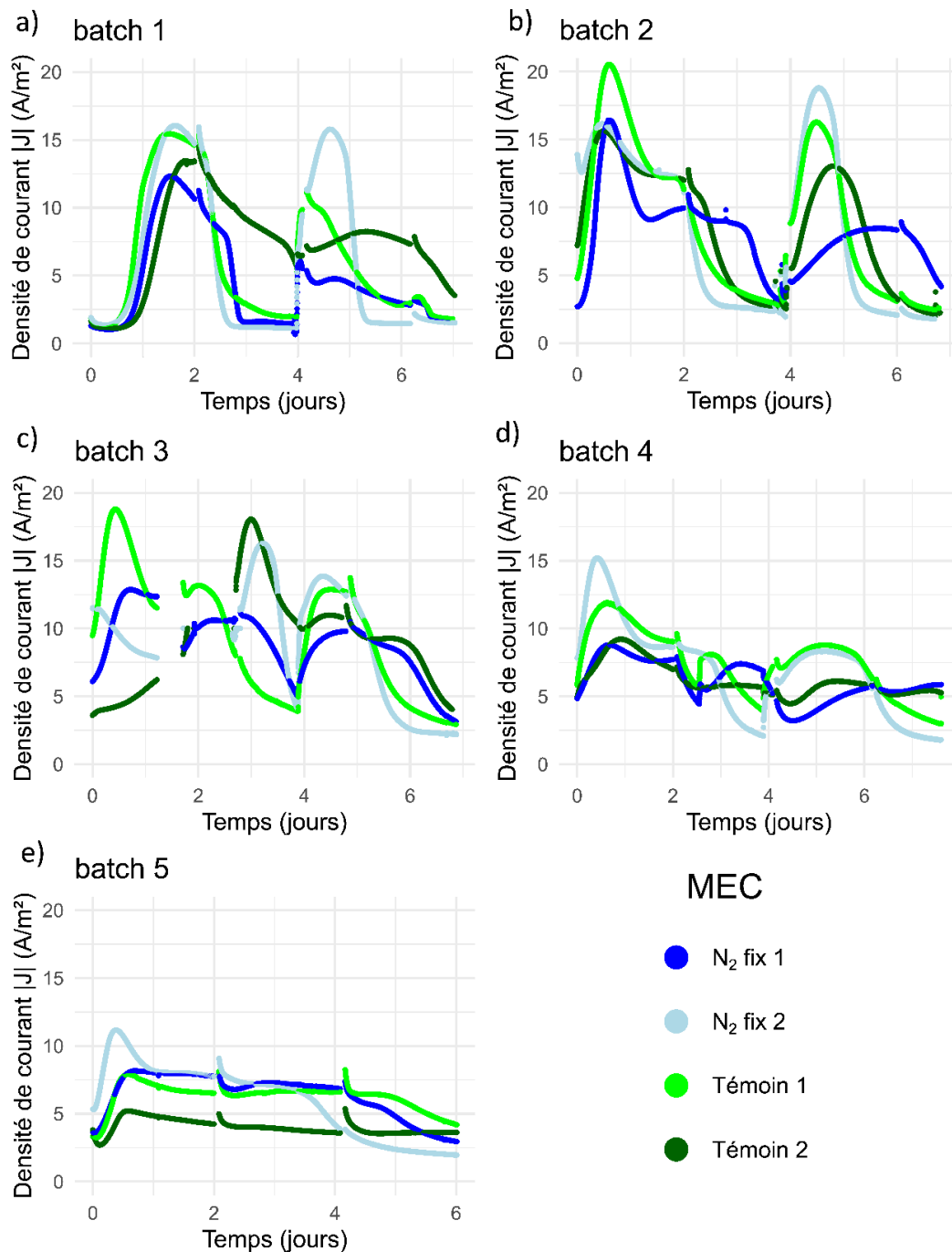


Figure 3-1 : Densités de courant relevées pour tous les réacteurs inoculés avec *G. sulfurreducens* pour chaque batch. Les lignes bleues correspondent aux réacteurs où la fixation de N<sub>2</sub> a lieu et les lignes vertes correspondent aux réacteurs témoins (sans fixation de N<sub>2</sub>). Les surfaces utilisées pour le calcul de la densité sont les surfaces d'une seule face d'électrode (25cm<sup>2</sup>). 20mM d'acétate étaient présents dans les milieux au début de chaque batch et un ajout a été fait (sauf batch 5) après 3 à 4 jours avec une quantité d'acétate correspondant à 10mM dans nos réacteurs.

Pour ce qui est de la production d'H<sub>2</sub> et de l'oxydation de l'acétate à l'anode, les rendements faradiques anodiques  $CE_{AN}$ , de récupération à la cathode (rendement faradiques cathodique pour la production d'H<sub>2</sub>,  $CE_{H_2}$ ) et globaux  $CE_{Cell}$  ont été calculés. Les rendements obtenus sont tous présentés dans le Tableau 3-1. Les rendements faradiques calculés variaient d'un

batch à l'autre avec un minimum pour le premier batch de  $67,3 \pm 10,5$  % pour la période allant de l'inoculation des MEC au premier rajout d'acétate après quatre jours. Ce rendement a ensuite augmenté au cours du second batch (bilan sur une période de 6 jours) jusqu'à  $116,4 \pm 12,4$  % pour les témoins et  $106,8 \pm 6,9$ % pour les réacteurs à fixation de  $N_2$ . On suppose que ces rendements de plus de 100% sont causés en partie par une migration d' $H_2$  à l'anode après sa formation sur les cathodes. Ces rendements sont les plus élevés mesurés et correspondent à une oxydation complète de l'acétate en trois à quatre jours. Au cours du troisième batch où la mesure du rendement a été faite sur la période après rajout d'acétate (après quatre jours à cause des coupures de courant, voir Figure 4-2), les rendements étaient de  $89,3 \pm 4,9$  % et  $93,5 \pm 0,1$ % pour les réacteurs avec fixation de  $N_2$  et les réacteurs témoins respectivement. Dans le quatrième batch, deux calculs ont été fait pour le rendement, le premier sur la période allant du début du batch au rajout d'acétate (jour 4) et le deuxième entre ce rajout d'acétate et la fin du batch. Ces deux calculs ont été utilisés pour vérifier si les rendements faradiques étaient différents entre la première et la deuxième injection pour un même batch. Sur la première partie du batch, les rendements calculés étaient de  $92,5 \pm 24,1$  % et  $79,8 \pm 4,6$  % et après le rajout d'acétate,  $102,9 \pm 0,7$  % et  $107,1 \pm 1,6$  % respectivement pour les réacteurs de fixation de  $N_2$  et les témoins. Sur la totalité du batch, on a donc des rendements de  $96,1 \pm 15,4$ % pour la fixation de  $N_2$  et  $90,1 \pm 3,4$ % pour les témoins. Ces résultats plus importants sur la deuxième partie du batch peuvent s'expliquer par la migration d' $H_2$  comme déjà présenté pour le batch 2. Ici, la différence entre la première partie du batch et la seconde pourrait s'expliquer par l'accumulation d' $H_2$  dans la chambre cathodique qui a migré au cours du batch. Cette accumulation a pu permettre une augmentation des rendements calculés après rajout de l'acétate. Enfin, le cinquième et dernier batch, pour lequel l'acétate a été ajouté au début du batch sans rajout après 3-4 jours, les rendements obtenus sont de  $109,9 \pm 14,2$  % et  $101,2 \pm 11,4$ %. Les rendements faradiques entre les deux conditions présentent donc des résultats très proches avec une moyenne de  $92,2 \pm 20,3$  % lorsque les réacteurs étaient en condition de fixation de  $N_2$  et  $95,4 \pm 15,0$ % pour les témoins sur l'ensemble des batchs. On peut dès lors dire que l'absence de  $NH_4Cl$  n'a pas eu d'impact sur les rendements faradiques et que les électrons utilisés qui auraient pu être utilisés pour la fixation de  $N_2$  correspondraient à des quantités trop faibles pour avoir un impact sur les rendements faradiques.

Tableau 3-1 : Rendements mesurés au cours de la culture de *G. sulfurreducens* sur anode. Sont présentés le rendement faradique ( $CE_{An}$ ), le rendement de récupération à la cathode ( $CE_{H_2}$ ) et le rendement global des systèmes utilisés ( $CE_{Cell}$ )

	$CE_{An}$				$CE_{H_2}$				$CE_{Cell}$			
	N <sub>2</sub> fix		Témoins		N <sub>2</sub> fix		Témoins		N <sub>2</sub> fix		Témoins	
	Moyenne	SD	Moyenne	SD	Moyenne	SD	Moyenne	SD	Moyenne	SD	Moyenne	SD
batch 1	59%	6%	76%	5%	61%	10%	65%	4%	36%	9%	49%	6%
batch 2	107%	7%	116%	12%	44%	10%	47%	4%	47%	14%	54%	1%
batch 3	89%	5%	94%	0%	49%	33%	66%	28%	43%	27%	62%	26%
batch 4	96%	15%	90%	3%	57%	11%	64%	2%	56%	20%	58%	4%
batch 5	110%	14%	101%	11%	54%	11%	53%	4%	59%	4%	54%	10%

Concernant les autres rendements, le rendement de récupération à la cathode  $CE_{H_2}$  et le rendement global de réaction  $CE_{Cell}$ , qui représentent respectivement la part des électrons utilisée pour la production d'H<sub>2</sub> à la cathode et le rendement de conversion des électrons issus de l'oxydation de l'acétate à l'anode en H<sub>2</sub> à la cathode, les résultats sont présentés dans le Tableau 3-1. Les rendements de récupération à la cathode sont restés très proches avec des moyennes de  $53,2 \pm 6,7\%$  lors de la fixation de N<sub>2</sub> et  $59,2 \pm 8,7 \%$  pour les témoins. Il n'y a donc pas de différence significative (*t*-test,  $P > 0,05$ ) sur l'utilisation des électrons à la cathode comme cela pouvait être attendu en absence de différences entre les chambres cathodiques. Cependant, ce niveau de 50 à 60% des rendements de récupération d'H<sub>2</sub> suggère une perte du H<sub>2</sub> produit aux cathodes, or, on a supposé que du H<sub>2</sub> a migré dans les compartiments anodiques et a pu être oxydé par *G. sulfurreducens*, ce qui a fait augmenter les rendements faradiques et diminuer les rendements de récupération à la cathode. Concernant les rendements globaux de réaction, là aussi les résultats restaient très proches avec des rendements moyens de  $48,3 \pm 9,2 \%$  en conditions de fixation de N<sub>2</sub> et  $55,5 \pm 4,6 \%$  pour les témoins. Ce niveau de 50% environ suggère une perte du H<sub>2</sub> produit sur la cathode possiblement oxydé aux anodes. Ce qui diminue la quantité d'H<sub>2</sub> retrouvée et donc les rendements de récupération d'H<sub>2</sub> à la cathode et le rendement global de la réaction.

## 2. CROISSANCE DE GEOBACTER SULFURREDUCENS

La concentration en bactéries dans les biofilms a été déterminée par qPCR des copies du gène d'ADNr 16S et la mesure des masses sèches de chaque biofilm. Comme présenté dans la Figure 3-2, on retrouve les concentrations en bactéries mesurées dans le milieu à la fin du premier batch avec une moyenne de  $1,2 \pm 0,5 \times 10^9$  copies ADN<sub>r</sub>16S/mL pour les quatre réacteurs dans

les mêmes conditions. Après l'arrêt de l'apport en  $\text{NH}_4\text{Cl}$  sur une partie des réacteurs pour évaluer la fixation de  $\text{N}_2$ , la concentration a chuté de presque de moitié en passant à  $6,7 \pm 6,2 \times 10^8$  copies ADNr 16S/mL. Si on sépare les réacteurs avec fixation de  $\text{N}_2$  des réacteurs témoins à la fin de ce deuxième batch, on obtient une moyenne de  $3,6 \pm 0,5 \times 10^8$  copies ADNr 16S/mL dans les témoins contre  $9,7 \pm 8,8 \times 10^8$  copies ADNr 16S/mL pour les réacteurs avec fixation de  $\text{N}_2$ . Cette concentration plus élevée s'explique par les résultats d'un des réacteurs qui a vu sa concentration en *G. sulfurreducens* en suspension se maintenir après le premier batch avec  $1,6 \times 10^9$  copies ADNr 16S/mL contre  $3,5 \times 10^8$  copies ADNr 16S/mL dans le second réacteur. Cependant, il est difficile de conclure sur une différence significative de concentrations entre un type de réacteur et l'autre d'après les concentrations en bactéries des milieux après un seul batch de fixation de  $\text{N}_2$  (*t*-test,  $P = 0,9$  pour  $\text{N}_2$  fix et  $P = 0,25$  pour les témoins).

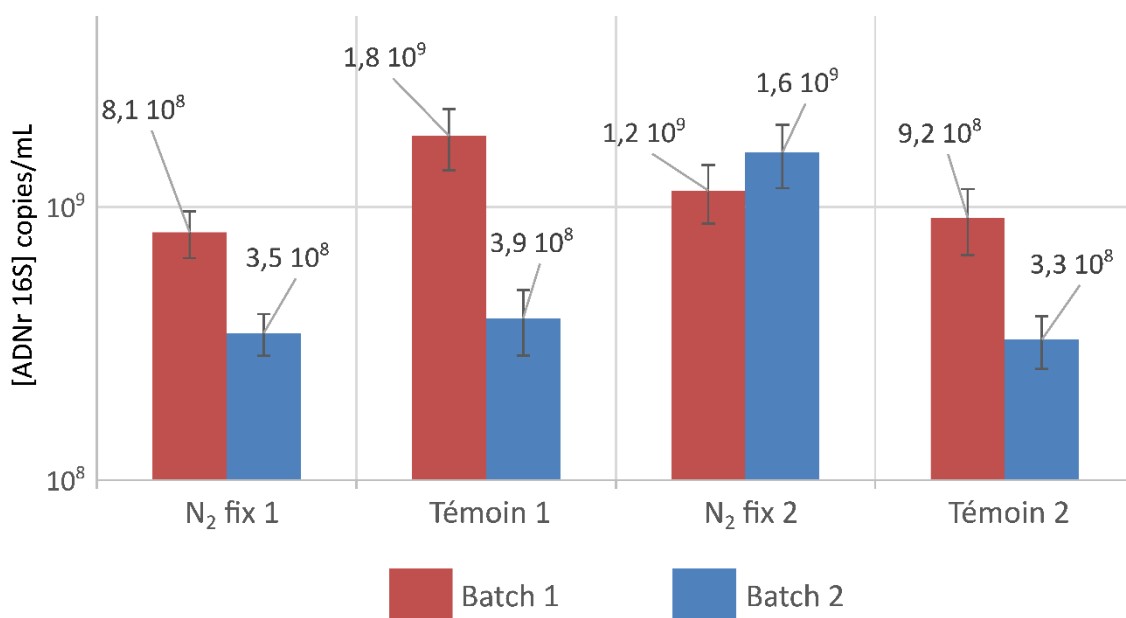


Figure 3-2 : Concentration en copies du gène ADNr 16S des quatre réacteurs à la fin du premier batch (sans fixation de  $\text{N}_2$ ) et du deuxième (premier batch de fixation de  $\text{N}_2$ )

En fin de culture, après le cinquième batch, les bactéries présentes sur les anodes ont également été quantifiées. On a alors pu mesurer des concentrations moyennes de  $2,4 \pm 0,2 \times 10^9$  et  $3,6 \pm 0,5 \times 10^9$  copies d'ADNr 16S/mL respectivement sur les anodes dans les réacteurs avec  $\text{N}_2$  comme source de N et dans les témoins. Une quantité de bactérie plus importante a été obtenue sur les anodes des témoins mais le manque de répétition ne permet pas de conclure sur la significativité des résultats (*t*-test,  $P = 0,13$ ). Ce résultat était cohérent avec ce qui était attendu, à savoir une biomasse moins importante lors de la fixation de  $\text{N}_2$  du

fait du détournement d'une partie des électrons issus de l'oxydation de l'acétate dans la réduction du N<sub>2</sub>.

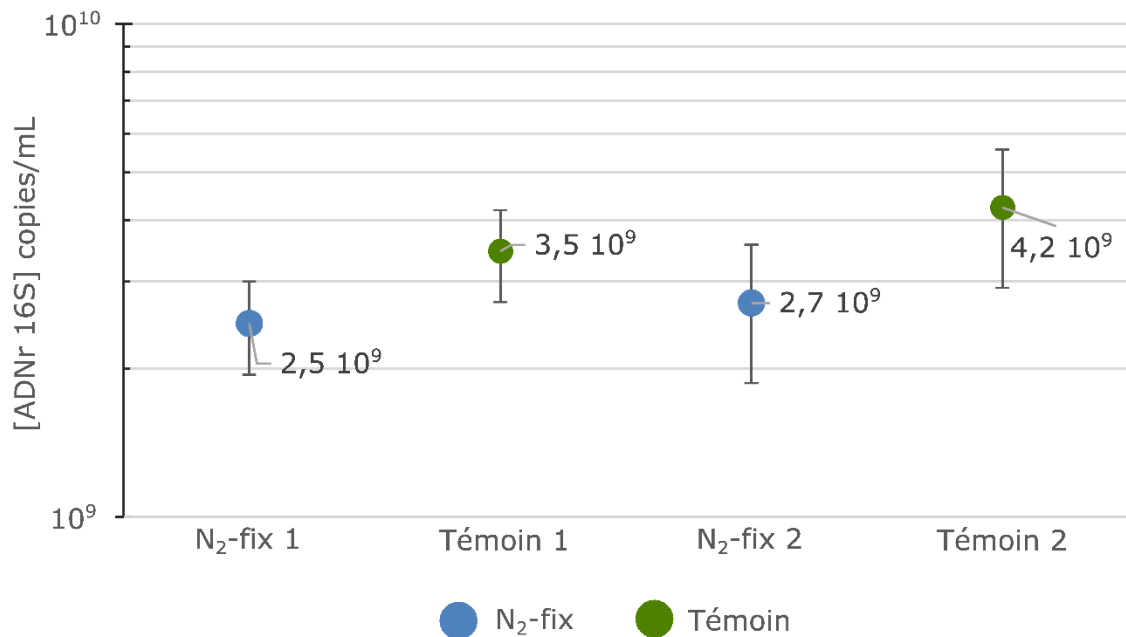


Figure 3-3 : Concentration en biomasse (axe de droite) et en copies du gène ADNr 16S (axe de gauche) des anodes colonisées. Les résultats sont rapportés au volume de la chambre anodique.

En prenant une masse de  $2,25 \times 10^{-13}$  g/bactérie pour *G. sulfurreducens* (Moscoviz et al., 2017) et avec 2 copies de gène ADNr 16S par génome de *G. sulfurreducens*, une masse moyenne de  $326,4 \pm 80,9$  mg/L ( $262,8 \pm 17,5$  mg/L et  $390,0 \pm 56,0$  mg/L pour la fixation de N<sub>2</sub> et témoins respectivement) est mesurée sur les anodes.

### 3. FIXATION DE N<sub>2</sub> SUR UNE BIOANODE

Comme préalablement démontré sur les rendements des MEC avec une anode colonisée par *G. sulfurreducens*, l'utilisation de N<sub>2</sub> comme seule source d'azote disponible n'a pas eu d'impact significatif sur l'oxydation d'acétate, sur la production d'H<sub>2</sub> à la cathode et sur le transport d'électrons dans le circuit électrique. Cependant, la fixation de N<sub>2</sub> reste une réaction vraiment demandeuse en énergie (rappel : 16 moles d'ATP et 8 moles e<sup>-</sup> pour la réduction d'une mole de N<sub>2</sub>) et l'absence de N utilisable autre que N<sub>2</sub> suggérait que la fixation ait bien eu lieu. On peut donc supposer que la fixation de N<sub>2</sub> n'a représenté qu'une infime partie des électrons issus de l'oxydation de l'acétate.

Pour confirmer la fixation de N<sub>2</sub> en absence de méthode directe de détection du phénomène de fixation (méthode ARA, <sup>15</sup>N), seule la croissance en absence d'autre source de N a été

utilisée sur toute la durée de la culture. Cette observation a ensuite été accompagnée de la mesure des ions ammonium dans les milieux de culture. Cette mesure à partir du troisième batch nous a montré une concentration initiale moyenne de  $9,8 \pm 0,6$  mg/L  $\text{NH}_4^+$  dans le milieu contre  $25,3 \pm 4,5$  mg/L  $\text{NH}_4^+$  à la fin du troisième batch. De même pour le quatrième batch avec des concentrations finales allant jusqu'à  $20,6 \pm 2,5$  mg/L et  $22,0 \pm 0,5$  mg/L  $\text{NH}_4^+$  à la fin du batch 5 pour une concentration initiale de  $17,9 \pm 3,0$  mg/L en moyenne pour ces deux batches. Ces faibles augmentations de concentration, surtout pour les batches 4 et 5, ne sont pas suffisantes pour considérer une production de  $\text{NH}_4^+$  issue directement de la fixation de  $\text{N}_2$ . Nous avons calculé une concentration initiale de 12,4 mg/L de biomasse d'après les mesures de densité optique à 600nm des cultures utilisées pour l'inoculation des compartiments anodiques et d'un facteur de conversion de  $0,62 \text{ g}_{\text{MS}}/\text{L}/\text{DO}_{600\text{nm}}$  (Engel et al., 2020) pour *G. sulfurreducens*. D'après la masse d'une bactérie *G. sulfurreducens* ( $2,25 \times 10^{-13}$ g/bactérie, (Moscoviz et al., 2017)), nous avons calculé une concentration initiale de  $5,5 \times 10^7$  bactéries/ml et une concentration en azote dans la biomasse initiale de 1,4 mg<sub>N</sub>/L d'après une formule de biomasse de  $\text{CH}_{1,8}\text{O}_{0,5}\text{N}_{0,2}$ .

En calculant la masse de N d'après la quantification en bactérie, on obtient une concentration moyenne de  $32,0 \pm 2,1$  mg<sub>N</sub>/L ( $0,9 \pm 0,02$  mg<sub>N</sub>/L/j par rapport au 1,4 mg<sub>N</sub>/L calculé dans la biomasse des inocula) sur la cathode en fin de culture. Cette vitesse reste à nuancer, les méthodes de calcul de la masse de N et de la masse initiale en bactérie pouvant apporter des biais dans les observations. De plus, le premier batch de sept jours a été fait en présence de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  comme source de N pour tous les réacteurs qui peut représenter une certaine partie de l'azote accumulé au total. En calculant la masse de N incorporée dans la biomasse formée entre la fin du batch 1 (en suspension, sans fixation de  $\text{N}_2$ ) et la fin du cinquième batch (biofilm), on obtient une fixation de  $20,5 \pm 8,5$  mg<sub>N</sub>/L et  $19,3 \pm 13,9$  mg<sub>N</sub>/L de N dans la biomasse pour chaque réacteur avec fixation de  $\text{N}_2$  en 28 jours ( $0,7 \pm 0,4$  mg<sub>N</sub>/L/j). Le manque de quantification des bactéries établies sur la cathode en fin de premier batch, évitée pour ne pas impacter les biofilms en formation, empêche de conclure sur un lien entre ces vitesses et la fixation de  $\text{N}_2$ . On peut néanmoins confirmer qu'il y a eu des productions de courant et d' $\text{H}_2$  similaires entre témoins et réacteurs avec l'absence d'autre source d'azote que le  $\text{N}_2$ .

#### 4. DISCUSSION - CONCLUSION

Ces résultats ont montré que lors de la culture de *G. sulfurreducens* avec  $\text{N}_2$  comme seule source de N, les intensités de courant restaient inchangées, de même que les rendements faradiques. Ces observations sont cohérentes avec les observations de Jing et al. (2022) sur un biofilm anodique de *G. sulfurreducens* (Jing et al., 2022). Jing et al. (2022) ont quantifié la



biomasse et obtenu des résultats similaires aux nôtres avec une production de biomasse plus faible dans le cas de la fixation de N<sub>2</sub> (56,2 ± 1,2 mg/L pour la fixation de N<sub>2</sub> et 68,2 ± 1,2 mg/L pour les témoins). Il semble donc que la part d'électrons utilisée pour la formation de biomasse ait été différente en fonction de l'apport en azote assimilable ou non. Les biomasses mesurées étant plus faibles lors de la fixation supposée de N<sub>2</sub>, mais les intensités de courant similaires aux témoins, les bactéries fixant N<sub>2</sub> pourraient présenter une activité catalytique plus grande que celles qui ne fixent pas N<sub>2</sub>. Cette hypothèse a été confirmée par les expériences de Jing et al. en 2022 avec la mesure de la quantité de protéines sur les anodes (Jing et al., 2022). Ces auteurs ont pu démontrer une plus grande production de courant par bactérie lors de la fixation de N<sub>2</sub> avec 26,3 ± 1,4 μA/mg<sub>protéines</sub><sup>-1</sup> contre 21,0 ± 1,0 μA/mg<sub>protéines</sub><sup>-1</sup> en condition témoin sans fixation. De même, ils ont pu montrer que *G. sulfurreducens* avait métabolisé l'acétate plus rapidement lors de la fixation de N<sub>2</sub>. Ces résultats sont cohérents avec nos observations d'une biomasse moins importante lors de l'utilisation de N<sub>2</sub> comme seule source de N mais avec une consommation de l'acétate aussi rapide et une densité de courant similaire dans les deux conditions.

## Chapitre 4 - Fixation de N<sub>2</sub> dans une biocathode

Après avoir observé la fixation de N<sub>2</sub> en bioanode avec *G. sulfurreducens*, nous avons voulu étudier une cathode colonisée pour la fixation de N<sub>2</sub> comme il était prévu dans le projet CATHOMIX. Les anodes avaient pour avantages d'apporter une source d'énergie et de carbone facilement utilisable par les bactéries (CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>) ce qui est moins le cas pour les cathodes qui ne permettent l'apport d'énergie qu'aux bactéries électrotrophes et possiblement hydrogénotrophes par la formation d'H<sub>2</sub>. Nous avons donc choisi de réaliser un enrichissement utilisant ces cathodes pour sélectionner des bactéries pouvant fixer N<sub>2</sub> avec la cathode comme seule source d'énergie.

Dans le but de sélectionner un biofilm capable de fixer N<sub>2</sub> sur une cathode et d'étudier les phénomènes qui permettent cette fixation dans ce système, nous avons fait le choix de développer une procédure d'enrichissement. Il s'agit d'un enrichissement en bactéries autotrophes diazotrophes utilisant une cathode comme seule source d'électrons. Des enrichissements en bactéries hydrogénotrophes diazotrophes sont accessibles dans la littérature mais il n'y avait que peu de travaux sur des enrichissements en bactéries autotrophes diazotrophes sur cathode. Cet enrichissement a été réalisé à partir d'échantillons de sol comme inocula. Ces échantillons ont été choisis pour leur abondance probable en diazotrophes (rhizosphère d'une légumineuse, sol de forêt et terreau). Ils ont été utilisés pour inoculer des bouteilles de culture en milieu minérale ou riche (6 bouteilles par milieu). La présence ou non de carbone organique et de source d'azote est rappelée dans les Tableau 4-1 et Tableau 4-2. Les enrichissements en bouteilles de milieu minéral (H<sub>2</sub>E) ont été poursuivis durant 475 jours tandis que les bouteilles de milieu riche ont servi d'inoculum à quatre réacteurs électrochimiques après 55 jours. Ces réacteurs ont été inoculés à la cathode avec un apport de carbone organique pour faciliter la croissance de biomasse diazotrophe. Après 60 jours, l'apport en carbone organique a été interrompu et le même milieu que les bouteilles de milieu minéral a été utilisé dans les réacteurs électrochimiques. Deux de ces réacteurs ont été polarisés pour suivre la fixation de N<sub>2</sub> avec une cathode (-0,94V vs SCE) comme seule source d'énergie (PCE) tandis que les deux autres ont été gardés à un potentiel de circuit ouvert (OCV, nommé nPCE). Ces différentes procédures d'enrichissements sont résumées Figure 2-8. Dans ces travaux, nous avons voulu caractériser la capacité d'utiliser une cathode par nos bactéries enrichies en comparant les concentrations bactériennes et la capacité de fixation de N<sub>2</sub> des enrichissements PCE et celles des enrichissements nPCE. La comparaison entre H<sub>2</sub>E et PCE a été faite pour comparer les deux méthodes d'enrichissements où l'on retrouve le H<sub>2</sub> comme source d'énergie dans un cas et du carbone organique puis une cathode dans le second.

Tableau 4-1 : Résumé des étapes de l'enrichissement sur cathode

**Enrichissement sur cathode (PCE à -0,94V vs SCE et nPCE en OCV)**

Phase	Période (jours)	Composition gaz espace de tête initial	Présence carbone organique	Présence NH <sub>4</sub> Cl	Contenant
<i>Pré-enrichissement</i>	-20 à 0	Ar/air	Oui	Non	Bouteille
<i>Enrichissement diazotrophe hétérotrophe</i>	0 à 55	Ar/Air	Oui	Non	Bouteille
<i>Enrichissement diazotrophe hétérotrophe cathodophile</i>	55 à 115	Ar/Air	Oui	Non	Réacteur
<i>Enrichissement diazotrophe autotrophe</i>	115 à 398	CO <sub>2</sub> /Air	Non	Non	Réacteur
<i>Caractérisation communauté diazotrophe autotrophe</i>	398 à 480	CO <sub>2</sub> /Air	Non	Non	Réacteur

Tableau 4-2 : Résumé des étapes des enrichissements en bouteille avec apport d'H<sub>2</sub>.

**Enrichissement avec apport d'H<sub>2</sub> en bouteille**

Phase	Période (jours)	Composition gaz espace de tête initial	Présence carbone organique	Présence NH <sub>4</sub> Cl	Contenant
<i>Pré-enrichissement</i>	-20 à 0	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> /N <sub>2</sub> /O <sub>2</sub>	Non	Oui	Bouteille
<i>Enrichissement autotrophe sans fixation de N<sub>2</sub></i>	0 à 30	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> /N <sub>2</sub> /O <sub>2</sub>	Non	Oui	Bouteille
<i>Enrichissement autotrophe diazotrophe</i>	30 à 475	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> /N <sub>2</sub> /O <sub>2</sub>	Non	Non	Bouteille

Après enrichissement, les communautés issues des milieux des réacteurs à cathode polarisée (PCE) ont servi d'inoculum pour deux nouveaux réacteurs à cathode polarisée (PCE B) et les cathodes ont été utilisées dans des réacteurs appelés PCE E. Ces nouveaux réacteurs ont été utilisés sur 75 jours pour suivre l'évolution d'un biofilm avec des mesures de la fixation de  $N_2$  par la méthode ARA qui n'avait pas pu être utilisée en début d'enrichissement. Ces cultures ont été utilisées pour voir la capacité à permettre le dépôt d'un nouveau biofilm à partir des cultures de bactéries planctoniques des enrichissements après 398 jours et étudier les communautés pour voir si des différences existaient entre les biofilms en formation et un biofilm établi depuis 400 jours.

## 1. ENRICHISSEMENT D'UNE COMMUNAUTE MICROBIENNE FIXANT $N_2$ EN AUTOTROPHIE ET HYPOTHESES SUR LES INTERACTIONS

La méthode ARA a été utilisée après 18 batchs d'enrichissement  $H_2E$  en bouteille et 11 batchs d'enrichissements cathodiques (PCE et nPCE). Les résultats présentés étaient issus des premières quantifications possibles d'éthylène, soit un jour en MEC (PCE) et huit jours pour en obtenir dans toutes les bouteilles ( $H_2E$ ). Les vitesses ont alors été calculées par rapport au prélèvement précédent (4 à 24h pour PCE et cinq jours pour  $H_2E$ ). Des réplicats techniques sont présentés pour les PCE pour valider la répétabilité des injections sur la CPG et les triplicats des enrichissements  $H_2E$  en bouteille sont dus aux trois bouteilles d'enrichissements construites de manière semblable. Cette méthode a été utilisée pour la validation de la fixation de  $N_2$  une fois développée.

### *1.1. Validation de la fixation de $N_2$ par la méthode ARA après 340 jours d'enrichissement*

La méthode de réduction de l'acétylène (ARA) a été utilisée dans nos expériences après 340 jours d'enrichissement pour quantifier la fixation de  $N_2$  et valider la fixation de  $N_2$ . Lors de ce test, une production d'éthylène a été mesurée dans les enrichissements en bouteilles alimentées en  $H_2$  (notées  $H_2E$ ) et à la cathode d'électrolyseurs microbiens polarisés (notées PCE, Polarized Cathodic Enrichment), comme le montre la Figure 4-1. Cette production d'éthylène confirme la capacité de fixation de  $N_2$  des communautés enrichies (Bergersen, 1970). Aucun éthylène n'a été détecté dans les cellules d'électrolyse microbienne à un potentiel de courant ouvert (notées nPCE) utilisées comme témoin sans source d'énergie. Ce résultat indique que la cathode et/ou  $H_2$  ont bien été utilisés comme sources d'énergie

permettant la fixation de  $N_2$  dans les MEC polarisées (PCE) et dans les bouteilles avec  $H_2$  ( $H_2E$ ). Les vitesses présentées dans la Figure 4-1 correspondent à des moyennes de  $32,3 \pm 17 \mu\text{mol}_{C_2H_4}/L/j$  dans les MEC contre  $35,9 \pm 13 \mu\text{mol}_{C_2H_4}/L/j$  pour les enrichissements avec  $H_2$ . Les vitesses mesurées étaient très proches entre les deux systèmes. Ces vitesses correspondaient à des vitesses de fixation de  $N_2$  de  $0,12 \text{ mg}_{N_{\text{fixé}}}/L/j$  (minimum) à  $0,51 \text{ mg}_{N_{\text{fixé}}}/L/j$  (maximum), ce qui est proche du résultat de  $0,2 \text{ mg}_{N_{\text{fixé}}}/L/j$  estimé par Rago *et al.* (Rago *et al.*, 2019). Ces vitesses sont également cohérentes avec les vitesses de fixation de  $N_2$  de bactéries du sol (Hardy *et al.*, 1973; Kifle & Laing, 2016). Malgré ces vitesses de fixation élevées et la longueur des expériences, la concentration en  $NH_4^+$  en solution est restée faible à chaque batch avec notamment des vitesses de libération de  $0,07 \pm 0,01 \text{ mg}_{N-NH_4^+}/L/j$  et  $0,04 \pm 0,03 \text{ mg}_{N-NH_4^+}/L/j$  entre deux changements de milieu (jours 313 à 340) pour PCE et  $H_2E$  (Tableau 4-3), ce qui indique que la majorité du  $N_2$  fixé a probablement été rapidement utilisée par les bactéries.

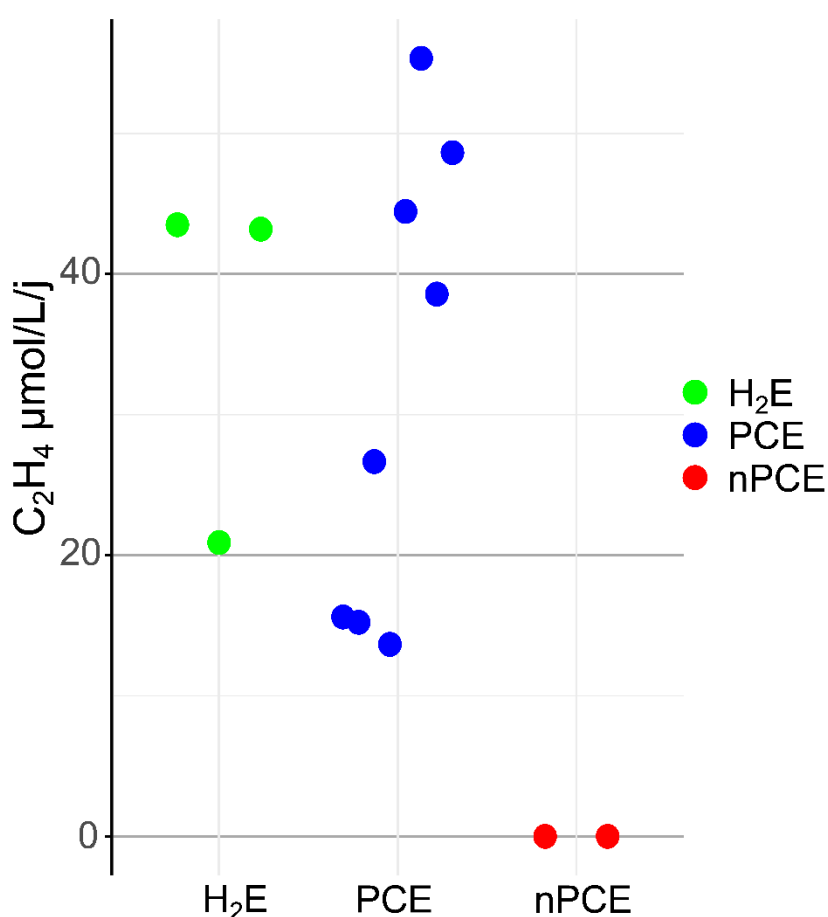


Figure 4-1: Vitesse de réduction de l'acétylène en  $\mu\text{mol } C_2H_4/L/j$  dans les différents réacteurs après 340 jours d'enrichissement. Pour l'enrichissement  $H_2E$ , 3 bouteilles ont été utilisées pour la mesure de la réduction de l'acétylène avec une injection par bouteille présentées ici. Pour les enrichissements PCE, 2 réacteurs avec 4 injections chacun ont été utilisés pour valider la répétabilité des mesures en éthylène  $C_2H_4$ , ce qui donne 8 injections. Pour les enrichissements nPCE, 2 réacteurs ont été utilisés et correspondent aux deux mesures visible sur le graphique. Pour les réacteurs (PCE et nPCE) une mesure correspond à la somme de  $C_2H_4$  mesurée dans l'espace de tête des réacteurs et dans le système de recirculation des gaz.

La capacité des communautés microbiennes à fixer du  $N_2$  a aussi été évaluée par qPCR du gène *nifH* (Dos Santos et al., 2012; Pogoreutz et al., 2017)(Tableau 4-3). La concentration moyenne du gène *nifH* sur les cathodes PCE était de  $7,8 \times 10^7$  copies<sub>*nifH*</sub>/mL, deux ordres de grandeurs plus élevée que la concentration moyenne de  $8,3 \times 10^5$  copies<sub>*nifH*</sub>/mL mesurée pour les bouteilles d'enrichissement  $H_2E$ . Ce résultat était surprenant car les vitesses de fixation mesurées en ARA étaient similaires dans les deux configurations (Figure 4-1). Cela signifie que la vitesse de fixation par copie de *nifH* était bien plus élevée dans les enrichissements  $H_2E$  que dans les PCE. Les activités spécifiques moyennes par copie de *nifH* estimées étaient en effet de  $0,2 \pm 0,3 \mu\text{mol}_{C_2H_4}/10^8 \text{ copies}_{nifH}/j$  dans les MEC de PCE et de  $2,1 \pm 0,7 \mu\text{mol}_{C_2H_4}/10^8 \text{ copies}_{nifH}/j$  dans les bouteilles d'enrichissement  $H_2E$  (Tableau 4-3). Par ailleurs, la comparaison entre le nombre de copies de *nifH* et le nombre de copies de gènes ARNr 16S a permis d'avoir une idée des proportions de bactéries fixatrices d'azote de chaque communauté microbienne. Cette proportion était de 19% en enrichissement  $H_2E$ , proportion quatre fois plus élevée que celle de 3,8 % mesurée pour les PCE. Ces résultats indiquent que les bactéries fixatrices de  $N_2$  constituaient une part plus faible de la population bactérienne en enrichissement PCE qu'en enrichissement  $H_2E$  et qu'une faible proportion de ces bactéries participaient à la fixation de  $N_2$  dans les enrichissements PCE. De façon surprenante, la concentration de biomasse dans les réacteurs d'enrichissement nPCE (non polarisés) était plus importante que la concentration de biomasse dans les bouteilles d'enrichissement  $H_2E$  (Tableau 4-3). Ce résultat est probablement lié à la procédure d'enrichissement durant laquelle des sources de carbone organique ont été utilisés (jour 0 à 115 en incluant 60 jours en système de bioélectrochimie microbien) pour les enrichissements PCE et nPCE et pas pour les enrichissements  $H_2E$ . Du  $NH_4^+$  a aussi été observé dans le milieu des enrichissements nPCE à une vitesse de production de  $0,07 \text{ mg/L/j}$  comme présenté dans le Tableau 4-3 mais sans formation d'éthylène, ce qui signifie l'absence de fixation de  $N_2$ . En absence de source d'électrons, les communautés enrichies ont probablement pu se maintenir par croissance cryptique. La présence de  $NH_4^+$  dans le milieu nPCE a donc été liée à la lyse bactérienne au vu de l'absence d'activité de fixation de  $N_2$  d'après la méthode ARA, et ce malgré la présence de biomasse déjà établie.

Tableau 4-3 : Moyennes des vitesses de production en ammonium et des concentrations en gènes *nifH* et ADNr 16S à 340 jours pour les trois configurations expérimentales. Ces moyennes sont mesurées à 340 jours après un batch de 21 jours pour la vitesse calculée. Les concentrations sont basés sur la biomasse des cathodes (biofilm+milieu). Moyennes mesurées sur les deux réacteurs PCE, les deux réacteurs contrôles nPCE et les six bouteilles H<sub>2</sub>E

	PCE	nPCE	H <sub>2</sub> E
N-NH <sub>4</sub> mg/L/j	0,07±0,01	0,07±0,01	0,04±0,03
Copies du gène <i>nifH</i> copies/mL	7,8±9,5×10 <sup>7</sup>	2,5±2,8×10 <sup>6</sup>	8,3±2,2×10 <sup>5</sup>
Copies du gène ADNr 16S copies/mL	1,7±1,9×10 <sup>9</sup>	1,4±0,2×10 <sup>8</sup>	4,6±1,5×10 <sup>6</sup>

### 1.2. Densité de courant et enrichissement en bactérie autotrophes en enrichissement cathodique

La densité de courant moyenne pour les deux réacteurs PCE au cours de l'enrichissement est présentée dans la Figure 4-2. Le courant mesuré à la cathode étant négatif par convention, une valeur plus négative correspond à une activité de réduction plus élevée. En ce qui concerne les densités de courant dans les systèmes abiotiques, les densités de courant moyennes ont été mesurées à -0,75 A/m<sup>2</sup> pendant deux fois quatre jours avec une source de carbone organique et à -1,1 A/m<sup>2</sup> pendant 16 jours avec seulement du CO<sub>2</sub> comme source de carbone.

La moyenne des densités de courant mesurée dans les réacteurs PCE n'était pas différente de la moyenne des densités de courant mesurée dans les témoins abiotiques (environ -1 A/m<sup>2</sup> avec un apport de C organique) pendant les 45 premiers jours de fonctionnement (jours 55 à 100 de l'enrichissement PCE). Une augmentation jusqu'à -2 A/m<sup>2</sup> est apparue entre 100 et 115 jours d'enrichissement en PCE. Le CO<sub>2</sub> a ensuite été utilisé comme seule source de carbone après l'apparition de cette augmentation. Après ce changement de source de carbone, une forte augmentation de la densité de courant jusqu'à -5 A/m<sup>2</sup> a été observée dans les réacteurs PCE par rapport à la gamme des densités de courant observés dans les témoins abiotiques (environ 0 à -2 A/m<sup>2</sup> sur le CO<sub>2</sub>) (Figure 4-2). Il a alors été supposé que la densité de courant plus élevée était associée à l'absorption d'électrons par les bactéries enrichies. La densité de courant dans le PCE a ensuite augmenté continuellement jusqu'au jour 250 de l'enrichissement pour atteindre une valeur de -12,5 A/m<sup>2</sup> en moyenne.

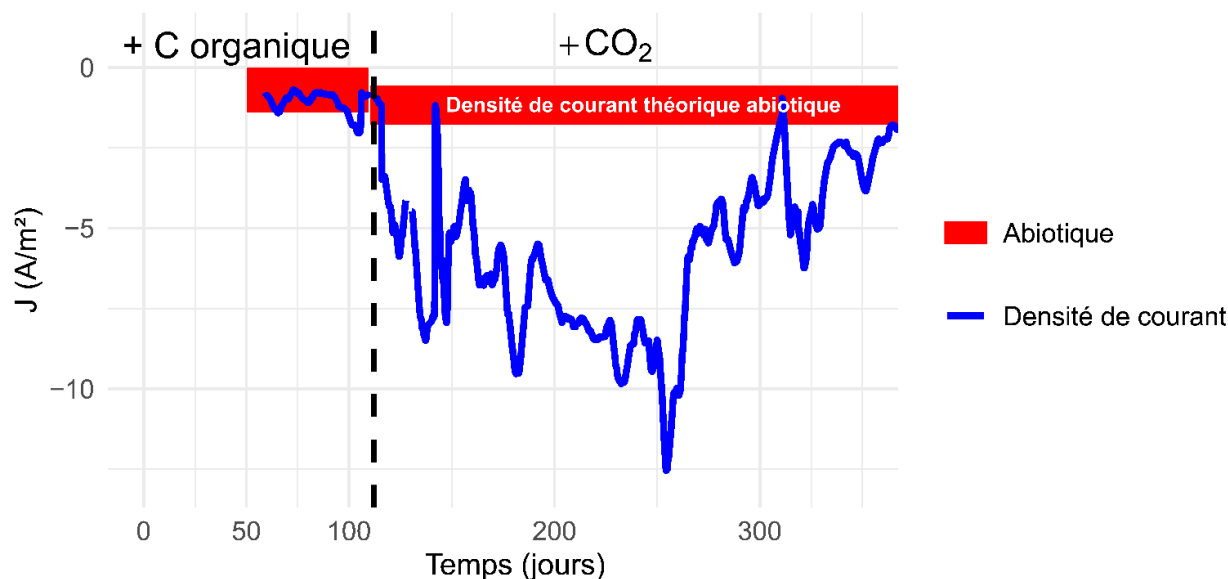


Figure 4-2 : Densité de courant moyenne mesurée pour les deux PCE (ligne bleue). Les niveaux indiqués en rouge correspondent à la densité de courant moyenne théorique et à l'écart-type estimés à partir des densités de courant de deux systèmes électrochimiques abiotiques. Pour le système électrochimique abiotique, un batch de deux jours a été réalisé avec du C organique et un batch de 16 jours avec du CO<sub>2</sub>. Les pics observés sont dus au fonctionnement en batch des PCE avec des perturbations à chaque renouvellement du milieu. Des pannes de courant sont survenues à 230 jours et 260 jours. Le temps indiqué sur l'axe des x correspond au temps expérimental à partir du jour 0 de l'enrichissement où les échantillons de sol ont été introduits pour la première fois dans les bouteilles avec un milieu contenant du C organique. Le jour 55 correspond au démarrage du système électrochimique microbien avec les communautés pré-enrichies. La ligne en pointillé au jour 110 correspond au passage au CO<sub>2</sub> comme seule source de carbone dans les PCE. Un lissage de la courbe sur 5 jours a été appliqué sur la courbe de densité de courant des PCE.

De plus, la densité de courant élevée observée après 250 jours d'enrichissement indiquait une activité redox élevée liée soit à la production d'H<sub>2</sub>, soit à la réduction de l'oxygène, soit éventuellement à un transfert direct d'électrons. Comme proposé par Z. Zaybak et al. (2013), l'activité élevée résultait probablement d'une activité métabolique élevée dans les biofilms avec un processus catabolique microbien important (Zaybak et al., 2013). Par rapport aux densités de courant obtenues par Rago et al. (2019) de l'ordre de grandeur de -10 mA/m<sup>2</sup> au même potentiel (-0,7 vs SHE), les densités de courant observées ici (-5 à -10 A/m<sup>2</sup>) sont environ 1000 fois plus élevées (Rago et al., 2019). Ces niveaux de densité de courant sont proches de ceux mesurés par Zhang et al. (2022) qui ont rapporté un maximum de -10 A/m<sup>2</sup> au même potentiel appliqué (L. Zhang et al., 2022).

Après 230 jours, des pannes de courant ce sont produites (à 230 jours et 260 jours), interrompant temporairement le contrôle du potentiel des cathodes. Une diminution importante de la moyenne des densités de courant a été observée par la suite dans les réacteurs PCE, jusqu'à -5 A/m<sup>2</sup> après 260 jours et -3 A/m<sup>2</sup> après 320 jours. La densité de courant plus faible reflétait un changement dans le fonctionnement des communautés microbiennes, conduisant à moins d'échange d'électrons avec la cathode.



### 1.3. Quantification de la biomasse

La biomasse bactérienne a été mesurée dans les enrichissements en mesurant les concentrations d'ADNr 16S par qPCR (Figure 4-3). Au jour 131 (18 jours après le passage du carbone organique au CO<sub>2</sub>), les concentrations moyennes d'ADNr 16S mesurées dans l'enrichissement avec cathode polarisée (PCE) et dans les témoins d'enrichissement avec cathode sans potentiel appliqué (nPCE) étaient respectivement de  $4,6 \pm 0,4 \times 10^9$  et  $4,2 \pm 1,2 \times 10^9$  copies d'ADNr 16S/mL. Ces concentrations correspondent à  $9,4 \pm 1,0 \times 10^8$  et  $8,0 \pm 1,5 \times 10^8$  bactéries/mL, respectivement, comme présenté dans la Figure 4-3. Ces concentrations bactériennes résultaient de la première phase d'enrichissement en présence de carbone organique. Pendant cette phase, les substrats organiques ont été utilisés comme sources de carbone et d'électrons pour la croissance de la biomasse dans les deux configurations (PCE et nPCE). Au jour 214, la concentration moyenne en bactéries dans les réacteurs PCE était de  $3,3 \pm 2,1 \times 10^9$  bactéries/mL (d'après la mesure d'ADNr 16S), ce qui correspond à une augmentation de la biomasse d'un facteur 3,5 entre 131 et 214 jours (Figure 4-3). Dans le même temps, la concentration moyenne en bactérie a chuté dans les réacteurs nPCE de  $8,0 \pm 1,5 \times 10^8$  bactéries/mL à  $3,0 \pm 0,8 \times 10^8$  bactéries/mL. Cette baisse s'explique par le manque de source d'énergie disponible pour la croissance, ce qui a conduit à une forte diminution des populations bactériennes. Au jour 214, la concentration d'ADNr 16S dans les réacteurs PCE était 11 fois plus élevée que dans les témoins nPCE. Cette différence est cohérente avec celle rapportée par Rago et al. (2019) entre les conditions polarisées et non polarisées, avec des biocathodes électroactives enrichies en bactéries autotrophes diazotrophes. Ces résultats suggèrent que les communautés microbiennes enrichies ont pu utiliser les électrodes polarisées à -0,7 V vs SHE comme seules sources d'électrons pour se développer tout en fixant le N<sub>2</sub>.

Dans les bouteilles d'enrichissement alimentées en H<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>E), la concentration en ADNr 16S a diminué tout au long de l'expérience. La concentration est passée de  $1,1 \pm 1,3 \times 10^9$  bactéries/mL au début de l'enrichissement à  $1,3 \pm 0,3 \times 10^6$  bactéries/mL après 340 jours (Figure 4-3). Ces concentrations sont inférieures aux concentrations de biomasse observées dans le milieu des réacteurs PCE au même moment de l'enrichissement, c'est-à-dire  $4,5 \pm 5,9 \times 10^6$  bactéries/mL au jour 244 et  $8,6 \pm 8,8 \times 10^6$  bactéries/mL au jour 340. Ces résultats confirment que la croissance bactérienne était plus élevée sur les cathodes que dans un environnement alimenté en H<sub>2</sub>. Il a donc été conclu que le réacteur PCE fournissait un environnement plus favorable à la croissance de la biomasse que les bouteilles alimentées en H<sub>2</sub> car la surface fournie par l'électrode était probablement plus favorable à la croissance du biofilm. Le potentiel bas appliqué à la cathode a probablement été favorable à la réduction d'O<sub>2</sub> et a

permis la formation de zone en anaérobie plus favorable à la fixation de  $N_2$ , résultant en une croissance plus importante.

Nous avons également calculé le rapport *nifH*/16S représentant la part des bactéries capables de fixer  $N_2$  (*nifH*) parmi l'ensemble des bactéries (ADNr 16S). Un ratio moyen de 0,0006 copie du gène *nifH* par copie d'ADNr 16S a été mesuré pour les échantillons au tout début de l'enrichissement, tant pour les enrichissements  $H_2E$  que pour les enrichissements PCE. Après 131 jours, soit le passage au  $CO_2$  comme seule source de carbone, ce niveau est passé à 0,03 pour les réacteurs PCE et à 0,02 pour les témoins nPCE. Ces résultats sont cohérents avec un enrichissement en bactéries diazotrophes pendant la phase d'enrichissement en carbone organique (Bowers et al., 2008). L'enrichissement bactérien dans les réacteurs nPCE était probablement possible car le carbone organique a été utilisé par les bactéries comme source d'énergie.

Après 214 jours, le rapport *nifH*/16S a diminué à 0,02 dans les réacteurs PCE mais est resté plus élevé qu'au début de l'enrichissement. Cette variation suggère des interactions au sein de la communauté qui ont favorisé la croissance des bactéries non fixatrices de  $N_2$  après le passage au  $CO_2$  comme unique source de carbone.

Après 340 jours, le rapport *nifH*/ADNr 16S était d'environ 0,04 pour les enrichissements PCE, comme indiqué dans le Tableau 4-3. Parallèlement, un rapport *nifH*/ADNr 16S de 0,90 a été mesuré pour la condition  $H_2E$  à 244 jours. La plupart des bactéries ont donc été capables de fixer le  $N_2$  dans les bouteilles  $H_2E$ , confirmant l'enrichissement efficace en bactéries diazotrophes (Bowers et al., 2008). Compte tenu de la perte en biomasse observée dans les bouteilles  $H_2E$  au cours de l'enrichissement (Figure 4-3), ce ratio *nifH*/16S élevé correspondait aux bactéries survivantes qui ont été sélectionnées sur leur capacité à fixer le  $N_2$ . Le ratio mesuré dans les bouteilles  $H_2E$  a ensuite diminué jusqu'à 0,19, suggérant une diminution des bactéries fixatrices de  $N_2$  dans la biomasse.

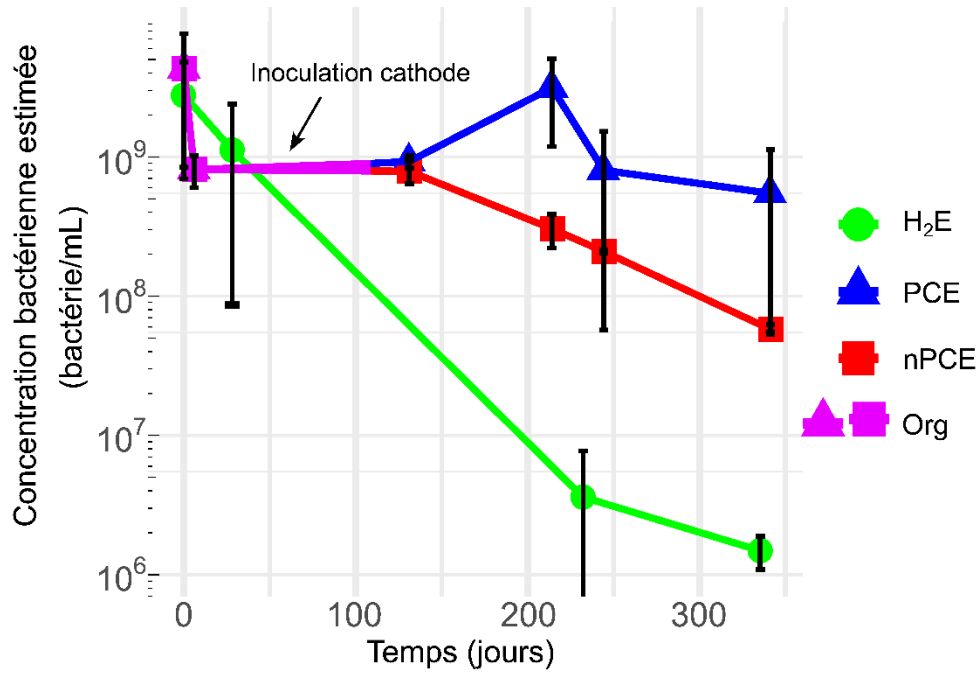


Figure 4-3 : Concentrations de bactéries au cours du temps dans les différents enrichissements, calculées à partir des quantifications par qPCR de l'ADNr 16S dans le milieu et le biofilm. Les disques verts correspondent aux enrichissements H<sub>2</sub>E en bouteilles, les triangles bleus correspondent à l'enrichissement par cathode polarisée (PCE), les carrés rouges correspondent aux contrôles dans l'enrichissement par cathode non polarisée (nPCE). Les symboles partiellement violets marqués Org correspondent aux premières phases d'enrichissement en C organique pour la PCE et la nPCE. La flèche indique la transition entre l'enrichissement par bouteille et l'enrichissement par cathode dans les systèmes électrochimiques microbiens pour la PCE et la nPCE. Les barres d'erreur correspondent à l'écart-type calculé.

Comme mentionné précédemment, après 230 jours (à 230 et 260 jours), des pannes de courant ce sont produites et ont interrompu la polarisation des électrodes. Ces interruptions ont eu un impact sur les communautés microbiennes avec une diminution de la concentration de la biomasse jusqu'à  $8,1 \pm 7,6 \times 10^8$  bactéries/mL à 244 jours et à  $5,5 \pm 6,0 \times 10^8$  bactéries/mL après 340 jours par rapport à la concentration de  $3,3 \times 10^9$  bactéries/mL mesurée à 214 jours. Dans le même temps, le ratio *nifH*/16S rDNA a augmenté jusqu'à 0,05, indiquant que les bactéries fixatrices de N<sub>2</sub> étaient plus résistantes. Néanmoins, une diminution des quantités de copies *nifH* a été observée, passant de  $2,3 \times 10^8$  copies *nifH*/mL après 214 jours à  $7,8 \times 10^7$  copies *nifH*/mL après 340 jours.

#### 1.4. Quantification de l'azote et efficacité coulombique

Les teneurs totales en azote des différentes expériences sont présentées dans la Figure 4-4a. L'azote total correspondait à la somme de l'azote mesuré dans la phase liquide par analyse de la concentration en ions N (N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), dans le milieu par analyse élémentaire CHNS pour PCE et nPCE, dans la biomasse en suspension à partir des résultats qPCR uniquement pour H<sub>2</sub>E où la masse sèche n'a pas été mesurée, et sur l'électrode sur la base des

concentrations bactériennes. La concentration en azote total a été estimée après 131 jours d'enrichissement (avant le passage au CO<sub>2</sub> comme seule source de carbone) à 25,5±0,4 mgN/L et 25,8±4,7 mgN/L dans les réacteurs PCE et nPCE, respectivement. Après 214 jours d'enrichissement, l'azote total a augmenté jusqu'à 87,6±56,1 mgN/L dans les réacteurs PCE par rapport à la concentration de 14,8±7,0 mgN/L dans les témoins nPCE. L'ammonium ne représentait qu'une petite fraction de l'azote total dans le PCE. La concentration maximale d'ammonium observée en fin de batch dans les réacteurs PCE était de 1,5±0,3 mgN/L au jour 340 de l'enrichissement et à un maximum de 4,5±0,4 mgN/L trouvée dans le témoin nPCE après 131 jours (1,4 mgN/L au jour 340) (Figure 4-4b). La fraction moyenne d'azote sous forme d'ammonium était donc de 12 % dans les témoins nPCE et de seulement 1,6 % dans le milieu des réacteurs PCE. Il a donc été supposé que le niveau plus élevé d'ammonium dans les témoins nPCE était lié à la décomposition de la biomasse en l'absence de source d'électrons. En contrepartie, l'ammonium produit par la fixation de N<sub>2</sub> dans les réacteurs PCE a probablement été directement utilisé pour la synthèse des protéines, comme cela a été suggéré par ailleurs (Bueno Batista & Dixon, 2019).

De plus, les concentrations en N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> dans le nPCE étaient 5 à 15 fois plus faibles que les concentrations en N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, avec des concentrations maximales de 0,9 mgN/L N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> dans les témoins nPCE et 0,2 mgN/L N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> dans les réacteurs PCE. Une concentration moyenne de 0,1±0,2 mgN/L de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> dans les bouteilles H<sub>2</sub>E a également été observée. Les concentrations de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> étaient négligeables.

En utilisant la méthode d'estimation de la masse d'azote sur la biomasse perdue pour les témoins nPCE, la concentration totale d'azote perdue par la biomasse a été estimée autour de 130 à 200 mgN/L en fonction du réacteur (2 nPCE). Cette perte était équivalente à des vitesses de 0,6 à 0,9 mgN/L/j libérés par cette biomasse en moyenne tout au long de l'enrichissement. En supposant une perte d'une partie constante de la biomasse, une vitesse de libération de 0,1 mgN/L/j a été estimée en moyenne pour le lot se terminant à 340 jours, proche des 0,07 mg/L/j présentés dans le Tableau 4-3. Ce résultat supporte l'hypothèse selon laquelle la libération de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> était liée à la perte de biomasse dans les enrichissements nPCE après l'arrêt de l'ajout de C organique. Cette observation nous permet aussi de discuter notre méthode d'estimation de la quantité de bactérie et de la quantité d'azote incorporée dans cette biomasse. En effet, l'azote calculé dans la biomasse perdue semble correspondre à l'ordre de grandeur de l'azote retrouvé dans les milieux. Cette observation suggère que notre méthode d'estimation permet de se rapprocher suffisamment des ordres de grandeurs de la quantité d'azote réellement incorporé pour comparer les quantités incorporées dans nos différents enrichissements.

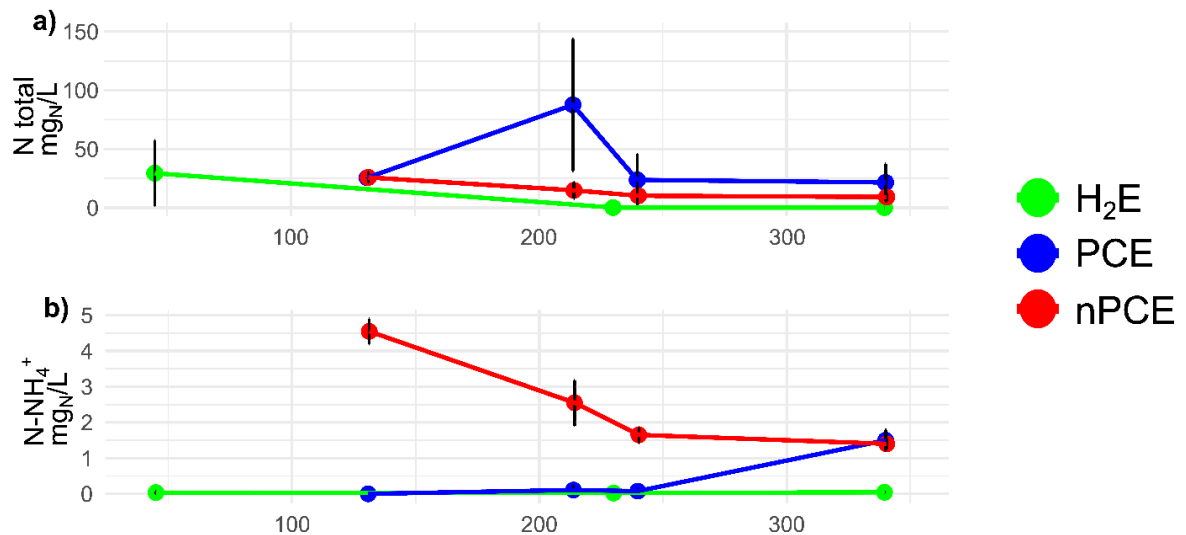


Figure 4-4 : a) Concentration N total basée sur la somme de (1) N estimé à partir de la mesure de la biomasse (biomasse en suspension et biofilm), (2) contenu en N sous forme ionique ( $N-NH_4^+$ ,  $N-NO_3$ ,  $N-NO_2$ ) et (3) N mesuré dans le poids sec du milieu de l'enrichissement par cathode polarisée (PCE) et de l'enrichissement par cathode non polarisée (nPCE) et (b) concentration en  $N-NH_4^+$  dans l'enrichissement par  $H_2$  (H<sub>2</sub>E), PCE et nPCE.

Les bouteilles d'enrichissement avec ajout d' $H_2$  (H<sub>2</sub>E) ont montré une accumulation moyenne de  $N-NH_4^+$  de  $35,6 \pm 36 \mu gN/L$  après 131 jours et une moyenne de  $0,1 \pm 0,2 mgN/L$  sur la durée de l'enrichissement. Cette concentration représentait une petite fraction de l'azote total au tout début de l'enrichissement, avec une concentration estimée à  $29,4 \pm 28 mgN/L$ . La concentration en azote a diminué pendant l'enrichissement, ce qui est cohérent avec la perte de biomasse montrée Figure 4-3. Les bouteilles H<sub>2</sub>E ont donc été moins efficaces pour l'accumulation de  $N_2$  que l'enrichissement avec cathode polarisée, avec une production de biomasse microbienne plus faible.

Les densités de courant, les vitesses de production d'acétate, les vitesses de fixation de  $N_2$  et la croissance de la biomasse sont présentées dans le Tableau 4-4. Les rendements faradiques associés à chaque réaction ont été estimés sur la base de ces résultats (Tableau 4-4) et sont présentés dans le Tableau 4-4 et la Figure 4-5. De 125 à 214 jours d'enrichissement, 0,6 à 3,3 % des électrons ont été utilisés pour la fixation de  $N_2$  dans les deux PCE comme on peut le voir sur la Figure 4-5. En comparaison, des efficacités de 0,5 % et 20 % pour la synthèse de  $NH_4^+$  ont été rapportées dans deux travaux récents réalisés dans des conditions similaires (Yadav et al., 2022; L. Zhang et al., 2022). La quantité d'azote fixé étant fortement dépendante de l'accumulation de biomasse, des résultats négatifs ont été obtenus au jour 244 lorsque la biomasse a commencé à diminuer. Les électrons utilisés à la cathode pour la synthèse de la biomasse pendant la première période (131 à 214 jours) ont représenté 2,8 % et 17,3 % dans les deux réacteurs PCE. Ces efficacités élevées étaient probablement aussi associées aux bactéries acétotrophes et acétogènes. En effet, l'acétate produit en utilisant les électrons

apportés à la cathode a pu être utilisé par les bactéries acétotrophes pour leur croissance, diminuant ainsi le rendement faradique de l'acétogénèse et augmentant ce rendement pour la croissance bactérienne. Comme les bactéries acétogènes ne tolèrent pas la présence d'oxygène, l'O<sub>2</sub> dissous a très probablement été consommé dans certaines parties du biofilm, laissant d'autres parties dans des conditions anaérobies strictes plus favorables à la croissance des bactéries acétogènes. À ce stade, il a été supposé que des réactions de réductions aient eu lieu à la cathode, participant à l'élimination d'O<sub>2</sub>.

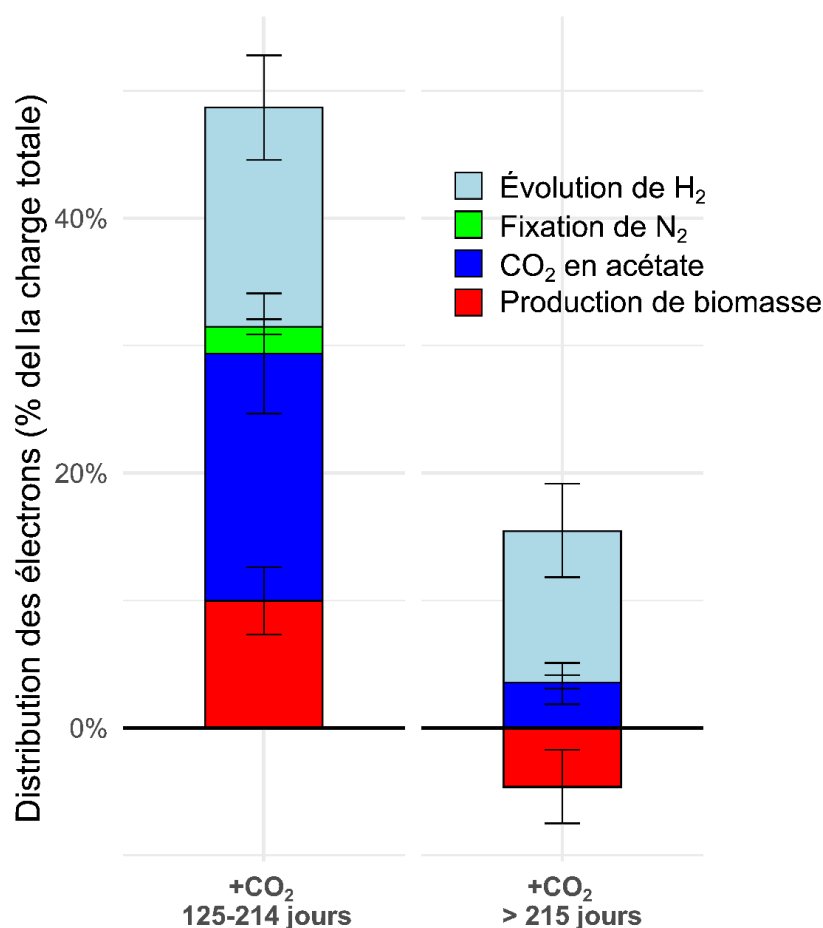


Figure 4-5 : Distribution des électrons dans les différents produits des réactions de réduction sur les cathodes PCE pour des périodes allant de 125 à 214 jours et de 215 jours à la fin des enrichissements présentés. Sont présentés les proportions d'électrons utilisés dans la production d'H<sub>2</sub> (en cyan), les produits de la fixation de N<sub>2</sub> (en vert ; N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, N<sub>total</sub>), l'acétate retrouvé issu de la fixation du CO<sub>2</sub> (en bleu) et l'estimation de biomasse produite sur ces périodes (en rouge). Les barres d'erreurs correspondent aux écart-types des mesures entre les deux réacteurs et pour les différents batch réalisés sur ce périodes (5 entre 125 et 214 jours et 6 sur la période suivante).

Par ailleurs, le H<sub>2</sub> récupéré dans l'espace de tête des réacteurs PCE représentait 13 à 25 % des électrons fournis à la cathode, comme indiqué dans le Tableau 4-4, avant et après les coupures de courant aux jours 230 et 260 des enrichissements. Par conséquent, le H<sub>2</sub> n'était pas lié à l'activité biologique et résultait principalement d'une réaction abiotique à la cathode. De plus, en présence d'O<sub>2</sub> dans la chambre cathodique, des réactions de réduction de l'oxygène étaient

attendues au regard du potentiel appliqué dans cette étude. En effet, une réduction à deux électrons aurait pu se produire, entraînant la production de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), qui peut ensuite subir une réduction supplémentaire pour former de l'eau ( $H_2O$ ) (Rozendal et al., 2009; Sim et al., 2015). Le peroxyde d'hydrogène n'a pas été mesuré, mais la quantité de biomasse trouvée sur les cathodes (Figure 4-3) suggère que les concentrations de peroxyde d'hydrogène étaient suffisamment faibles pour avoir un impact minimal ou nul sur la communauté microbienne pendant le processus d'enrichissement. Néanmoins, une fraction des électrons peut avoir été perdue lors de ces réactions de réduction de l'oxygène, ce qui pourrait expliquer en partie les faibles rendements faradiques observés dans cette étude. Il est intéressant de noter qu'une production significative d'acétate a également été observée (*t*-test,  $P < 0,01$  par rapport à nPCE). Des vitesses moyennes de 149,1  $\mu\text{mol/L/j}$  et de 421,6  $\mu\text{mol/L/j}$  ont été mesurées dans chaque réacteur PCE pour la période allant du jour 131 au jour 214, comme indiqué dans le Tableau 4-4. La production d'acétate s'est presque arrêtée avec les pannes de courant, l'acétate n'étant mesuré que dans un ou deux batchs par réacteur PCE. Cette diminution correspond à des nouvelles vitesses de production moyennes de 61,0  $\mu\text{mol/L/j}$  et 57,4  $\mu\text{mol/L/j}$  d'acétate dans les milieux de chaque réacteur PCE. La production d'acétate représentait 7,9 et 39 % des électrons apportés aux cathodes pendant la première période (jusqu'à 214 jours) et moins de 5 % après les coupures de courant. Pour expliquer la diminution de la production d'acétate, de la croissance de la biomasse et de la consommation d'énergie, il a été supposé que la diminution de la production d'acétate pouvait être due à une perte spécifique de bactéries capables de fixer le  $CO_2$ , et plus particulièrement de bactéries autotrophes utilisant la cathode comme source d'électrons ( $H_2$  ou DET), au sein de la communauté enrichie. Ainsi, ne produisant plus d'acétate, les bactéries hétérotrophes n'ont pas eu assez de carbone organique pour soutenir leur croissance, ce qui a entraîné leur diminution. Par conséquent, les bactéries autotrophes responsables de la fixation du  $CO_2$  et les bactéries hétérotrophes qui pourraient également être dépendantes du  $H_2$  pour la fixation du  $N_2$  ont été fortement affectées, ce qui a entraîné une diminution des réactions de réduction à la cathode et, par conséquent, de la densité de courant. En outre, l'acétate n'a pas été trouvé dans les bouteilles  $H_2E$ , ce qui indique l'absence d'acétogénèse et une différence importante dans les voies et/ou les communautés microbiennes. Comme présenté dans le Tableau 4-4, les électrons ont été récupérés dans la production de biomasse, les produits de fixation du  $N_2$ , le  $H_2$  trouvé dans les espaces de tête et la production d'acétate issu du  $CO_2$ . Ces éléments n'étaient pas suffisants pour clôturer les bilans électroniques. La perte d'électrons et les différences entre les cathodes de PCE 1 et PCE 2 peuvent s'expliquer par des réactions secondaires, telles que la réduction de l' $O_2$  ou des réactions biologiques telles que la production d'exopolysaccharides (EPS).

Tableau 4-4 : Densités de courant, vitesses de production et rendement faradique pour les deux enrichissements cathodiques polarisés (PCE) sur deux périodes différentes de densité de courant avec le CO<sub>2</sub> comme seule source de carbone. Au cours de la première période (131-214 jours), la densité de courant a augmenté, tandis qu'au cours de la seconde période (>215), la densité de courant a diminué après plusieurs coupures de courant (voir Figure 4-2).

		131-214 days		> 215 days	
		PCE 1	PCE 2	PCE 1	PCE 2
J A/m <sup>2</sup>	Moyenne	7,7±3,1	5,9±2,4	6,2±4,1	3,8±2,2
	Maximum	28,2	11,3	19,5	9,9
Acetate μmol/L/j	Moyenne	149,1±203,1	421,6±216,7	57,4±151,8	61,0±106,5
N μmol/L/j	N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	0,108±0,225	0,155±0,249	2,0±1,4	1,5±1,9
	N Masse sèche milieu	10,3±6,0	27,5±13,4	9,0±6,4	12,1±6,4
	N Biomasse cathode(16S/bact)	16,7	80,4	-3,0	-7
Biomasse bact/L/j	Milieu	0,4 ± 0,5×10 <sup>9</sup>	3,5 ± 2,0×10 <sup>9</sup>	0,4 ± 0,5×10 <sup>9</sup>	0,2 ± 0,1×10 <sup>9</sup>
	Cathode	0,9×10 <sup>10</sup>	4,6×10 <sup>10</sup>	-2,6 ± 3,5×10 <sup>10</sup>	-5,9 ± 7,8×10 <sup>10</sup>
Rendements faradiques %	CO <sub>2</sub> à Acetate	7,9±9,5	30,9±8,9	2,1±5,6	5,0±6,6
	H <sup>+</sup> à H <sub>2</sub>	22,3±15,4	12,1±8,8	9,4±13,5	14,4±14,4
	Fixation de N <sub>2</sub>	0,6±0,2	3,3±0,8	0,2±1,0	-0,5±2,2
	Croissance de biomasse	2,8±0,5	17,3±5,3	-2,5±4,0	-8,3±14,2
	Total	33,6±14,4	63,6±9,0	9,2±16,5	10,5±18,8

### 1.5. Communauté microbienne et modèle conceptuel des interactions

Le séquençage de l'ADNr 16S a été effectué à la fin du pré-enrichissement, et après 214 ou 232 jours d'enrichissement dans le réacteur avec cathode polarisée (PCE) et dans les bouteilles alimentées en H<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>E), respectivement. Les jours d'échantillonnage ont été sélectionnés parce qu'ils étaient associés à une activité microbienne élevée (densités de courant et concentrations de biomasse élevées). Dans H<sub>2</sub>E, le rapport d'abondance *nifH*/16S était également maximal (0,9) au jour 232. L'analyse en composantes principales (ACP) a été utilisée pour présenter les communautés pour chaque enrichissement. Chaque réacteur et chaque bouteille sont présentés comme des individus et les principales familles comme des



variables dans l'ACP présentée dans la Figure 4-6 et les abondances relatives sont présentées dans la Figure 4-7.

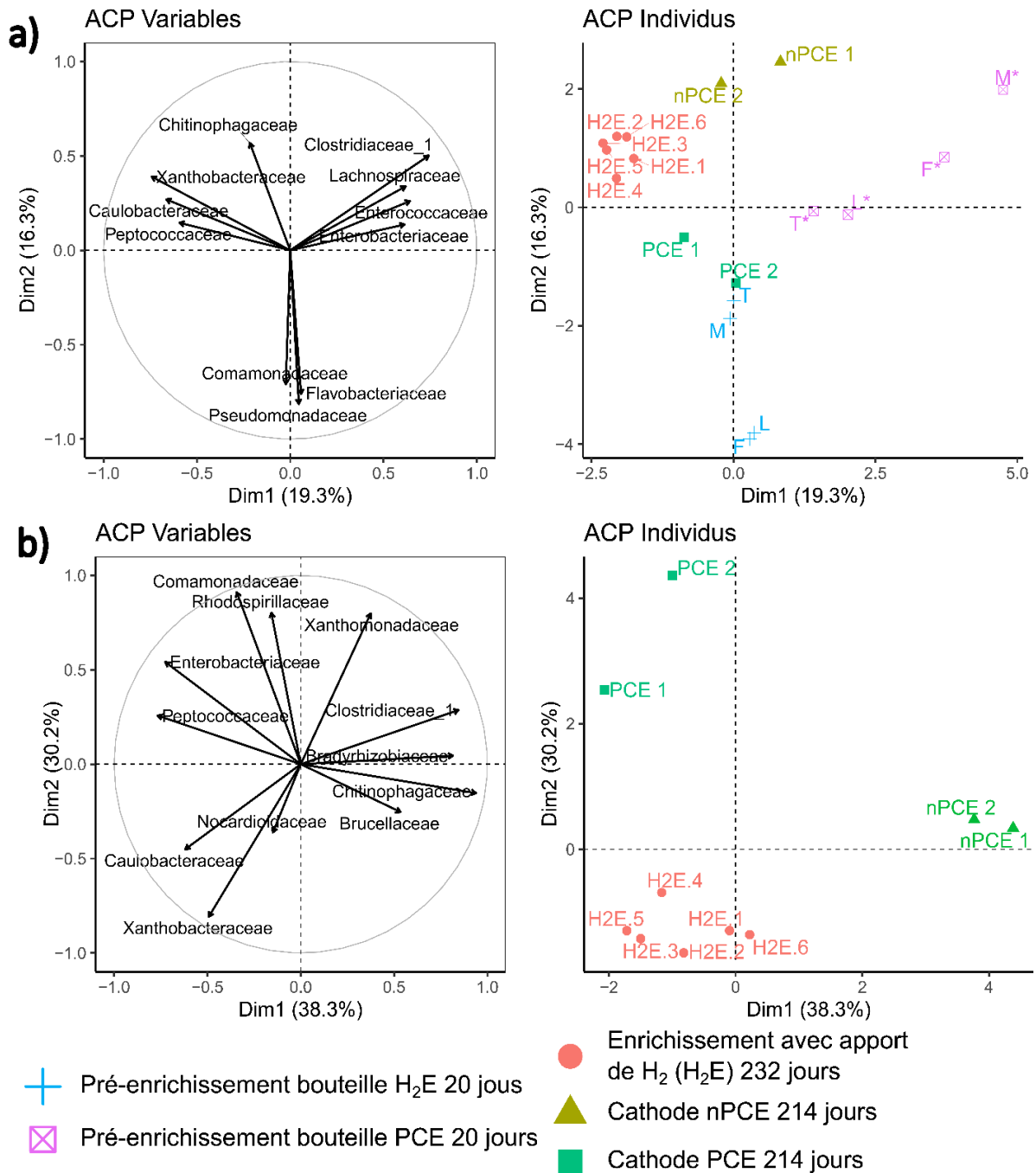


Figure 4-6 : Résultats de l'analyse en composantes principales (ACP) réalisée sur les communautés microbiennes a) des pré-enrichissements, des bouteilles d'enrichissement alimentées en H<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>E) après 232 jours et des cathodes des enrichissements en PCE et nPCE après 214 jours et b) des bouteilles d'enrichissement alimentées en H<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>E) après 232 jours et des cathodes des enrichissements en PCE et nPCE après 214 jours. Seules les familles des cinq principales OTU bactériennes de chaque communauté échantillonnée ont été utilisées pour l'analyse. Les communautés microbiennes dans les bouteilles de pré-enrichissement sont représentées par les abréviations suivantes : F pour le sol forestier, T pour le terreau, L pour la rhizosphère des légumineuses et M pour un mélange de toutes ces communautés. Les variables les moins proches du cercle de corrélation ne sont pas affichées (cos<sup>2</sup> < 0,2).

Pour les communautés en fin de pré-enrichissement, l'analyse en composantes principales (ACP) a montré un lien important entre les familles des *Clostridiaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcaceae* et *Lachnospiraceae* et les pré-enrichissements PCE (Figure 4-6a). En effet, le groupe de communautés de pré-enrichissement en présence de carbone organique est bien séparé des autres groupes et suit la même direction que ces quatre familles. Une dominance de la famille des *Enterobacteriaceae* (principalement du genre *Citrobacter*) a été observée pour chaque échantillon pré-enrichi sauf pour l'échantillon pré-mélangé où les trois autres familles sont très présentes. Ces familles sont donc absentes ou très faiblement représentées dans les autres communautés séquencées, comme le montre la Figure 4-7.

Pour les pré-enrichissements en bouteilles alimentées en H<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>E), le groupe est également séparé des communautés enrichies après 232 jours en H<sub>2</sub>E. La famille des *Pseudomonadaceae* (45% de l'abondance relative moyenne) était principalement dominante à la fin du pré-enrichissement. Les *Nocardiaceae*, *Flavobacteriales*, *Xanthomonadaceae* et *Comamonadaceae* étaient également présentes comme le montre la Figure 4-6. Les familles *Flavobacteriales* et *Comamonadaceae* sont également fortement liées au groupe de pré-enrichissement dans l'ACP de la Figure 4-6a. Ces familles, à l'exception des *Flavobacteriales*, sont également connues pour avoir des membres possédant l'ensemble des gènes nécessaires à la fixation de N<sub>2</sub> (Dos Santos et al., 2012 ; Ghodhbane-Gtari et al., 2019 ; Huda et al., 2022). Ces familles représentaient 77 % des séquences, ce qui est élevé par rapport au rapport *nifH*/ADNr 16S de moins de 0,01 au même moment. Cela suggère que les amorces *nifH* n'étaient pas adaptées à ces espèces spécifiques ou que les espèces trouvées à ce moment-là ne possédaient pas de gènes pour les nitrogénases. Comme les cultures de pré-enrichissement H<sub>2</sub>E ont démarré sur un milieu contenant du NH<sub>4</sub>Cl, la présence de cette source d'azote était probablement favorable à la croissance de bactéries non diazotrophes.

Après 214 jours d'enrichissement, les communautés des biocathodes des enrichissements PCE étaient affiliées aux *Peptococcaceae* (29% en moyenne), *Xanthomonadaceae* (18% en moyenne), *Rhodospirillaceae* (11% dans PCE 2, genre *Azospirillum*) et *Comamonadaceae* (10% en moyenne), comme le montre la Figure 4-7. Comme le montre l'ACP présentée à la Figure 4-6b, les familles *Rhodospirillaceae*, *Comamonadaceae*, *Enterobacteriaceae* et *Xanthomonadaceae* sont représentatives des communautés des cathodes d'enrichissement PCE. La famille des *Peptococaccaceae* semble être partagée avec les communautés des bouteilles d'enrichissement alimentées en H<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>E). Comme le montrent les Figure 4-6a et Figure 4-7, un changement clair dans les communautés microbiennes à partir de la fin du pré-enrichissement a été observé comme la différence entre les communautés des enrichissements PCE à 214 jours et à la fin du pré-enrichissement.

Seule la famille des *Enterobacteriaceae* s'est maintenue, bien qu'avec une abondance relative mineure. Des membres de *Clostridiales incertae sedis* ont également émergés sur les cathodes polarisées (PCE). Ces familles sont connues pour jouer le rôle de bactéries favorisant la croissance des plantes (PGPB). Ces communautés sont donc bénéfiques à certaines plantes lorsqu'elles sont utilisées comme bio engrais (Cassan & García de Salamone, 2008; Rojas-Tapias et al., 2012). Les familles des *Comamonadaceae* ainsi que des *Enterobacteriaceae* comprennent majoritairement des espèces hétérotrophes, ce qui serait cohérent avec l'hypothèse d'existence d'interactions entre populations hétérotrophes et autotrophes (C. Liu et al., 2016; Y. Wu et al., 2018). Plus précisément, les séquences de *Peptococcaceae* ont été affiliées à l'espèce *Desulforamulus ruminis* (>98%). Cette espèce a déjà été décrite pour sa capacité à fixer le N<sub>2</sub> (Postgate, 1970). Les genres *Desulforamulus* et *Desulfotomaculum* comptent également plusieurs espèces capables de se développer avec H<sub>2</sub> et CO<sub>2</sub> comme sources d'électrons et de carbone (Aullo et al., 2013; Zaybak et al., 2013). Il a déjà été rapporté que certaines pouvaient produire de l'acétate par réduction du CO<sub>2</sub> via le cycle de Calvin (Klempers et al., 1985), et certaines ont déjà été trouvées dans des systèmes de bioélectrochimie microbiens sur une biocathode produisant de l'acétate (Zaybak et al., 2013). L'autre famille principale, *Xanthomonadaceae*, était représentée par plusieurs genres avec une majorité de *Pseudoxanthomonas*. Dans ce genre, certains membres ont été identifiés comme des fixateurs de N<sub>2</sub> ayant besoin d'une source de carbone organique externe, présentant un métabolisme mixotrophe en fonction des conditions environnementales (X. Hu et al., 2022; Ryan et al., 2009). Les séquences associées à la famille des *Rhodospirillaceae* ont été principalement affiliées à l'espèce *Azospirillum lipoferum* qui est capable de se développer en autotrophie avec H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> et N<sub>2</sub> (Tilak et al., 1986). Cette bactérie du sol est également connue pour son rôle de PGPB avec une capacité à solubiliser les phosphates, ce qui en fait un bon candidat comme engrais (Cassan & García de Salamone, 2008; Tilak et al., 1986). Il est intéressant de noter que de nombreuses bactéries identifiées dans l'enrichissement sur cathode polarisée (PCE) ont déjà été décrites comme possédant des gènes et des capacités de fixation du N<sub>2</sub>. Cela confirme le fait que les amorces n'ont pas été en mesure d'amplifier toute la diversité des gènes *nifH* de ces communautés.

Les familles *Xanthobacteraceae* (51% en moyenne), *Peptococcaceae* (17%, identifiée comme *Desulforamulus*), *Chitinophagaceae* (8%) et *Nocardioideaceae* (5%) se sont avérées dominantes dans les bouteilles H<sub>2</sub>E au jour 214, comme le montre la Figure 4-7. La famille des *Xanthobacteraceae*, fortement liée aux communautés H<sub>2</sub>E comme le montre la Figure 4-6b, était principalement représentée par l'espèce *Xanthobacter autotrophicus* qui est connue comme HOB fixant l'azote (Wiegel, 2005). Cette espèce a déjà été utilisée pour la fixation de N<sub>2</sub> par Liu et al. (Liu et al., 2017) dans un système hybride utilisant le H<sub>2</sub> produit par une

cathode. *Xanthobacter autotrophicus* a également été retrouvée dans le milieu de l'enrichissement par cathode polarisée mais en plus faible abondance (< 5%). Par conséquent, la communauté enrichie en H<sub>2</sub> dans des bouteilles était principalement composée de bactéries fixant le N<sub>2</sub>, comme le montre également le rapport *nifH*/16S élevé (0,9). Après 214 jours d'enrichissement, les HOB diazotrophes ont été spécifiquement sélectionnés.

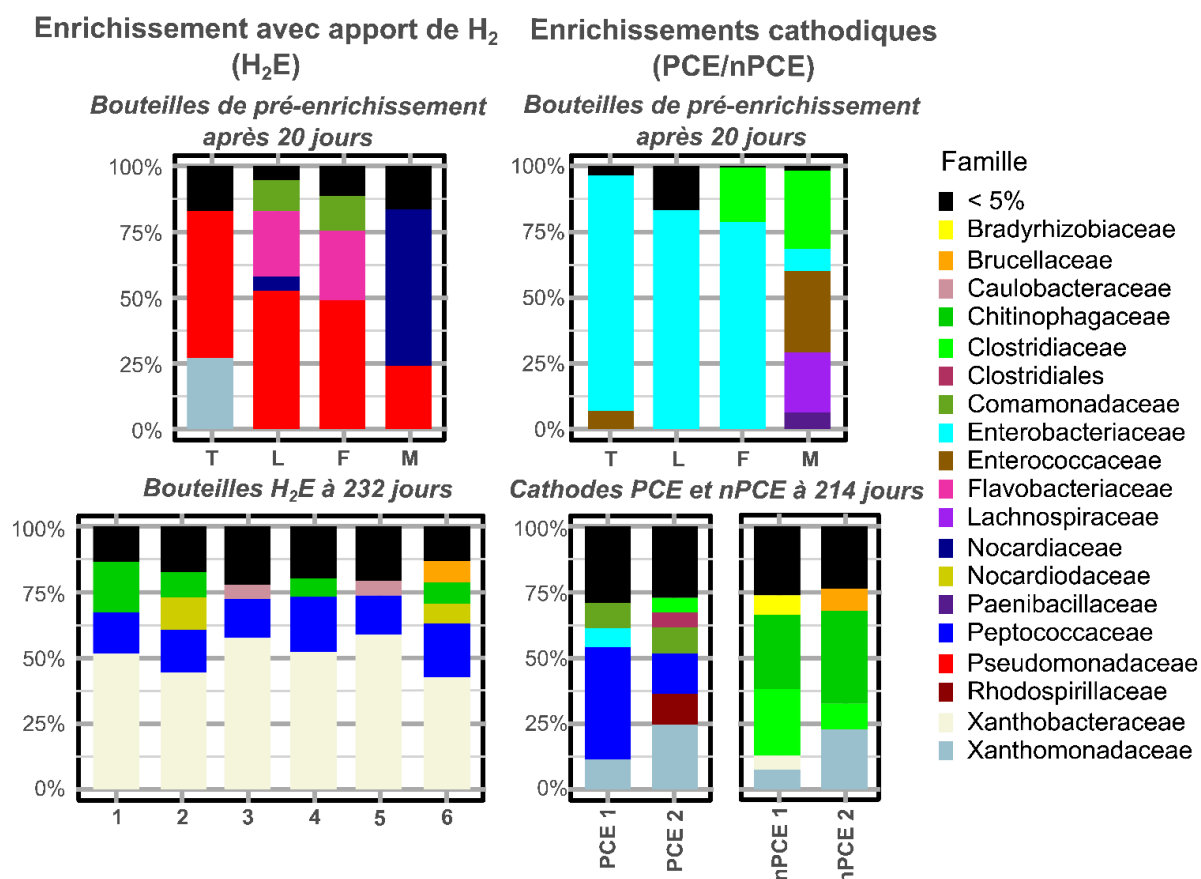


Figure 4-7 : Graphiques à barres des abondances relatives des principales familles bactériennes des pré-enrichissements, de l'enrichissement alimenté en H<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>E après 232 jours) et des enrichissements cathodiques (PCE et nPCE après 214 jours). Les communautés microbiennes dans les bouteilles de pré-enrichissement sont représentées par les abréviations suivantes : F pour le sol forestier, T pour le terreau, L pour la rhizosphère des légumineuses et M pour un mélange des trois. Seules les familles dont l'abondance relative est ≥ 5 % sont représentées pour chaque échantillon.

La présence de bactéries mixotrophes et hétérotrophes dans les réacteurs PCE suggère que des interactions basées sur le carbone ont pu se produire. L'acétate était le seul métabolite de carbone soluble trouvé dans ces enrichissements (voir Tableau 4-4). Par conséquent, on a supposé que l'acétate était utilisé comme intermédiaire pour le transfert de carbone et d'électrons entre les homoacétogènes autotrophes, par exemple *Desulforamulus rumnis*, et les bactéries hétérotrophes telles que *Comamonas* sp.

En outre, la faible concentration de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> dans les réacteurs PCE avant le jour 214 (Tableau 4-4) était probablement due à sa consommation rapide pour la croissance des bactéries.

Compte tenu de ces hypothèses, un schéma conceptuel des interactions microbiennes entre les principales familles de bactéries retrouvées sur les cathodes des enrichissements PCE a été proposé et est présenté dans la Figure 4-8. La présence de bactéries hétérotrophes et leur utilisation potentielle de l'O<sub>2</sub> comme accepteur final d'électrons ont également été prises en compte. La concentration d'O<sub>2</sub> dissous aurait diminué dans le biofilm en raison de son utilisation pour la respiration des bactéries hétérotrophes aérobies. Une structure du biofilm en deux couches pourrait alors être proposée avec une première couche composée principalement d'homoacétogènes fixés sur la cathode et réduisant le CO<sub>2</sub> en acétate CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>, et une seconde couche composée principalement de bactéries hétérotrophes utilisant l'acétate et l'O<sub>2</sub> dissous pour soutenir leur croissance et comme source d'énergie pour la fixation de N<sub>2</sub>. Il a été supposé que les bactéries de la première couche n'auraient pas accès au N<sub>2</sub> qui serait principalement fixé par les organismes de la deuxième couche.

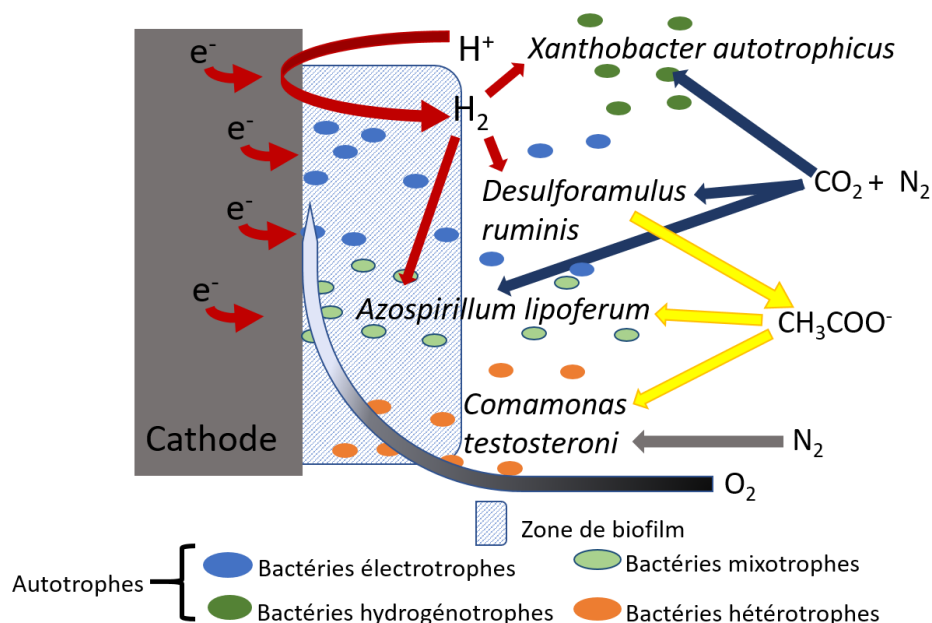


Figure 4-8 : Hypothèses des interactions prenant place dans nos communautés après enrichissement pour la fixation de N<sub>2</sub> avec des sources d'énergie inorganiques.

## 2. INOCULATION DE NOUVELLES CATHODES A PARTIR DES COMMUNAUTES ENRICHIES

Pour compléter les observations et hypothèses faites sur les interactions dans les enrichissements cathodiques pour la fixation de N<sub>2</sub>, nous avons voulu séparer les biofilms des bactéries planctoniques pour voir si des différences existaient entre les deux parties de la communauté pour la fixation de N<sub>2</sub> et voir s'il était possible de lancer de nouvelles cathodes pour la fixation de N<sub>2</sub> à partir des cultures des enrichissements (milieux colonisés). On se

demande alors si une différence existe entre communauté d'un nouveau biofilm qui se développe et d'un biofilm établi depuis 398 jours pour la fixation de  $N_2$ .

De réacteurs avec de nouvelles électrodes et membranes ont été utilisés ici pour étudier séparément les communautés des biofilms des enrichissements PCE des bactéries planctoniques. Ces nouveaux réacteurs ont permis de suivre le développement d'un biofilm afin de mieux caractériser les voies de fixation du  $N_2$ . Deux réacteurs ont été utilisés dans un premier temps en batch de 16 jours et sans inoculation, pour tester les performances sous conditions abiotiques. Ces deux réacteurs ont été inoculés avec les cultures issues des milieux des enrichissements PCE obtenus après 398 jours et ont été appelés PCE B (PCE Bulk). Les cathodes des enrichissements PCE ont vu leurs milieux entièrement remplacés par du milieu neuf à 398 jours d'enrichissement et les cathodes colonisées ont été utilisées avec du milieu neuf dans des réacteurs appelés PCE E (PCE Electrode). Pour les travaux sur les nouveaux réacteurs, les mesures de la fixation d'azote, de la croissance de biomasse et de la densité de courant ont montré la capacité de produire de la biomasse à partir de  $N_2$  et des électrons apportés à la cathode dans un seul des deux réacteurs PCE B. Les communautés ont été séquencées et ont été comparées avec celles retrouvées sur les cathodes des réacteurs PCE E pour approfondir certaines des hypothèses préalablement formulées.

## *2.1. Densité de courant*

### *2.1.1. Rappel des enrichissements et de l'état de la densité de courant avant inoculation des nouveaux réacteurs*

Les densités de courant relevées au cours des enrichissements présentés ci-dessus ont atteint un maximum entre -10 et -12,5 A/m<sup>2</sup>. Suite à ces coupures de courant survenues aux jours 224 et 246 des enrichissements PCE, les densités de courant mesurées ont chuté jusqu'à -1 à -2 A/m<sup>2</sup> après 340 jours comme vu dans la Figure 4-2 et retrouvé en début de Figure 4-9 pour PCE 1 et PCE 2.

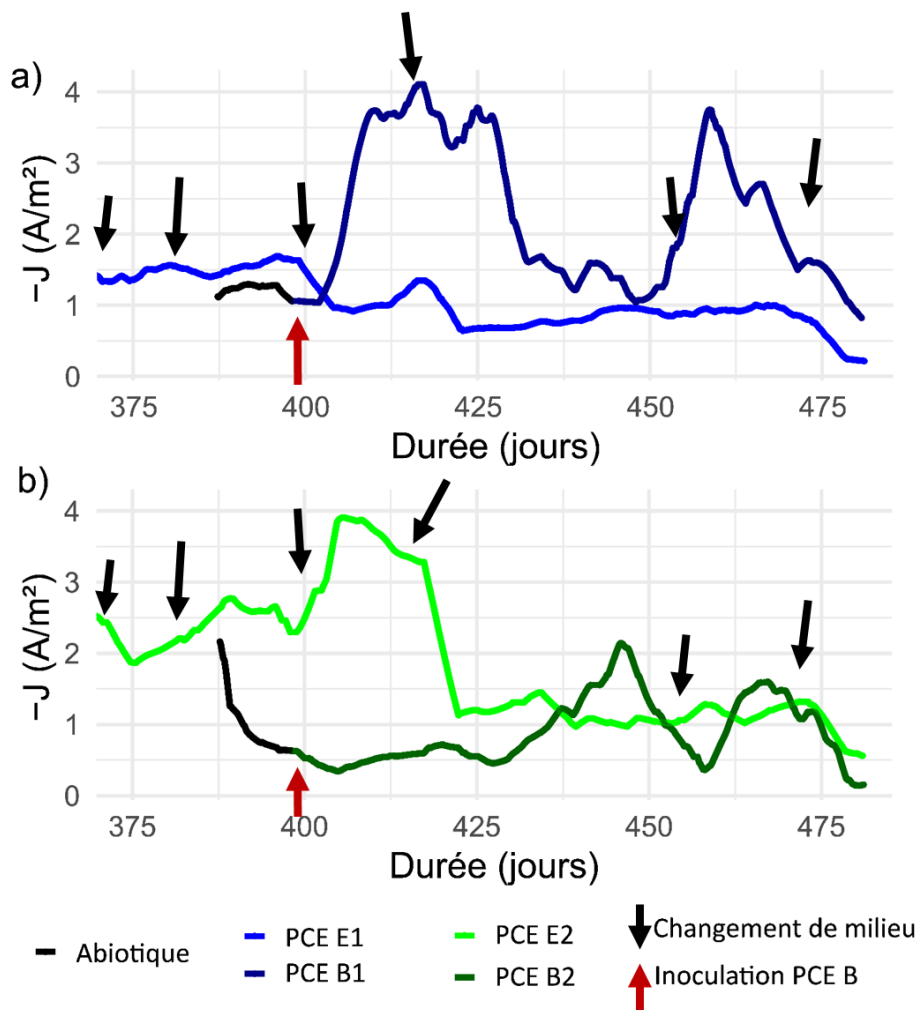


Figure 4-9 : Densités de courant relevées dans les différents réacteurs à électrodes polarisées. Sont présentés les densités de courant des réacteurs des enrichissements (PCE 1 et 2) et les densités de courant des réacteurs inoculés avec le milieu des premiers (PCE B1 et B2). Les densités de courant avant inoculation mesurées dans les réacteurs non utilisés pour les enrichissements sont présentées en noir. Les densités de courant sont présentées séparément avec a) les réacteurs PCE et PCE B1 en bleu et bleu foncé et b) les réacteurs PCE 2 et PCE B2 en vert et vert foncé. Le moment de l'inoculation est indiqué par une flèche rouge. Les changements de milieu sont indiqués par des flèches noires.

### 2.1.2. Densité de courant des nouveaux réacteurs

Après inoculation des nouveaux réacteurs au jour 398 des enrichissements, les densités de courant des réacteurs PCE E1 et PCE B2 se sont maintenues à un niveau faible entre -1 et -2 A/m<sup>2</sup> comme nous l'indique la Figure 4-9 après 375 jours et jusqu'à la fin de la culture. En revanche, dans PCE E2 et PCE B1, les densités de courant ont atteint un maximum d'environ -4 A.m<sup>2</sup> après le premier batch, soit après environ 19 jours (jours 398 à 417 des enrichissements). Cette augmentation n'a été observée que dans le réacteur PCE B1 inoculé par PCE E1 et pas dans PCE B2. Or PCE E1 était également le réacteur qui avait eu la densité de courant la plus élevée des enrichissements (Tableau 4-4). À l'inverse, le réacteur PCE B2

inoculé par PCE E2 montre une densité de courant plus faible, de même ordre que la densité de courant mesuré durant 16 jours (jours 382 à 398) sans inoculation ( $\approx -1,5 \text{ A/m}^2$ ) comme présenté en Figure 4-9. Le réacteur PCE E2 qui a montré une augmentation jusqu'à  $-4 \text{ A/m}^2$  de sa densité de courant s'était maintenu pendant 5-6 jours (environ 415 jours d'enrichissement) avant de voir sa densité de courant descendre à  $-1 \text{ A/m}^2$  à 420 jours d'enrichissement, à la suite d'un changement de milieu.

## 2.2. Croissance de biomasse sur l'électrode et fixation de $\text{N}_2$

À 398 jours d'enrichissements, les biomasses présentes dans les milieux n'étaient plus assez concentrées pour une quantification et on ne présentera donc que les communautés des cathodes. Les concentrations en biomasse des nouveaux réacteurs (cathodique et planctonique) sont présentées dans la Figure 4-10 en comparaison avec les moyennes des concentrations des enrichissements.

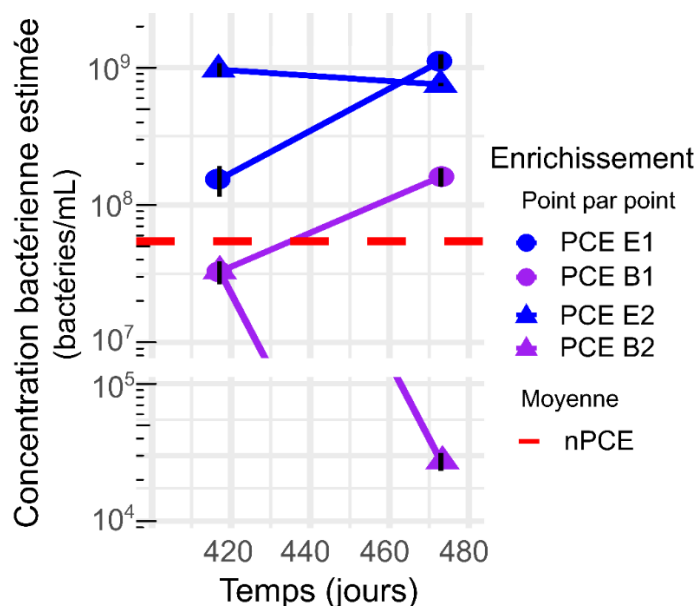


Figure 4-10 : Croissance de biomasse sur les électrodes des nouvelles cultures cathodiques (PCE E et PCE B) et comparaison avec les moyennes des cultures d'enrichissement. La concentration moyenne des enrichissements nPCE est calculée d'après les mesures à 340 et 417 jours. La concentration mesurée à 398 jours pour les cathodes PCE B correspond à la biomasse déjà présente sur les cathodes avant inoculation. Un seul réacteur PCE B a été mesuré pour le dernier point à 473 jours. Le second réacteur (PCE B2) présentant une concentration en ADNr 16S d'environ  $10^6$  bactérie/mL soit trop faible pour le séquençage, voit sa concentration en bactérie estimée selon un facteur de 10 ADNr 16S/bactérie.

### 2.2.1. Variation de concentration en biomasse PCE et nPCE

En ce qui concerne les cathodes PCE E, sur la période entre les derniers échantillons présentés durant les enrichissements (à 340 jours) et les derniers prélèvements de biomasse pour les PCE (473 jours d'enrichissement), les réacteurs PCE E ont eu une biomasse moyenne de



6,8±4,4×10<sup>8</sup> bactéries/mL comme présenté en Figure 4-10 et pour rappel, les enrichissements H<sub>2</sub>E en bouteille avaient montré une concentration moyenne de 3,2±3,8×10<sup>6</sup> bactéries/mL à 340 jours. Le réacteur appelé PCE E1 a vu sa biomasse augmenter de 4,5×10<sup>8</sup> bactéries/L/j et la biomasse de PCE E2 a diminué à une vitesse de -0,6×10<sup>7</sup> bactéries/L/j sur la période de 340 jours à 417 jours d'enrichissement. Ainsi, la biomasse de PCE E1 a pu augmenter après le développement de bactéries pouvant utiliser les électrons apportés à la cathode (H<sub>2</sub>, direct). Au moment de l'inoculation des réacteurs PCE B au jour 398, une concentration moyenne de biomasse correspondant à 1,2±1,1×10<sup>9</sup> copies<sub>ADNr 16S</sub>/mL (0,5×10<sup>9</sup> et 2,0×10<sup>9</sup> copies<sub>ADNr 16S</sub>/mL PCE E1 et PCE E2) a été mesurée en moyenne sur les cathodes PCE E, les milieux étant trop peu concentrés pour une quantification de la biomasse (après 398 jours d'enrichissement dont 275 sur cathode avec CO<sub>2</sub> comme source de carbone). Dans les réacteurs non polarisés nPCE, la moyenne entre les jours 340 et 413 des enrichissements (pas de séquençage à 473 jours) était de 4,5±1,9×10<sup>7</sup> bactéries/mL comme on peut le voir sur la Figure 4-10. Plus précisément, à 398 jours d'enrichissement, cette biomasse était à une concentration de 5,0±6,6×10<sup>7</sup> copies/mL (0,3×10<sup>7</sup> et 9,7×10<sup>7</sup> copies/mL, après 398 d'enrichissements jours, soit 275 jours en absence de donneur d'électrons et de source de carbone/énergie). Au batch suivant (entre les jours 398 et 417 des enrichissements), les concentrations ont atteint 0,4 et 3,0×10<sup>9</sup> copies/mL pour les réacteurs PCE E1 et PCE E2 et 0,5×10<sup>8</sup> et 1,3×10<sup>8</sup> copies/mL pour nPCE 1 et nPCE 2. Ces concentrations en copies de gènes ADNr 16S à 417 jours correspondent à des concentrations moyennes de 5,6±5,8×10<sup>8</sup> bactéries/mL (1,6×10<sup>8</sup> et 9,7×10<sup>8</sup> bactéries/mL) pour PCE et 3,6±2,7×10<sup>7</sup> bactéries/mL. Ces mesures sont présentées au travers des moyennes des concentrations bactériennes entre les jours 340 et 473 (340 et 417 pour nPCE) des enrichissements présentés en Figure 4-10. Enfin, après 473 jours d'enrichissement, la concentration moyenne sur les cathodes PCE E était de 9,3±2,6×10<sup>8</sup> bactéries/mL, avec notamment une croissance pour PCE E1 pour une concentration finale de 1,1×10<sup>9</sup> bactéries/mL.

### 2.2.2. Concentration bactérienne des nouvelles cathodes

La biomasse des milieux de culture des enrichissements PCE au jour 398 était trop peu concentrée pour une quantification par qPCR. Après inoculation avec 200mL de culture issue des enrichissements PCE et un premier batch de 19 jours (entre les jours 398 et 417 des enrichissements), la biomasse totale (milieu+biofilm) a augmenté jusqu'à 3,3±0,03×10<sup>7</sup> bactéries/mL en moyenne pour les deux nouveaux réacteurs PCE B. Lors de la dernière mesure de biomasse au jour 473 des enrichissements (soit 75 jours de culture PCE B), la biomasse a augmenté jusqu'à 1,6×10<sup>8</sup> bactéries/mL pour la cathode PCE B1. La concentration en copies d'ADNr 16S de PCE B2 a baissé de 7,4×10<sup>7</sup> copies/mL à 2,6×10<sup>5</sup> copies/mL entre les jours 417

et 473 des enrichissements. Cette concentration finale a été trop faible pour le séquençage et il n'y a donc pas eu de calcul en concentration bactérienne pour PCE B2 au jour 473. Ces résultats confirment le développement de biomasse pour le réacteur PCE B1 et l'absence de croissance pour PCE B2. Ces variations de concentration semblent liées avec la densité de courant avec une augmentation de biomasse observée seulement dans le cas du réacteur présentant une densité de courant élevée (PCE B1, Figure 4-9).

### 2.2.3. Vitesses de croissance

En calculant les vitesses de production de bactéries, d'après les concentrations présentées dans la Figure 4-10, on obtient des moyennes de  $0,7 \pm 1,5 \times 10^{10}$  bactéries/L/j et  $0,3 \times 10^{10}$  bactéries/L/j pour les réacteurs PCE E (1 et 2) et l'électrode PCE B1 entre 417 et 473 jours. Pour les réacteurs PCE E, la forte variabilité observée s'explique par une décroissance pour PCE E2 comme vu entre les jours 340 et 417. La baisse était d'une vitesse d'environ  $-0,4 \times 10^{10}$  bactéries/L/j contre une augmentation de  $1,7 \times 10^{10}$  bactéries/L/j pour les réacteurs PCE E respectivement 2 et 1 (contre  $-0,6 \times 10^8$  bactéries/L/j et  $4,4 \times 10^8$  bactéries/L/j entre 340 et 417 jours d'enrichissement pour PCE E2 et PCE E1). La vitesse de perte de biomasse en comparaison avec la concentration en biomasse ( $9,7 \times 10^{11}$  bactéries/L à 417 jours) laisse supposer que la perte était négligeable et qu'il pourrait s'agir de variations causées par les mesures et/ou les prélèvements. Les vitesses ont été mesurées entre le 417<sup>ème</sup> et le 473<sup>ème</sup> jour pour les réacteurs PCE E. Les vitesses étaient plus faibles que lors de la première phase des enrichissements PCE (jours 131 à 214) avec  $\text{CO}_2$  comme seule source de carbone, où elles étaient comprises entre  $0,9 \times 10^{10}$  et  $4,6 \times 10^{10}$  bactéries/L/j (Tableau 4-4). Ces vitesses restent cohérentes avec les observations de Rago et al. (2019) portant sur la croissance de la biomasse sur cathode avec une vitesse de  $0,5 \times 10^{10}$  bactéries/L/j. Ces résultats sont aussi cohérents avec les observations faites dans les réacteurs PCE B. En effet, entre les jours 417 et 473, le réacteur PCE B2 a vu sa biomasse diminuer comme PCE E2. A l'inverse, pour PCE E1 et PCE B1, la biomasse a augmenté comme le présente la Figure 4-10. Il en a été conclu qu'il existait une différence de communautés entre les réacteurs PCE E1 et B1 et les réacteurs PCE E2 et B2.

## 2.3. Fixation de $\text{N}_2$

### 2.3.1. Fixation de $\text{N}_2$ suivie par méthode ARA

Pour valider la fixation de  $\text{N}_2$  par les nouvelles biocathodes, la méthode ARA a été utilisée. Les résultats obtenus sont présentés en Figure 4-11. Les résultats confirment la formation d'éthylène par réduction de l'acétylène dans certains des réacteurs. Après 417 jours d'enrichissement (ou 19 jours après inoculation des nouvelles cathodes), les vitesses

mesurées étaient de 35 et 38  $\mu\text{mol}_{\text{C}_2\text{H}_4}/\text{L}/\text{j}$  pour les réacteurs PCE E1 et PCE B1, étaient de l'ordre de grandeur de ce qui avait été observé à 340 jours. En calculant les vitesses spécifiques d'après les quantités de bactéries estimées pouvoir fixer  $\text{N}_2$  (qPCR *nifH*), des vitesses moyennes de  $0,6 \pm 0,4 \mu\text{mol}_{\text{N}}/10^9$  copies *nifH*/j et de  $1,6 \pm 1,3 \mu\text{mol}_{\text{N}}/10^9$  copies *nifH*/j ont été respectivement obtenues pour PCE E1 et PCE B1. Ces vitesses sont cohérentes avec les mesures réalisées pour les enrichissements à 340 jours avec 0,7 à 7  $\mu\text{mol}_{\text{N}}/10^9$  copies *nifH*/j (après conversion) pour les PCE et les bouteilles  $\text{H}_2\text{E}$ . Pour les réacteurs nPCE la fixation de  $\text{N}_2$  n'a pas été observé du fait de l'absence de production d'éthylène. À 355 jours, la fixation de  $\text{N}_2$  semble s'être maintenue seulement pour le réacteur PCE E1 avec une baisse jusqu'à moins de 20  $\mu\text{mol}/\text{L}/\text{j}$  de  $\text{C}_2\text{H}_4$  pour le réacteur PCE B1. Cette absence de fixation observée pour les réacteurs PCE E2 et PCE B2 est cohérente avec la perte de biomasse observée dans ces réacteurs présentés en Figure 4-10 mais également avec les densités de courant mesurées qui indiquaient une activité de réduction plus faible dans PCE B2 que pour PCE B1. Cependant, la densité de courant (moyenne) de PCE E2 a été supérieure à celle de PCE E1 sans montrer pour autant de fixation de  $\text{N}_2$ . On suppose donc que, comme pour ce qui avait été vu dans les enrichissements, les rendements faradiques de fixation de  $\text{N}_2$  étaient faibles et surtout, n'ont pas été nécessairement corrélés à la densité de courant qui serait généré par d'autres réactions que la fixation d'azote.

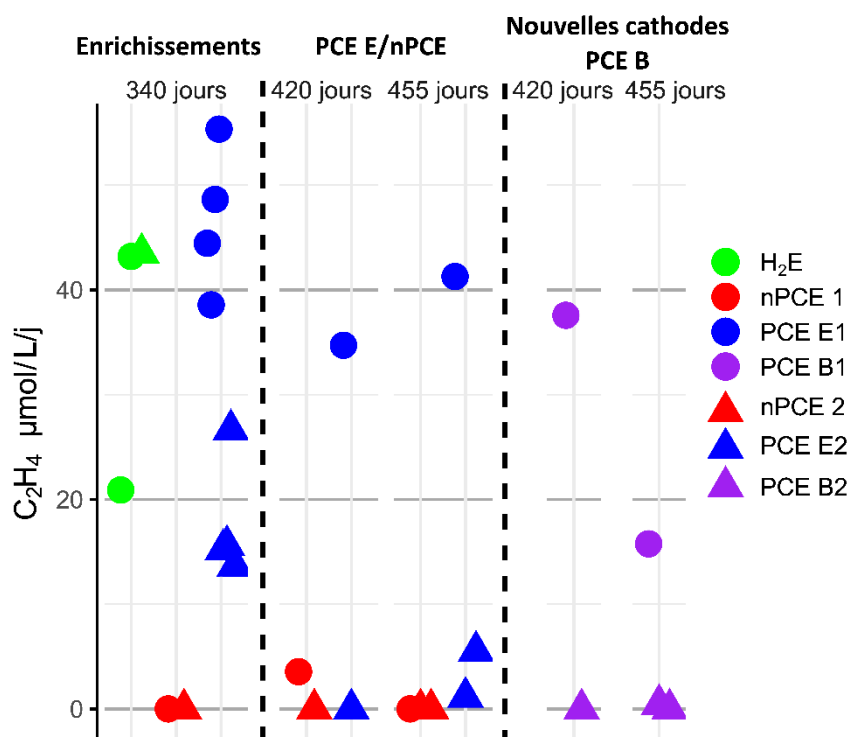


Figure 4-11 : Vitesse de réduction de l'acétylène mesurée par la méthode ARA. Les résultats présentés pour les enrichissements à 340 jours sont les mêmes que présentés en partie 1 de ce chapitre. Les résultats des enrichissements  $\text{H}_2\text{E}$  ne sont pas présentés avec des observations de  $\text{C}_2\text{H}_4$  uniquement dans une bouteille après 450 jours d'enrichissement. Les formes indiquent le réacteur et/ou pré-enrichissement ayant été utilisé aussi bien pour les bouteilles d'enrichissements  $\text{H}_2\text{E}$  et pour les enrichissements cathodiques. Les ronds correspondent

au pré-enrichissement avec échantillon de sol séparé et au réacteur PCE 1. Les triangles correspondent aux pré-enrichissement en mélange des échantillons ou réacteur PCE 2. Deux points sont présents pour les PCE E2 et PCE B2 à 455 jours (55 jour) pour une seconde mesure de la fixation utilisée pour confirmer l'absence de réduction de l'acétylène  $C_2H_2$ .

### 2.3.2. Conversion vitesse ARA en $N_2$ fixé

Ces résultats confirment la fixation de  $N_2$  pour les réacteurs PCE E1 et PCE B1 à l'inverse de PCE E2 et PCE B2. Pour compléter et quantifier l'azote fixé dans la biomasse, les quantités de bactéries calculées indiquent une augmentation de  $4,0 \mu\text{mol}_N/\text{L}/\text{j}$  entre les 20<sup>ème</sup> et 54<sup>ème</sup> jours (jours 417 à 451) après inoculation de PCE B1, avec une moyenne de  $26,7 \pm 15,4 \mu\text{mol}_{C_2H_4}/\text{L}/\text{j}$  mesurée par la méthode ARA. En prenant le rapport théorique de 3:1 ( $C_2H_4:NH_4$ ), une vitesse de fixation d'azote de  $8,9 \pm 5,1 \mu\text{mol}_N/\text{L}/\text{j}$  en est déduite.

### 2.3.3. Mesures des autres formes de l'azote

En parallèle, la concentration en ions  $NH_4^+$  a été mesurée avec une vitesse de production moyenne de  $0,8 \pm 0,4 \mu\text{mol}_{NH_4^+}/\text{L}/\text{j}$  pour PCE B1 (jours 398 à 473). Cette vitesse de production en ions  $NH_4^+$  est montée à des moyennes de  $6,8 \pm 9,0 \mu\text{mol}_{NH_4^+}/\text{L}/\text{j}$  et  $9,1 \pm 10,0 \mu\text{mol}_{NH_4^+}/\text{L}/\text{j}$  pour les enrichissements PCE E1 et E2 et  $6,3 \pm 5,1 \mu\text{mol}_{NH_4^+}/\text{L}/\text{j}$  pour la cathode PCE B2. Ces vitesses de production d'azote ammoniacal sont basées sur les concentrations mesurées avant changement de milieu. En retirant le batch allant des jours 417 à 451 du calcul des vitesses de PCE E1, les vitesses chutent à  $1,7 \pm 1,3 \mu\text{mol}_{NH_4^+}/\text{L}/\text{j}$ . Il est donc supposé un phénomène de lyse de la biomasse sur ce batch (jours 417 à 451) qui a vu sa vitesse de libération de  $NH_4^+$  élevée ( $17,1 \mu\text{mol}_{NH_4}/\text{L}/\text{j}$ ) en comparaison avec les autres mesures de vitesses (entre 398 et 417 jours puis entre 451 et 473 jours). Pour les réacteurs PCE E2 et PCE B2, des augmentations de  $0,8 \mu\text{mol}_{NH_4^+}/\text{L}/\text{j}$  à  $20,1 \mu\text{mol}_{NH_4^+}/\text{L}/\text{j}$  et de  $1,6 \mu\text{mol}_{NH_4^+}/\text{L}/\text{j}$  à  $11,7 \mu\text{mol}_{NH_4^+}/\text{L}/\text{j}$  ont été observées en 75 jours (jours 398 à 473). Ces résultats peuvent s'expliquer par la diminution des concentrations bactériennes mesurées (Figure 4-10), synonyme de lyse bactérienne et de libération des ions  $NH_4^+$  présent dans la biomasse. L'absence de fixation de  $N_2$  pour les réacteurs PCE E2 et PCE B2 confirme que le  $NH_4^+$  retrouvé dans leur milieu n'est pas issu de la fixation de  $N_2$ .

### 2.3.4. Azote dans la biomasse et comparaison avec vitesse ARA et libération de $NH_4^+$

En estimant la quantité d'azote de la biomasse perdue en cours de lyse dans PCE E2, une vitesse de  $5,7 \mu\text{mol}_N/\text{L}/\text{j}$  d'azote libéré par la biomasse est calculée, soit environ 75% de l'azote retrouvé sous forme  $NH_4^+$  dans les milieux. Il est alors supposé que les 25% restant soient retrouvés dans l'azote qui se retrouve dans les masses sèches de nos milieux. Pour la cathode

PCE B2, nous avons vu que la biomasse était trop faible sur l'électrode après 75 jours (jours 473) de cultures pour être quantifiée, ce qui traduit là aussi la lyse de biomasse par rapport à la concentration mesurée au jour 417. Or la biomasse établie à la cathode de PCE B2 19 jours après inoculation (jour 417 des enrichissements) représenterait une quantité de  $58,1 \mu\text{mol}_N/\text{L}$ , soit une vitesse de libération de  $1,0 \mu\text{mol}_N/\text{L}/\text{j}$ . La différence entre les vitesses de production de la biomasse ou de production de  $\text{NH}_4^+$  étaient donc probablement liées à la production de  $\text{NH}_4^+$  par d'autres phénomènes que la fixation de  $\text{N}_2$  qui n'ont pas été mis en évidence, ou que ces vitesses étaient trop faibles pour permettre une production d'éthylène suffisante pour être observée sur nos détecteurs (TCD). Ces résultats expliquent en partie l'absence de fixation de  $\text{N}_2$  sur les cathodes PCE E2 et PCE B2. En effet, l'abondance de formes d'azote utilisable a pu inhiber la fixation de  $\text{N}_2$  dans ces réacteurs. Pour la cathode des enrichissements ayant vu sa biomasse augmentée, soit PCE E1, entre 417 et 473 jours d'enrichissement, la méthode ARA nous montre une vitesse moyenne de  $38,0 \pm 4,6 \mu\text{mol}_{\text{C}_2\text{H}_4}/\text{L}/\text{j}$  soit  $12,7 \pm 1,6 \mu\text{mol}_N/\text{L}/\text{j}$ . De même que pour PCE B1, cette vitesse mesurée par la méthode ARA a pu être comparée avec la quantité d'azote calculée pour la biomasse. Une vitesse de  $30,2 \mu\text{mol}_N/\text{L}/\text{j}$  d'azote assimilé par la biomasse peut en être déduite. Pour  $\text{NH}_4^+$ , les vitesses calculées étaient de  $5,3 \pm 7,0 \mu\text{mol}_N/\text{L}/\text{j}$  et  $0,1 \pm 0,01 \mu\text{mol}_N/\text{L}/\text{j}$  respectivement. La quantité d'azote retrouvée était près de 3 fois supérieure à ce que prévoit la méthode ARA. Cette différence peut s'expliquer par les imprécisions inhérentes à la méthode ARA (Soper et al., 2021) (voir Annexe : Mesure de l'éthylène).

#### 2.4. Rendements faradiques

Au cours des enrichissements, nous avons vu que plusieurs produits de réduction avaient été retrouvés comme l'acétate  $\text{CH}_3\text{COO}^-$ , l'hydrogène  $\text{H}_2$  ou différentes formes de l'azote issues de la fixation de  $\text{N}_2$  ( $\text{NH}_4^+$ , biomasse). Nous avons donc ici calculé la part des électrons apportés aux systèmes qui se retrouve dans ces différents produits pour les comparer avec les enrichissements PCE sur les périodes entre 125 et 214 jours et 215 et 379 jours (Tableau 4-4).

Tableau 4-5 : Rendements faradiques des cathodes des enrichissements (PCE E) et des nouveaux réacteurs (PCE B). Les résultats correspondent à la période de 398 jours à 473 jours après le début des enrichissements (0 à 75 jours des nouvelles cathodes). Les quantités de bactéries des électrodes proviennent des mesures réalisées aux jours 417 et 473 des enrichissements (19 et 75 des nouvelles cathodes).

		398-473 jours			
		PCE E1	PCE E2	PCE B1	PCE B2
J A/m <sup>2</sup>	Moyenne	0,8±0,2	1,9±1,2	2,2±1,1	0,9±0,6
	Maximum	1,3	4,1	5,1	2,3
Acetate $\mu\text{mol}/\text{L.d}$	Moyenne	0	0	0	0

N $\mu\text{mol/L.d}$	N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	6,8±9,0	9,1±10,0	0,8±0,4	6,3±5,1
	N Masse sèche milieu	15,7±9,0	10,2±1,5	18,8±13,8	22,8±16,1
	N Biomasse cathode (16S/bact)	30,2	-6,8	4,0	NA
Biomasse bact/L.j	Cathode	1,7×10 <sup>10</sup>	-0,4×10 <sup>10</sup>	0,2×10 <sup>10</sup>	NA
CE %	CO <sub>2</sub> à Acetate	0	0	0	0
	H <sup>+</sup> à H <sub>2</sub>	-0,8±2,3	1,3±2,3	36,9±30,0	0,4±1,3
	Fixation de N <sub>2</sub>	9,1±6,0	3,0±2,1	1,8±0,8	6,8±3,8
	Croissance de biomasse	29,0±24,1	-4,6±4,0	2,2±0,3	NA
	Total	37,3±28,3	-0,3±4,3	40,9±30,7	7,3±2,7

#### 2.4.1. Rendements faradiques de production d'acétate CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>

Après avoir mesuré la biomasse, l'azote fixé et l'énergie apportée par la mesure de la densité de courant, la quantité d'électrons utilisée pour les différentes réactions de réduction suivies dans les chambres cathodiques a été calculée et est présentée dans le Tableau 4-5. En comparaison avec les enrichissements entre 131 et 214 jours puis de 215 jours à 380 jours (Tableau 4-4), l'acétate CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup> n'a pas été produit ici non plus. Cette observation renforce l'hypothèse de la perte des bactéries homoacétogènes dans la communauté microbienne après les coupures de courant.

#### 2.4.2. Rendements faradiques pour l'azote

En plus de la production d'acétate attendue dans les réacteurs, la fixation de N<sub>2</sub> a été permise par l'apport d'électrons aux cathodes, comme il avait été montré lors des enrichissements et en comparaison avec nPCE. En calculant la part d'électrons utilisée dans la fixation de ces différentes formes d'azote, des rendements faradiques compris entre 1,8±0,8% et 9,1±6,0% ont pu être estimés. Ces rendements, présentés dans le Tableau 4-5, étaient plus élevés que ceux calculés lors des enrichissements (avant 398 jours) avec un maximum qui avait été de 3,3% pour PCE 2 avant 214 jours (Tableau 4-4). Cette augmentation peut s'expliquer par la diminution de l'intensité de courant mesurée, se traduisant par une plus faible quantité d'électrons échangés.

#### 2.5. H<sub>2</sub> et réduction possible d'O<sub>2</sub>

Concernant la formation d'H<sub>2</sub>, presque plus d'H<sub>2</sub> n'a été retrouvé après 398 jours d'enrichissement. Cette absence peut s'expliquer par son utilisation dans d'autres réactions comme la réduction d'O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou H<sub>2</sub>O. Du H<sub>2</sub> en quantité importante n'a été retrouvé que dans le réacteur PCE B1 avec 36,9±30,0% des électrons utilisés pour la formation d'H<sub>2</sub>.

### *2.5.1. Formation de biomasse sur les cathodes et rendements totaux des réacteurs*

Enfin, la formation de biomasse a représenté une part non négligeable des électrons mesurés pour PCE E1 avec  $29 \pm 24,1\%$  des électrons et un rapport de 10:1 par rapport à PCE B1 avec  $2,2 \pm 0,3\%$ . Toutes ces réactions nous amènent donc à des rendements totaux de  $37,7 \pm 28,3\%$  et  $40,9 \pm 30,7\%$  pour les PCE E1 et PCE B1. Les autres réacteurs ayant connu des pertes de biomasse, les rendements ont été impactés avec des valeurs négatives pour la production de biomasse, ce qui rend difficile leur interprétation. Concernant les manques de près de 60% des électrons, observés pour PCE E1 et PCE B1, il a été supposé que ces électrons ont été utilisés pour la réduction d' $O_2$  à la cathode, ce qui participe à former des zones de microaérobiose et d'anaérobiose à la cathode. Il a été supposé également que la présence de bactéries sulfatoréductrices a pu participer à la perte des électrons utilisés dans la production d' $H_2S$  par la réduction des sulfates utilisés dans le milieu. Cependant, ce gaz n'a pas été retrouvé dans les mesures par CPG.

### *2.6. Communautés fixant $N_2$ sur les cathodes*

Les communautés des nouvelles cathodes PCE B1 et B2 ont été séquencées, tout comme les communautés des cathodes PCE E1 et PCE E2 à 417 et 473 jours d'enrichissement. Les communautés observées sont comparées avec les communautés retrouvées à différents moments des enrichissements pour discuter les interactions de ces nouvelles communautés et les différences qu'on peut avoir avec les autres moments de l'enrichissement. Les analyses statistiques faites par analyse en composantes principales (ACP) a été réalisée sur les communautés et est présentée en Figure 4-12

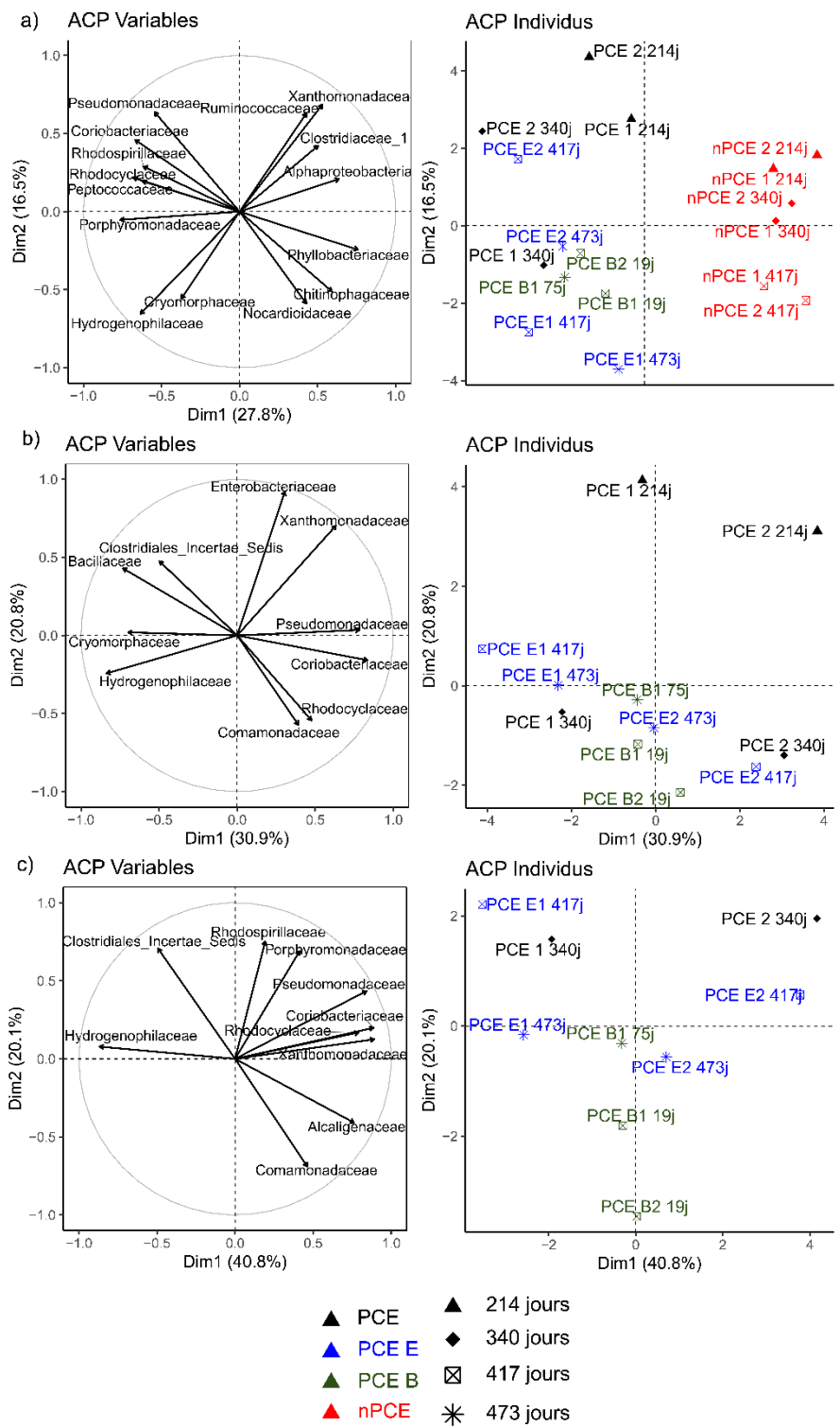


Figure 4-12 : Résultats des analyses en composantes principales (ACP) des communautés bactériennes sur les électrodes des enrichissements PCE, nPCE et des nouveaux réacteurs (PCE E et PCE B). Sont présentés dans la figure a) les résultats de l'ACP sur les communautés cathodiques à 214, 340, 417 et 473 jours des enrichissements (19 et 75 jours pour PCE B) pour les quatre types de réacteur (PCE, nPCE, PCE E et PCE B). En b) sont présentés les résultats de l'ACP sur les communautés cathodiques à 214, 340, 417 et 473 jours des enrichissements (19 et 75 jours pour PCE B) pour les trois types de réacteur polarisé (PCE, PCE E et PCE B). En c) sont présentés les résultats de l'ACP sur les communautés cathodiques à 340, 417 et 473 jours des enrichissements (19 et 75 jours pour PCE B) pour les trois types de réacteur polarisé (PCE, PCE E et PCE B). Les analyses ont été faites sur les dix OTU majoritaires de chaque communauté avant d'être ramené au niveau des familles



### 2.6.1. Comparaison des communautés en fonction du potentiel appliqué

Les analyses statistiques sur les communautés microbiennes observées sur les cathodes PCE E à 417 et 473 jours sont présentées sur la Figure 4-12 avec les communautés des nouvelles cathodes après inoculation (entre 19 et 75 jours de culture) et les communautés retrouvées sur les cathodes pendant les enrichissements PCE et nPCE. Les communautés cathodiques sont également présentées sous la forme d'un barplot dans la Figure 4-13 qui représente l'abondance relative de chaque famille bactérienne retrouvée. Il est retrouvé certaines des familles des enrichissements avec notamment les *Peptococcaceae*, les *Rhodospirillaceae* et les *Comamonadaceae*. Cette observation renforce les hypothèses sur l'importance de ces trois familles. Dans la première ACP présentée (Figure 4-12a), *Peptococcaceae* et *Rhodospirillaceae* suivent l'axe de dimension un qui représente plus de 27% d'explications des différences entre groupes. Trois groupes se dessinent avec les cathodes polarisées des enrichissements (PCE et PCE E) à gauche de l'axe central, les nouvelles cathodes (PCE B) au centre et les cathodes non polarisées (nPCE) à droite. Les familles des *Peptococcaceae* et des *Rhodospirillaceae* paraissent donc liées à la présence de cathode polarisée du fait de leur sens opposé aux cathodes nPCE sur la Figure 4-12a.

### 2.6.2. Discrimination par pré-enrichissement en PCE

La seconde ACP, présentée (Figure 4-12b), a été réalisée sur les communautés des cathodes polarisées. Les communautés observées à 214 jours d'enrichissement se sont particulièrement détachées dans le coin supérieur droit grâce à ce retrait des nPCE des analyses statistiques, ce qui correspond à un enrichissement des familles des *Enterobacteriaceae* et *Xanthomonadaceae*. Cette observation suggère que ces deux familles, déjà présentes dans les analyses des communautés par ACP présentées en Figure 4-6, sont liées aux communautés des PCE à 214 jours en particulier. L'hypothèse a été faite que les coupures de courant (à 230 et 260 jours) ont eu un impact sur une partie de la communauté et en particulier sur ces deux familles sont moins abondantes après 214 jours.

### 2.6.3. Différences entre PCE 1 et PCE 2 et avec PCE B

En plus de la différence des cathodes à 214 jours, la première dimension semble séparer les enrichissements en fonction du pré-enrichissement utilisé. Cette différence peut être due à des variations sur les familles sélectionnées par la procédure d'enrichissement, avec un rapprochement des deux communautés après 473 jours. De même pour la troisième ACP présentée (Figure 4-12c), la différence entre PCE E1 et PCE E2 peut se lire sur la première dimension avec un poids de 40,8%. A l'inverse, entre PCE B1 et PCE B2, ici très peu de

différences sur cet axe n'a été observée. Le second axe semble présenter des différences que l'on peut attribuer à la durée de culture. Il semble alors qu'après inoculation des réacteurs PCE B, les différences entre les communautés PCE E et PCE B se sont réduites après 75 jours de culture. Il en a été conclu que les communautés établies dans un premier temps sur les cathodes PCE B étaient en très grande majorité composées de bactéries planctoniques des enrichissements à 417 jours, avant de voir les bactéries sensibles à la présence de la cathode se développer en biofilm pour PCE B1 jusqu'à 473 jours mais pas pour PCE B2.

#### 2.6.4. Description des communautés

La Figure 4-13 montre les abondances relatives des communautés analysées dans les ACP de la Figure 4-12. Les *Enterobacteriaceae* n'étaient présentes que sur la cathode PCE 1 à 214 jours ce qui explique leur importance dans les ACP. Cependant, leur faible abondance laisse supposer que le rôle de cette famille dans cette communauté est resté minime. En revanche, pour les *Xanthomonadaceae*, cette famille était très présente à 214 jours avec 11,6% et 24,7% respectivement pour la cathode PCE E1 et la cathode PCE E2. Cependant, elle a fini par représenter moins de 5% des abondances relatives après 417 jours. Sa forte abondance sur les cathodes nPCE à 214 et 340 jours laisse supposer un métabolisme saprophyte permettant une croissance cryptique sur les cathodes nPCE et sur les cathodes PCE après les coupures (Oszust & Frac, 2020). Pour les communautés après 340 jours, plusieurs familles ont été retrouvées dont les *Peptococcaceae* (*Desulforamulus ruminis* ou *Desulfosporosinus* pour PCE B1 avec 25% *Desulforamulus* contre 15% *Desulfosporosinus* à 473 jours), les *Rhodocyclaceae* et les *Hydrogenophilaceae*. La première de ces familles est déjà à la base de nos hypothèses sur les interactions dans les biofilms à 214 jours. Pour les deux autres, la famille des *Rhodocyclaceae* était représentée en majorité par le genre *Azospira* pour PCE E2 (*Azospira sp. oryzae*, %Id=98,6%) et les genres *Methyloversatilis* et *Ferribacterium* pour les cathodes PCE B sont connues comme étant des bactéries hétérotrophes et dont la fixation de N<sub>2</sub> a été montré pour *Azospira* et *Methyloversatilis* (X. Zhou et al., 2018). La famille des *Hydrogenophilaceae* était majoritairement représenté par le genre *Thiobacillus* (*Thiobacillus thioparus*, %Id=100%, seul genre des *Hydrogenophilaceae* retrouvé) qui est un genre de bactéries autotrophes (ou mixotrophes) (Osman et al., 2021). Ce genre des *Thiobacillus* est connue pour posséder des bactéries oxydant des formes réduites du soufre comme H<sub>2</sub>S. Cette observation suggère des interactions possibles entre ces bactéries sulfur-oxydante et *Desulforamulus*, la bactérie sulfato-réductrice. Sur la Figure 4-13, il est à noter que ces trois familles se retrouvent bien établies au détriment des *Rhodospirillaceae* et des *Comamonadaceae* identifiées au cours des enrichissements sur les cathodes. Ce remplacement a pu participer à la perte de densité de courant et de croissance sur les

cathodes. De même pour la famille des *Chitinophagaceae* qui, comme la famille des *Xanthomonadaceae*, s'est retrouvée très présente sur les cathodes PCE E1 et PCE 1B après avoir été d'abord observée dans les communautés nPCE. Cette famille est connue comme bactérie oxydante de l'ammonium (L. Wu et al., 2019). Il a alors été supposé que leur présence en nPCE était due à l'abondance de  $\text{NH}_4^+$  après la mort d'une partie de la communauté. Cette biomasse a probablement été oxydée pour libérer l'azote sous forme assimilable par les bactéries ( $\text{NH}_4^+$ ). L'ammonium  $\text{NH}_4^+$  est devenu le donneur d'électrons pour les bactéries appartenant par exemple au genre *Hydrotalea* (*Chitinophagaceae*).

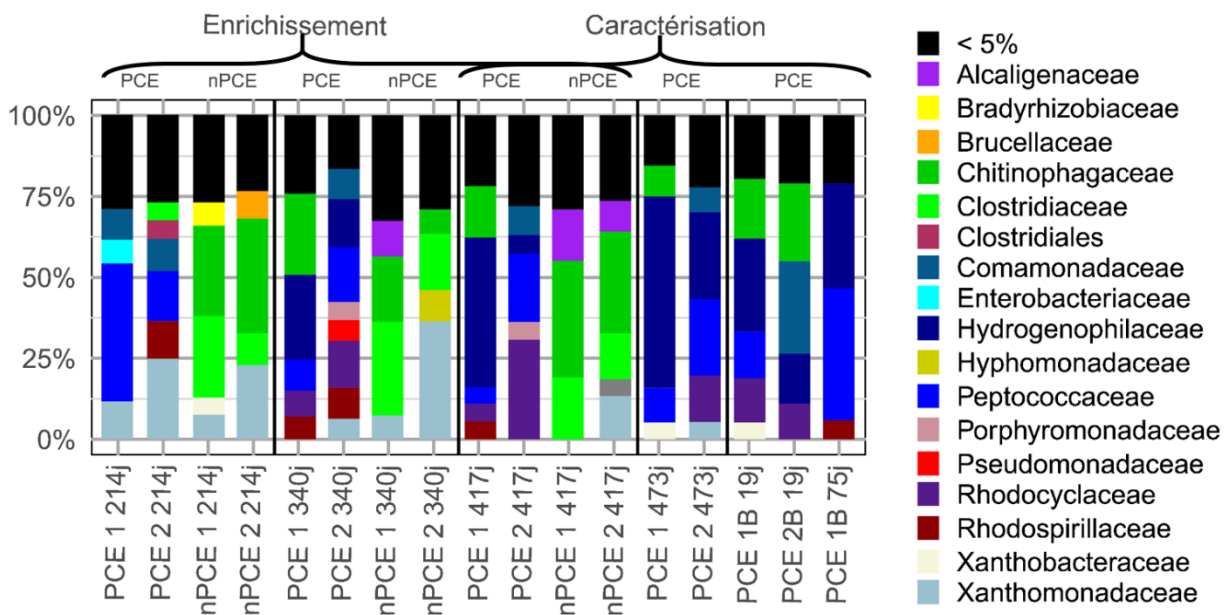


Figure 4-13 : Abondances relatives des familles bactériennes présentes sur les électrodes des enrichissements et sur les nouvelles cathodes. Les familles présentant à moins de 5% ont été retirées. Les abondances relatives sont calculées d'après le séquençage des gènes ADNr 16S.

### 2.6.5. Rôle possible du cycle du soufre

Ces résultats nous poussent à proposer de nouvelles hypothèses pour compléter les observations au cours des enrichissements. Notamment, il a été vu que le cycle du soufre avait pu servir pour des échanges entre bactéries sulfatoréductrices et sulfur-oxydantes. Cependant, les métabolismes des familles nouvellement développées, à savoir hétérotrophes (*Rhodocyclaceae*, *Chitinophagaceae*) et des autotrophes facultatives comme *Thiobacillus* et *Desulforamulus*, suggèrent des échanges également basé sur des formes de carbone organique. Ces résultats ont permis de faire évoluer le modèle de fonctionnement comme le montre la Figure 4-14.

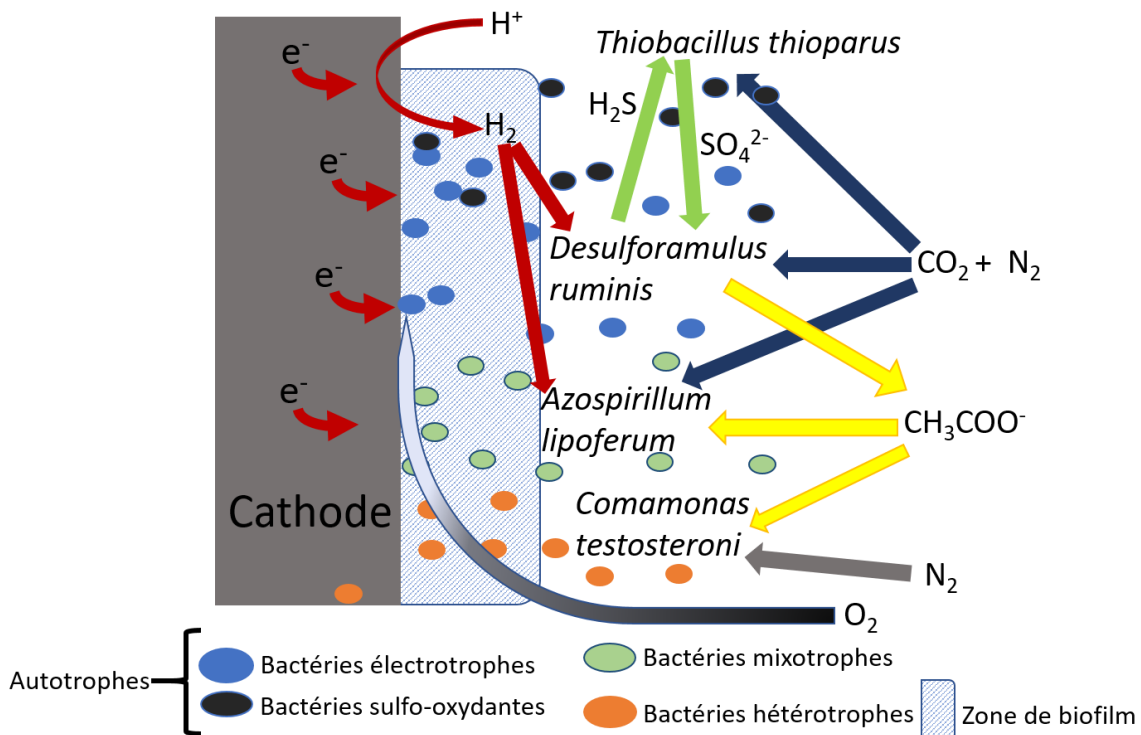


Figure 4-14 : Nouvelles hypothèses de fonctionnement des cathodes de fixation de  $N_2$ . Les espèces indiquées ici sont utilisées comme exemples des différents types métaboliques impliqués d'après nos observations et hypothèse à 214 jours d'enrichissements et à 473 jours.

### 3. CONCLUSION

Dans ce chapitre, il a été montré que, lors des enrichissements en présence des cathodes polarisées, de la biomasse s'est formée sans apport d'azote autre que le  $N_2$  et sans autre énergie que les cathodes (après arrêt en source de carbone organique). Sur cette période, la densité de courant absolue a augmenté jusqu'à une moyenne maximum de  $-10 \text{ A/m}^2$ . Une production d'acétate a également été observée jusqu'à  $421,6 \text{ } \mu\text{mol/L/j}$ , comparable avec les travaux de Mohanakrishna et al (2020) et une vitesse de  $415,8 \text{ } \mu\text{mol/L/j}$  d'acétate à partir d' $HCO_3^-$  en MES à un potentiel de  $-0,6 \text{ V vs SHE}$  (Mohanakrishna et al., 2020). Les densités de courant relevées étaient du même ordre avec une augmentation progressive jusqu'à environ  $-10 \text{ A/m}^2$  (Mohanakrishna et al., 2020). Cette réaction d'électrosynthèse était réalisée par une communauté microbienne enrichie pour les bactéries acétogènes. En comparaison, une production d'acide acétique a été observée jusqu'à  $594,2 \text{ } \mu\text{mol/L/j}$  par Yadav et al. (2022) avec utilisation de la fixation de  $N_2$  comme source d'azote dans un procédé d'électrosynthèse microbienne à un potentiel de  $-0,995 \text{ V vs SHE}$  (Yadav et al., 2022). Cette production dans de tels enrichissements indique la présence de bactéries acétogènes capables d'utiliser  $H_2$  ou la cathode comme donneur d'électrons pour la fixation de  $CO_2$ . Le couplage de la fixation de  $CO_2$  à la fixation de  $N_2$  a été proposé comme un moyen d'améliorer la fixation de  $N_2$  en système

bioélectrochimique microbien par Zhang et al. (2022) en supposant la fixation de CO<sub>2</sub> par le cycle de Calvin comme une source d'énergie pour les nitrogénases (L. Zhang et al., 2022). En effet, ils ont observé qu'en absence de CO<sub>2</sub>, la fixation de N<sub>2</sub> était réduite. Il a alors été supposé que cette fixation de CO<sub>2</sub> et ses produits (ici l'acétate) avaient eu un rôle primordial dans le développement des communautés microbiennes dans les enrichissements et pour la fixation de N<sub>2</sub> (L. Zhang et al., 2022). En effet, comme le présente la Figure 4-14, il a été supposé qu'une bactérie homoacétogène, ici de la famille *Peptococcaceae*, ait permis la production de l'acétate retrouvé dans les milieux. Cette famille est retrouvée dans des systèmes bioélectrochimiques (Zaybak et al., 2013) et certains genres sont capables de fixation de CO<sub>2</sub> avec H<sub>2</sub> comme donneur d'électrons (Aullo et al., 2013). Cette hypothèse est également basée sur la forte abondance de cette famille au moment où l'acétate était produit (Figure 4-7). Cependant, son maintien à la fin des enrichissements laisse supposer que d'autres bactéries disparues avec les coupures de courant aient été de meilleures candidates. La survie du genre *Desulforamulus*, malgré la diminution de la présence d'acétate, montre néanmoins qu'elle a bien été capable d'utiliser la cathode comme source d'énergie et qu'elle pouvait fixer le CO<sub>2</sub>. On retrouve néanmoins ce genre sur les nouvelles cathodes après inoculation depuis les milieux, ce qui peut participer aux hypothèses sur cette souche et qui montre son importance dans les communautés fixatrice de N<sub>2</sub> sur cathode. L'acétate comme source de carbone organique est supposé avoir été utilisée par les bactéries hétérotrophes de la communauté qui ont ainsi pu utiliser les faibles quantités d'O<sub>2</sub> comme accepteur d'électrons. C'est ce qui est supposé comme mécanisme pour les bactéries hétérotrophes et mixotrophes comme *Comamonas* et *Azospirillum* à 214 jours d'enrichissement, quand la biomasse était la plus importante. On retrouve toujours des genres hétérotrophes sur les cathodes reconstruites après les enrichissements, ce qui peut suggérer que ce métabolisme participe au développement des communautés malgré l'absence de carbone organique mesuré, avec une possible utilisation de l'O<sub>2</sub> comme accepteur d'électrons. Cette utilisation d'O<sub>2</sub> a permis la diminution de sa concentration dans certaines zones riches en acétate, notamment à la cathode. Ces conditions anaérobies ont alors été favorables à l'acétogénèse pendant le début des enrichissements mais pas après 215 jours (Pan et al., 2021). Le développement de bactéries sulfur-oxydante en fin d'enrichissement et le métabolisme sulfato-réducteur de *Desulfotomaculum/Desulforamulus* suggèrent une interaction avec le cycle du soufre pour des échanges de sources d'énergie et de pouvoir réducteur avec H<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>S.

## Chapitre 5 - Validation des hypothèses avec des cultures de souche pures

Dans le chapitre précédent, des hypothèses ont été formulées sur les interactions pouvant avoir lieu dans les communautés microbiennes enrichies sur biocathodes ou dans les enrichissements avec apport d'H<sub>2</sub> exogène. Ainsi, des souches ont été choisies du fait de la présence de bactéries proches dans les séquençages des ADNr 16S des enrichissements, dont *Desulforamulus ruminis* (Peptococcaceae), *Azospirillum lipoferum* (Rhodospirillaceae), *Comamonas testosteroni* (Comamonadaceae) d'après les communautés des biocathodes PCE et *Xanthobacter autotrophicus* (Xanthobacteraceae) d'après les enrichissements H<sub>2</sub>E et les travaux de Liu et al. (2017) (Liu et al., 2017). Pour valider les différentes hypothèses (Figure 4-8), les sources d'énergie nécessaires à la croissance et la fixation de N<sub>2</sub> (H<sub>2</sub> ou acétate) ont dans un premier temps été étudiées. Dans un second temps, l'utilisation d'une cathode comme seule source d'énergie dans du milieu minéral a été étudiée pour *D. ruminis* et *X. autotrophicus*. L'un des objectifs étant la reconstruction d'un écosystème fixateur de N<sub>2</sub>, une coculture de *D. ruminis* et *A. lipoferum* a été testée pour valider les interactions suggérées entre les deux souches (O<sub>2</sub> comme accepteur d'électrons de *A. lipoferum* avec acétate en donneur et supposition de production d'acétate par *D. ruminis* à partir d'H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>). Enfin, des cultures avec des concentrations d'O<sub>2</sub> à moins de 1% et 3% des espaces de têtes (contre 5% pour les autres cultures) ont été étudiées pour valider notre hypothèse sur la présence d'O<sub>2</sub> inhibiteur de la croissance de *D. ruminis* sur les cathodes (bactéries anaérobies strictes).

### 1. CULTURE DE SOUCHES PURES SUR H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>

Les premières hypothèses évaluées ont été celles faites sur la capacité à utiliser le H<sub>2</sub> comme donneur d'électrons pour la croissance et la fixation de N<sub>2</sub> de chacune des souches utilisées. La première hypothèse, était notamment que *D. ruminis* et *X. autotrophicus* étaient toutes deux capables de pousser dans les conditions de culture utilisées avec H<sub>2</sub> et CO<sub>2</sub> comme seules sources d'énergie et de carbone. Pour *X. autotrophicus*, cette capacité a largement été décrite (Wiegel, 2005). Concernant *D. ruminis*, cette souche appartient à un genre bactérien où on retrouve des bactéries homoacétogènes comme *Desulfotomaculum giboniae* mais cette acétogénèse n'a pas été beaucoup étudié pour les autres espèces (Aullo et al., 2013). La fixation de N<sub>2</sub> a été mise en évidence pour l'espèce *Desulfotomaculum ruminis*, avec des vitesses de réduction de l'acétylène de l'ordre de 23 μmol<sub>C<sub>2</sub>H<sub>4</sub></sub>/L/j en présence de lactate (Postgate, 1970). On suppose que cette souche de *D. ruminis* est assez proche de la bactérie supposée responsable de la production d'acétate et de croissance autotrophe observée en

enrichissement avec H<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>E) et c'est pourquoi nous avons cherché à mettre en évidence ces capacités en culture de souche pure dans nos conditions avec H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>. Pour les autres souches sélectionnées, il a été préalablement supposé que *C. testosteroni* n'était pas capable d'utiliser le H<sub>2</sub> pour sa croissance et qu'aucune croissance ni fixation de N<sub>2</sub> ne seraient observées dans ce cas du fait de son métabolisme chimioorganotrophe (hétérotrophes) (Willems & Gillis, 2015). Concernant *A. lipoferum*, l'hypothèse était que cette bactérie pouvait fixer le N<sub>2</sub> avec le H<sub>2</sub> mais que sa croissance serait réduite en absence totale de carbone organique et d'azote et sans association avec d'autres bactéries pouvant réduire le CO<sub>2</sub> en molécules organiques utilisables (Okon et al., 1976).

### 1.1. Croissance sur H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>

Dans un premier temps, les quatre souches ont été étudiées avec uniquement du H<sub>2</sub> comme source d'énergie et du CO<sub>2</sub> comme source de carbone. Deux procédures ont été utilisées pour les cultures sur milieu minéral : la première (Méthodologie 1) avec des repiquages successifs en milieu minéral sur trois batchs (inoculation du premier batch à partir de culture en milieu riche puis repiquage des nouveaux batchs à partir des cultures en milieu minéral sans lavage) et la seconde (Méthodologie 2) sans repiquage successif sur trois batchs également en milieu minéral (inoculation des nouveaux batchs à partir de culture en milieu riche avec lavage pour l'élimination des traces de carbone organique). Ainsi, six batchs ont été utilisés (batch 1 à 3 pour la méthodologie 1 et batch 4 à 6 pour la méthodologie 2). Trois bouteilles (triplicats) ont été utilisées par souche. Pour le suivi de la croissance, la densité optique à 600nm a été associée à la quantification par qPCR des copies des gènes ADNr 16S et l'estimation en nombre de bactéries équivalent. La mesure de la fixation N<sub>2</sub> a été faite par la méthode ARA dans deux des trois bouteilles avec ajout d'acétylène après un jour de culture. Les mesures de densité optique et ARA sont faites tous les un à trois jours à l'exception du cinquième batch (batch 2 Méthodologie 2) qui a été utilisé pour le suivi de la croissance bactérienne uniquement.

#### 1.1.1. Méthodologie 1

Une première série de cultures en milieu minéral avec un apport d'H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> a été faite avec des repiquages successifs.

Comme indiqué dans la Figure 5-1, la mesure de densité optique à 600nm a été utilisée pour suivre la croissance. Au cours du premier batch, après repiquage depuis les milieux de culture conseillés pour chaque souche, des augmentations de densité optique ont été observées. *C. testosteroni*, *X. autotrophicus* et *A. lipoferum* ont présenté des augmentations significatives de leurs densités optiques (*t*-test, *P* < 0,05). Pour *D. ruminis* aucune modification significative

(*t*-test,  $P = 0,07$ ) n'a été observée entre l'inoculation et la fin du batch mais une décroissance significative a été mesurée entre le premier et dernier jour (*t*-test,  $P < 0,01$ ). À la suite de ce premier batch, de nouvelles bouteilles de milieu minéral stérile ont été inoculées avec les cultures du premier batch et la croissance des souches est présentée Figure 5-1b). Ce batch nous a montré des croissances significatives pour toutes les souches (*t*-test,  $P < 0,05$ ). Les niveaux étaient significativement plus faibles (*t*-test,  $P < 0,01$ ) que lors du premier batch indiquant une plus faible croissance que dans le batch 1. Ceci pourrait s'expliquer par l'inoculation depuis un milieu riche qui a pu être source de carbone organique pour la croissance du premier batch. Enfin, une troisième série en réacteurs batch a été réalisée. Des bouteilles de milieu minéral stérile ont été inoculées pour un batch plus long (35 jours) avec les cultures du second batch. Les résultats sont présentés en Figure 5-1c). À ce stade, les variations de densité optique observées pour *D. ruminis*, *X. autotrophicus*, *C. testosteroni* et *A. lipoferum* n'ont pas été significatives entre les premiers et derniers jours du batch ( $P > 0,05$ ). L'ensemble de ces résultats, laisse supposer que de la matière organique résiduelle issue des cultures initiales en milieu conseillé (riche) était encore présente. Cette source de matière organique aurait alors pu servir de source de carbone et d'énergie à nos cultures de souches pures.



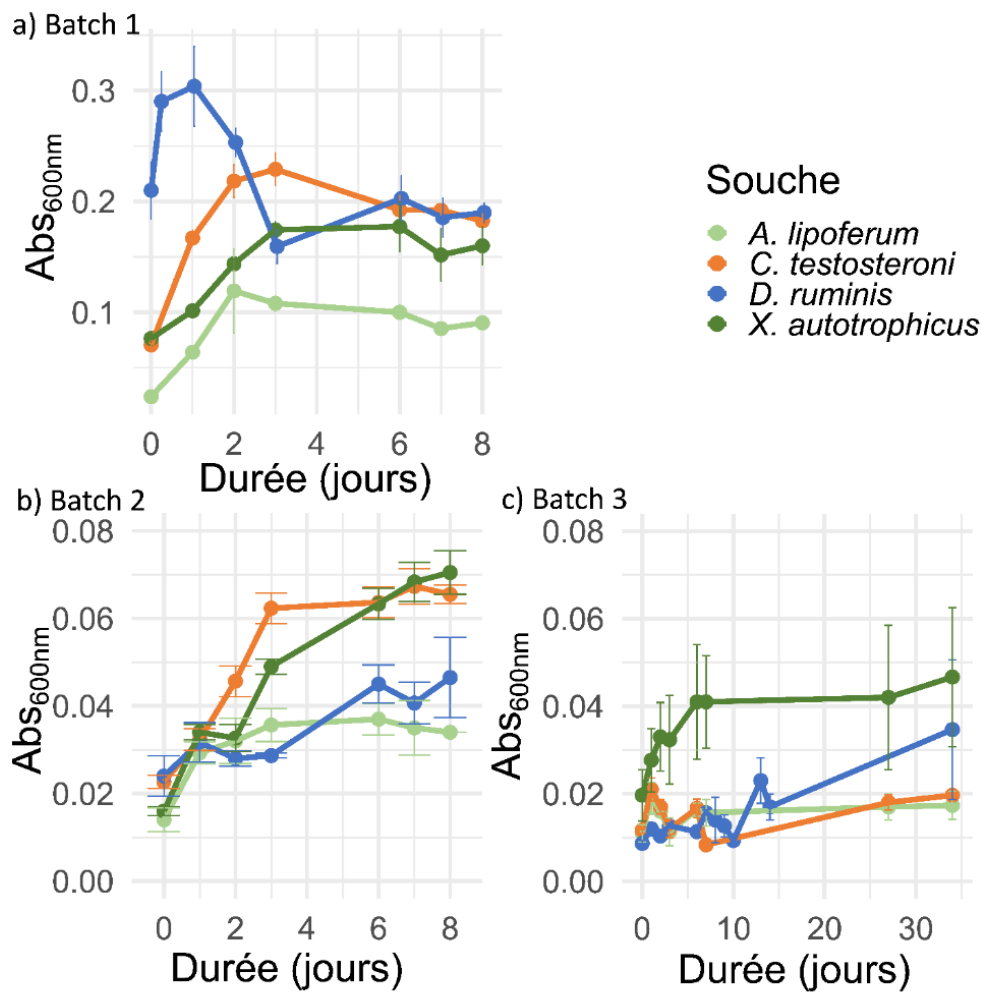


Figure 5-1 : Densité optique à 600nm mesurée pour les différentes souches pures utilisées sur milieu minéral en présence d' $H_2/CO_2$  au cours du a) premier, b) deuxième et c) troisième batch successifs. Les mesures pour *A. lipoferum*, *C. testosteroni*, *D. ruminis* et *X. autotrophicus* sont présentées en vert clair, orange, bleu et vert foncé respectivement. Les barres d'erreurs sont obtenues par calcul de l'écart-type des mesures sur les triplicats de culture pour chaque souche.

### 1.1.2. Méthodologie 2

À la suite de ces cultures en repiquages successifs, deux autres tests en mode batchs ont été réalisés (batch 4 et 5) dans des conditions similaires mais avec un lavage des cellules pour éliminer les traces de matière organique pour la première série de batchs. Les densités optiques mesurées pendant ces batchs sont présentées dans la Figure 5-2.

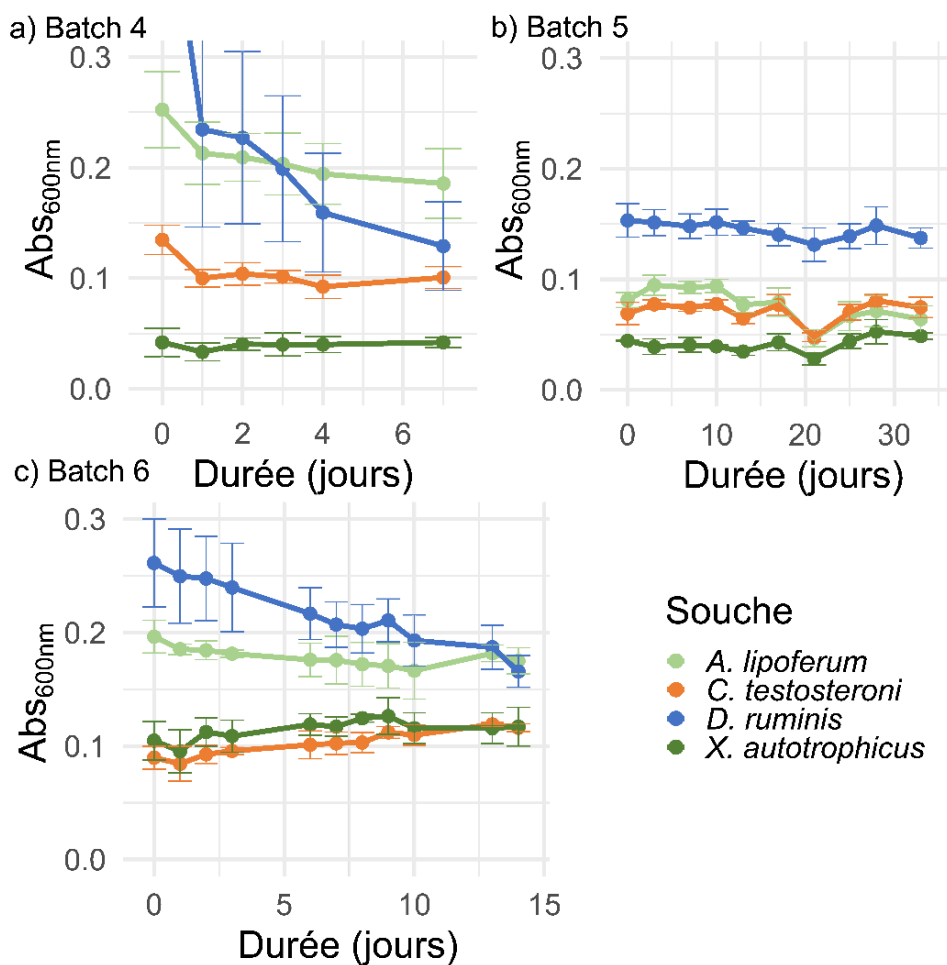


Figure 5-2: Densité optique à 600nm des différentes souches de bactéries pures lors de la culture en milieu minéral avec H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> après lavage des cellules. Sont présentés a) le premier batch "court", b) le second plus long de 35 jours et c) le troisième batch avec une concentration plus faible d'O<sub>2</sub> dans l'espace de tête ( $\leq 3\%$ ). Les mesures pour *A. lipoferum*, *C. testosteroni*, *D. ruminis* et *X. autotrophicus* sont présentées en vert clair, orange, bleu et vert foncé respectivement. Les barres d'erreurs sont obtenues par calcul de l'écart-type des mesures sur les triplicats de culture pour chaque souche.

Le premier batch, avec lavage des bactéries entre le milieu riche conseillé et le milieu minéral, a montré une décroissance significative de *D. ruminis* de  $0,49 \pm 0,13$  à  $0,13 \pm 0,04$  ( $t$ -test,  $P = 0,01$ ). Cette forte densité optique initiale est supposée en lien avec le milieu de culture riche qui se colore en noir pendant la culture. Ce phénomène était déjà visible sur la Figure 5-1a avec une densité optique initiale plus importante pour *D. ruminis* au premier batch. Le phénomène n'a pas été observé pour les batchs suivants en raison des repiquages depuis le milieu minéral et non ce milieu riche coloré. Dans la deuxième série de batch, malgré le lavage des bactéries, une partie des particules colorées s'est retrouvée dans le milieu minéral au moment de l'inoculation. Une diminution significative ( $t$ -test,  $P = 0,03$ ) de DO a été observée,

comme indiqué sur la Figure 5-2, pour *C. testosteroni* dont la densité optique est passée de  $0,13 \pm 0,01$  à  $0,10 \pm 0,01$  en sept jours.

Concernant les autres souches, *A. lipoferum* et *X. autotrophicus* n'ont pas montré de variations significatives (*t*-test,  $P=0,07$  *A. lipoferum* et  $P=1$  *X. autotrophicus*) pour le premier batch avec lavage. Au cours du second batch, qui a duré 35 jours, très peu de variations ont été mesurées (Figure 5-2b). Le dernier batch réalisé avec  $H_2/CO_2$  comme seules sources d'énergie et de carbone a eu un apport en  $O_2$  diminué ( $\approx 3\%$ ). Au cours de ce batch, les densités optiques de *C. testosteroni*, *A. lipoferum* et *X. autotrophicus* n'ont pas eu de variations significatives entre le début et la fin de la culture (*t*-test,  $P > 0,05$ ). *D. ruminis* a montré une perte significative de densité optique passant de  $0,26 \pm 0,04$  à  $0,17 \pm 0,01$  (*t*-test,  $P = 0,02$ ). Ces résultats semblent indiquer qu'aucune des souches n'avait eu de croissance sur  $H_2/CO_2$  seul sur le critère de la densité optique.

### 1.1.3. Croissance d'après la qPCR

Pour compléter ces observations, la quantification des copies d'ADNr 16S par qPCR a été réalisée et les résultats sont présentés dans la Figure 5-3. Cette quantification était faite pour le sixième batch où la concentration en  $O_2$  de l'espace de tête était de moins de 3%. Ce batch a été choisi car aucune trace de carbone organique ne s'y trouve mais que la fixation de  $N_2$  a pu être observée dans toutes les cultures (voir ci-dessous).

Concernant les cultures de *D. ruminis*, *X. autotrophicus* et de *A. lipoferum*, il n'y a pas eu de changements significatifs (*t*-test,  $P > 0,05$ ). Ce résultat, pour *X. autotrophicus*, est plutôt surprenant d'après les connaissances préalables sur *X. autotrophicus* et sa capacité à oxyder le  $H_2$ .

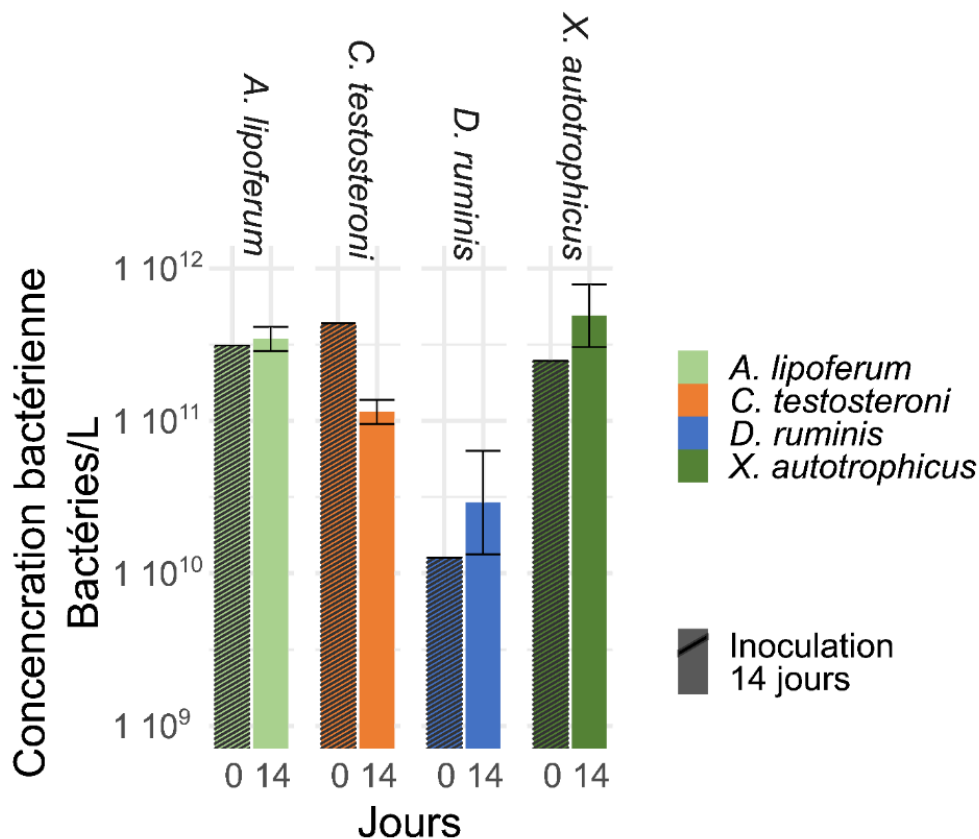


Figure 5-3 : Concentrations en bactérie dans les cultures de souches pures au cours du sixième batch avec diminution de la quantité d'O<sub>2</sub>. Elles correspondent aux concentrations en gène d'ADNr 16S obtenues par qPCR divisées par les nombres de copies du gène d'ADNr 16S dans les génomes selon la base de donnée rrndb 5.7. Les concentrations finales correspondent aux mesures réalisées après 14 jours de culture. Les barres d'erreurs sont calculées comme l'écart-type des triplicats des cultures de chaque souche.

Les observations préalables de densités optiques indiquent une absence de croissance pour chacune des souches utilisées. De même pour la mesure par qPCR qui n'a pas montré de variations significatives à l'exception de la culture de *C. testosteroni* qui a perdu en biomasse (lyse). Ainsi, la capacité de production d'acétate que nous avons supposé pour *D. ruminis* n'a pas été mis en évidence dans ces conditions de culture, avec une absence de croissance et donc de production de métabolites comme l'acétate. On peut supposer que cette souche a alors pu pousser sur l'acétate présent dans les enrichissements comme source initiale de carbone, mais on suppose également que des interactions avec d'autres souches aient pu participer au développement de cette souche.

D'après les résultats pour *X. autotrophicus*, dont la capacité de croissance autotrophe a déjà clairement été démontrée (Pedrosa et al., 1980), on suppose que le temps de culture n'a pas été suffisant pour observer une croissance significative. En effet, un temps de latence de 4 jours a pu être observé pendant l'enrichissement de bactéries oxydants le H<sub>2</sub> et fixant N<sub>2</sub> par Hu et al. (2020).

Dans la littérature, *A. lipoferum* a montré des croissances sur H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> seul mais avec un temps de doublement qui était cinq fois plus important en comparaison avec sa croissance sur une source de carbone organique (Tilak et al., 1986). De plus, une telle croissance autotrophe n'a été observée qu'en présence de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> et donc sans fixation de N<sub>2</sub> (Tilak et al., 1986). Cette espèce a également montré une croissance sur acétate (et d'autres sources de carbone, ie. malate) avec l'utilisation de N<sub>2</sub> comme source de N (Okon et al., 1976).

Enfin, pour *C. testosteroni*, une perte de biomasse a été mesurée avec une concentration initiale de 4,4×10<sup>11</sup> bactéries/L à une concentration finale de 1,2±0,2×10<sup>11</sup> bactéries/L après 14 jours. Cette décroissance significative (*t*-test, P < 0,01) va dans le sens d'une incapacité de croissance de *C. testosteroni* sans source de carbone organique. En effet, le genre *Comamonas* est connu comme une bactérie hétérotrophe (Willems & Gillis, 2015), l'absence de croissance de *C. testosteroni* sur H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> seul est donc cohérente avec la littérature (Willems & Gillis, 2015), et nos hypothèses (Figure 4-8). Il a été montré qu'elle pouvait utiliser l'acétate pour sa croissance (Willems & Gillis, 2015).

En comparaison avec la mesure de la densité optique, ces résultats indiquent une certaine incohérence entre les deux mesures, avec notamment une décroissance significative de *C. testosteroni* d'après la qPCR qui ne se retrouve pas sur les mesures de densité optique (P = 0,48). De même pour *D. ruminis* qui montre une décroissance significative (P = 0,02) de sa densité optique qui est en contradiction avec le résultat de la qPCR qui ne montre pas de variation significative (P = 0,2). Cette observation peut être causée par la coloration de certains milieux, notamment ceux inoculés par *D. ruminis*, susceptible de fausser la mesure de densité optique. Notamment, les mesures des densités optiques initiales de *D. ruminis* avaient un niveau très élevé par rapport aux autres souches pour les batchs 1, 4, 5 et 6. Ce niveau plus élevé s'explique par une coloration noire du milieu qui n'a pas pu être éliminée malgré les lavages avant transfert en milieu minéral. Cette coloration peut donc amener un biais sur la lecture de la densité optique par rapport à la quantification des copies d'ADNr 16S.

### 1.2. Fixation de N<sub>2</sub> sur H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> par des cultures de souches pures

Pour les cultures de souches pures, la mesure de fixation de N<sub>2</sub> par la méthode ARA a été réalisée en duplicats (deux bouteilles par souche). Des prélèvements ont été faits tous les un à trois jours et les vitesses de réaction ont été calculées entre ces points. La mesure d'éthylène a été réalisée à l'aide d'une CPG équipée d'un TCD (détecteur à conductivité thermique). En ce qui concerne la fixation de N<sub>2</sub> avec H<sub>2</sub> et CO<sub>2</sub> seul, les résultats de mesure de réduction de l'acétylène sont présentés dans la Figure 5-4.

### 1.2.1. Repiquage successif

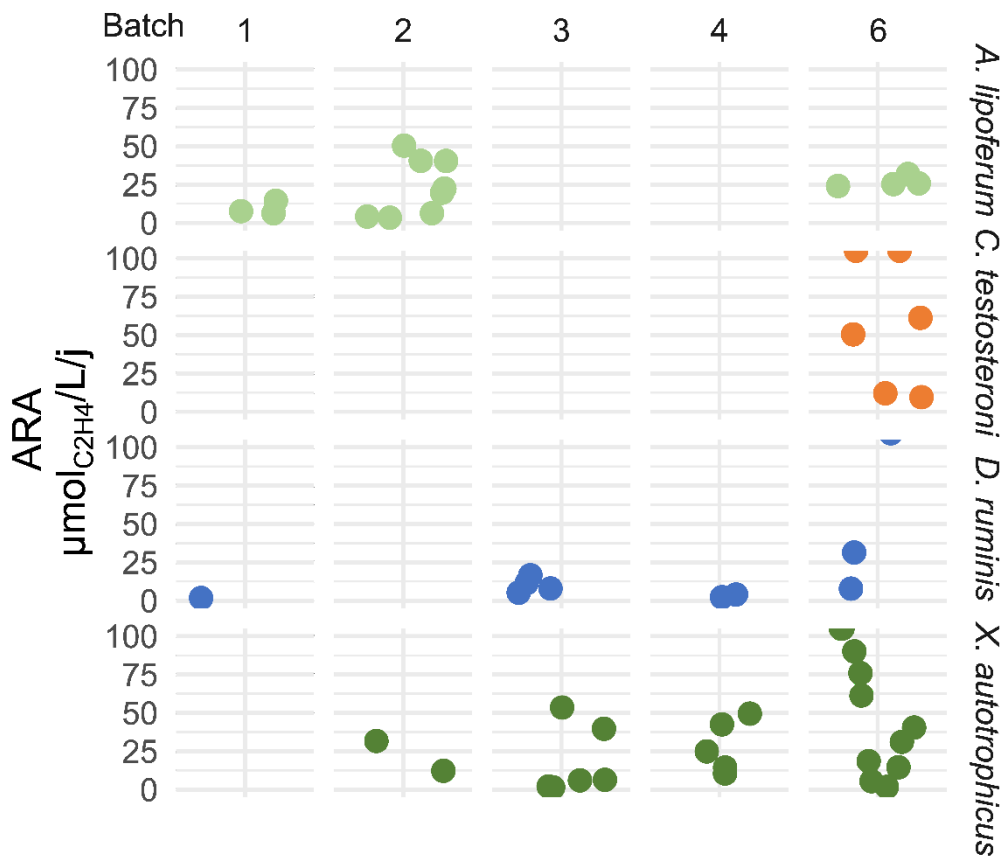


Figure 5-4 : Vitesses de réduction de l'acétylène en éthylène mesurées par la méthode ARA pour les différentes cultures de souches pures en milieu minéral avec H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> comme source d'énergie. Les cinq batches sont présentés avec les batches 1 à 3 correspondant aux cultures avec repiquages successifs et les batches 4 et 6 sont les batches avec lavage des cellules avant inoculation. Le batch 5 n'a pas eu d'utilisation de la méthode ARA. Seuls les résultats pour lesquels du C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> a été mesuré sont présentés. Les points représentent les vitesses de réduction de chaque duplicat mesurées à différents moments au cours du batch.

En ce qui concerne la fixation de N<sub>2</sub> avec H<sub>2</sub> et CO<sub>2</sub> seul, les résultats de mesure de réduction de l'acétylène sont présentés en Figure 5-4. La méthode ARA a montré une production d'éthylène après ajout d'acétylène dès le premier batch pour *A. lipoferum*. La moyenne des vitesses mesurées a atteint 6,9±1,0 μmol<sub>C<sub>2</sub>H<sub>4</sub></sub>/L/j en 6 jours au cours du premier batch puis 45,4±7,0 μmol<sub>C<sub>2</sub>H<sub>4</sub></sub>/L/j au second batch après 3 jours de mesure. La mesure ARA a eu lieu à partir de 24h après inoculation des bouteilles. Une présence de C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> a été observée dans les cultures de *D. ruminis* au cours du batch 1, mais cette observation n'a été faite que dans un seul des duplicats et ne s'est pas répétée sur le second batch. La fixation de N<sub>2</sub> semble avoir débuté dès le second batch pour *X. autotrophicus*. En effet, une vitesse moyenne de 18,1±21,4 μmol<sub>C<sub>2</sub>H<sub>4</sub></sub>/L/j a été observée. La moyenne des vitesses maximales mesurées a été de 46,5±9,8

$\mu\text{mol}_{\text{C}_2\text{H}_4}/\text{L}/\text{j}$  après 6 jours de culture pour les deux réplicats de *X. autotrophicus*. De même pour *D. ruminis*, la fixation de  $\text{N}_2$  est devenue visible à partir du troisième batch avec une vitesse de  $16,6 \mu\text{mol}_{\text{C}_2\text{H}_4}/\text{L}/\text{j}$  pour une bouteille après 14 jours de culture dans ce batch. Enfin, aucune activité de réduction n'a été observée au cours des trois premiers batchs pour *C. testosteroni*. Ces résultats vont dans le sens de nos observations sur la densité optique. En effet, des croissances significatives avaient été observées sur le premier batch et ce même en absence théorique de source d'énergie et de carbone utilisable par certaines de nos souches. Nous avons supposé que cette croissance, qui s'était atténuée dans les batchs suivants, était causée par la présence dans les milieux minéraux de carbone organique issu des cultures en milieu riche. Ainsi, ce carbone organique a pu servir de source d'énergie, notamment à *A. lipoferum* qui a montré une capacité de fixation de  $\text{N}_2$  uniquement sur les deux premiers batchs. On peut penser qu'il a fallu deux batchs successifs pour éliminer les traces de carbone organique apportées avec les repiquages successifs. De plus, des formes d'azote organique sont aussi supposées avoir été apportées. En effet, la fixation de  $\text{N}_2$  n'a presque pas eu lieu pour les deux premiers batchs pour les bactéries supposées fixer  $\text{N}_2$  et  $\text{CO}_2$  à partir d' $\text{H}_2$  que sont *X. autotrophicus*. Or les milieux de culture riches contenaient des sources d'azote assimilable (protéines pour *X. autotrophicus*) qui pourraient être inhibitrices de la fixation de  $\text{N}_2$ , à l'inverse de *A. lipoferum* qui n'a pas eu d'ajout d'azote assimilable en concentration suffisante pour inhiber la fixation de  $\text{N}_2$  après repiquage en milieu minéral.

### 1.2.2. Avec lavage des cultures

À la suite de ces batch successifs, la fixation de  $\text{N}_2$  a aussi été évaluée pour les cultures avec un lavage des cellules avant repiquage avec le suivi de la vitesse de réduction de l'acétylène. Ces résultats sont présentés sur la Figure 5-4. Au cours du premier batch avec lavage (batch 4), une fixation de  $\text{N}_2$  a pu être observée pour *X. autotrophicus* et dans un seul réplicat de *D. ruminis* avec des vitesses moyennes de  $37,2 \pm 17,4 \mu\text{mol}_{\text{C}_2\text{H}_4}/\text{L}/\text{j}$  et  $2,3 \mu\text{mol}_{\text{C}_2\text{H}_4}/\text{L}/\text{j}$  après 7 jours. Les autres souches n'ont pas montré de fixation de  $\text{N}_2$  sur ce batch d'une semaine. Le dernier batch dans ces conditions (batch 5) de concentration en  $\text{O}_2$  à 5% n'a pas vu d'utilisation d'éthylène pour ne pas impacter la croissance des bactéries et suivre une possible production de biomasse sur  $\text{H}_2/\text{CO}_2$  sur une période longue (plus de 30 jours). Lors du batch avec une réduction de l'apport en  $\text{O}_2$  (<3%), des vitesses moyennes de  $28,4 \pm 27,9 \mu\text{mol}_{\text{C}_2\text{H}_4}/\text{L}/\text{j}$  pour *X. autotrophicus*,  $55,4 \pm 57,7 \mu\text{mol}_{\text{C}_2\text{H}_4}/\text{L}/\text{j}$  pour *D. ruminis*,  $20,4 \pm 13,2 \mu\text{mol}_{\text{C}_2\text{H}_4}/\text{L}/\text{j}$  pour *A. lipoferum* et  $62,5 \pm 104,5 \mu\text{mol}_{\text{C}_2\text{H}_4}/\text{L}/\text{j}$  pour *C. testosteroni* ont été mesurées sur toute la durée du cycle. Ce résultat semble indiquer la fixation de  $\text{N}_2$  pour toutes les souches à partir d' $\text{H}_2$ . Cependant, pour *C. testosteroni* et *A. lipoferum*, l'absence de fixation au cours du troisième batch semblait indiquer une absence d'activité des nitrogénases. Ce résultat peut indiquer

que le niveau en O<sub>2</sub> en bouteille avec H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> choisi était trop élevé, entraînant une inactivation des nitrogénases de *A. lipoferum* et *C. testosteroni* au cours des premiers batchs (après épuisement des traces de carbones organiques). Ces résultats ont pu également être causés par une contamination survenue lors des prélèvements ou d'autres étapes des cultures, notamment en milieu riche, contamination par des bactéries pouvant fixer N<sub>2</sub> facultativement sur H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> ou du carbone organique.

Ces résultats sont tout de même cohérents avec les connaissances sur les sources d'énergie de *X. autotrophicus* et nos hypothèses pour *D. ruminis* pour la fixation de N<sub>2</sub> à partir d'H<sub>2</sub>. *D. ruminis* et *X. autotrophicus* ont bien montré la fixation de N<sub>2</sub> sur les batchs 3, 4 et 6 qui ne contenait ni source de N autre que N<sub>2</sub>, ni source d'énergie autre que H<sub>2</sub>.

En comparant ces observations avec les résultats de quantification en bactéries (Figure 5-3), la diminution de la concentration en biomasse dans les cultures de *C. testosteroni* pourrait expliquer en partie la fixation de N<sub>2</sub>. En effet, cette biomasse perdue par lyse cellulaire a pu servir de source de matière organique au reste de la communauté et de source d'énergie pour la fixation de N<sub>2</sub>. En absence de comparaison avec les autres batchs pour les quantifications bactériennes, ces conclusions restent assez spéculatives et il est difficile de conclure. En comparant les vitesses obtenues dans ces conditions avec celles des enrichissements (Chapitre 4 - ), les vitesses mesurées étaient du même ordre de grandeur de 30 μmol<sub>C<sub>2</sub>H<sub>4</sub></sub>/L/j. Les vitesses mesurées pour *D. ruminis* et *X. autotrophicus* semblaient donc de l'ordre de grandeur de ce qui pouvait être attendu. Précédemment, des mesures pour *D. ruminis* avec du lactate ont aussi montré des fixations de l'ordre de 23 μmol<sub>C<sub>2</sub>H<sub>4</sub></sub>/L/j (Postgate, 1970).

### 1.2.3. Suivi de la concentration en NH<sub>4</sub><sup>+</sup>

En plus du suivi de la réduction de l'acétylène, la libération de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> a été suivie dans les milieux des cultures en souche pure sur milieu minéral. Au cours des premiers batchs avec des repiquages successifs, les concentrations finales mesurées ont été les plus élevées pour *C. testosteroni* avec 4,4±1,2 mg/L N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> final contre 1,1±0,8 mg/L N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> pour les autres souches au premier batch et 3,7±0,1 mg/L N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> contre 1,6±1,6 mg/L N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> au second. Seul *X. autotrophicus* a montré une concentration de même ordre pour le second batch avec 3,5±0,2 mg/L N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Pour *C. testosteroni*, ces observations sont surprenantes au vu de l'absence de fixation de N<sub>2</sub> d'après la méthode ARA. On suppose donc que les conditions n'étant pas favorables à la croissance de *C. testosteroni*, celle-ci ait commencé à mourir et se lyser, entraînant une augmentation de la concentration en NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.

Lors des batchs réalisés après lavage des cultures, la vitesse la plus élevée a été obtenue pour *A. lipoferum* avec 0,6±0,4 mg<sub>N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup></sub>/L/j (2,9±0,4 mg/L N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) au cours du premier batch avec



lavage. Ces résultats semblent indiquer que les quantités de  $\text{NH}_4^+$  retrouvées en bouteille étaient faibles par rapport à celles estimées à partir des mesures d'activité par la méthode ARA. Ces résultats montrent que le  $\text{N}_2$  fixé n'est pas libéré sous forme  $\text{NH}_4^+$  après fixation et que celui-ci était probablement directement utilisé.

## 2. CULTURE DE SOUCHES PURES SUR ACETATE

### 2.1. Croissance sur acétate et $\text{H}_2/\text{CO}_2$

Après avoir testé les capacités de fixation de  $\text{N}_2$  et la croissance de toutes les souches avec  $\text{H}_2$  comme seule source d'énergie, ces mêmes capacités ont été évaluées après ajout d'acétate (0,5 g/L  $\text{Na-CH}_3\text{COO}$ ) comme source de carbone et d'énergie en plus d' $\text{H}_2/\text{CO}_2$  pour conserver les conditions des enrichissements. En effet, il a été supposé que l'acétate, produit à des vitesses moyennes de 150 et 420  $\mu\text{mol}_{\text{acétate}}/\text{L}/\text{j}$  par les communautés de PCE 1 et PCE 2 entre 125 et 214 jours d'enrichissement (Tableau 4-4), était à l'origine d'interactions dans les enrichissements en servant de source d'énergie à une partie de la communauté, et notamment *C. testosteroni* et *A. lipoferum* (Figure 4-8). Trois batchs sont présentés avec des durées de 7 à 14 jours, avec la même méthode de lavage des bactéries et de repiquage que la deuxième série de batchs sur  $\text{H}_2/\text{CO}_2$ .

#### 2.1.1. Densité optique

La densité optique à 600nm a été mesurée pour suivre la concentration en biomasse (Figure 5-5). Lors du premier batch avec acétate, (Figure 5-5a), des diminutions toutes significatives (*t*-test,  $P < 0,01$ ) des densités optiques de *A. lipoferum*, *C. testosteroni* et *D. ruminis* ont été mesurées et *X. autotrophicus* pas de variation pour *X. autotrophicus* (*t*-test,  $P = 0,4$ ).

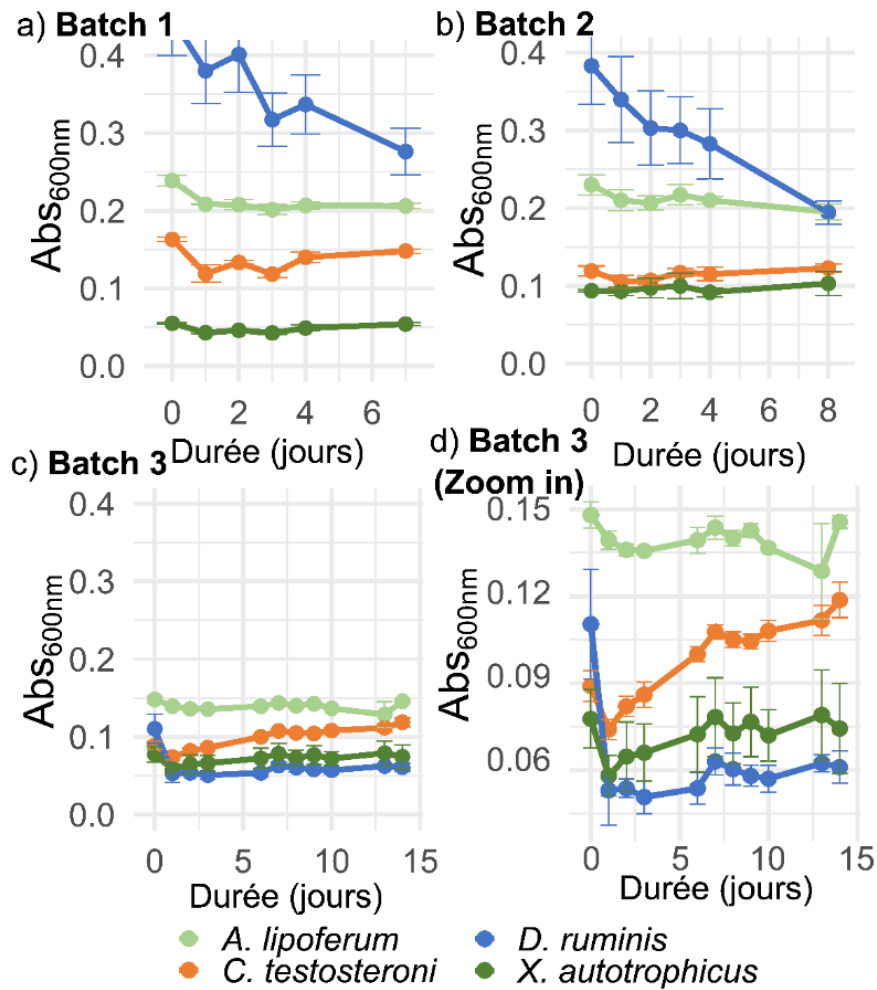


Figure 5-5 : Densité optique à 600nm des cultures de souches pures sur acétate : a) le premier batch de 7 jours, b) le second batch de 8 jours et c) et d) le troisième batch présenté avec deux échelles différentes pour l'axe des ordonnées. Les mesures pour *A. lipoferum*, *C. testosteroni*, *D. ruminis* et *X. autotrophicus* sont présentées en vert clair, orange, bleu et vert foncé respectivement. Les barres d'erreurs sont obtenues par calcul de l'écart-type des mesures sur les triplicats de culture pour chaque souche.

Pour le second batch, une diminution a été marquée pour *D. ruminis* dont la densité optique est passée de  $0,38 \pm 0,05$  à  $0,19 \pm 0,01$  ( $t$ -test,  $P < 0,01$ ). Les densités optiques des cultures de *X. autotrophicus* et *C. testosteroni* n'ont pas montré de variations significatives ( $t$ -test,  $P > 0,05$ ) (Figure 5-5b). Le troisième batch, plus long, a vu les densités optiques initiales réduites par une inoculation avec des dilutions des bactéries au cours des lavages (au dixième pour *D. ruminis* et au demi pour les autres souches). Ces dilutions utilisées pour égaliser les densités optiques initiales de toutes les souches expliquent le niveau plus bas visible dans la Figure 5-5c). Comme indiqué sur la Figure 5-5d) les cultures ont montré des augmentations de densité optique, pour *C. testosteroni* avec un passage de  $0,09 \pm 0,01$  à  $0,12 \pm 0,01$  en 14 jours (significatif,  $t$ -test,  $P < 0,01$ ). Pour les autres souches, aucune évolution significative n'a été

mesurée ( $t$ -test,  $P > 0,05$ ) entre l'inoculation et le dernier jour de culture à l'exception d'une décroissance significative pour *D. ruminis* ( $P = 0,04$ ) comme le présente la Figure 5-5d).

### 2.1.2. Concentration bactérienne

En plus de la mesure de la densité optique, la concentration en copies d'ADNr 16S a été utilisée pour le suivi de la concentration en biomasse. Cette mesure a été faite pour le troisième batch pour mesurer la différence de concentration entre l'inoculation et après 14 jours de culture avec acétate. Ces résultats sont présentés dans la Figure 5-6. Des concentrations de  $7,7 \pm 1,0 \times 10^7$  bactéries/L à l'inoculation et  $3,8 \pm 2,1 \times 10^{10}$  bactéries/L ont été observées pour les cultures de *D. ruminis* mais elles ne représentent pas une variation significative ( $t$ -test,  $P = 0,09$ ). Cette mesure est en contradiction avec la mesure de densité optique qui a montré une décroissance significative ( $t$ -test,  $P = 0,04$ ) entre l'inoculation et la fin de culture.

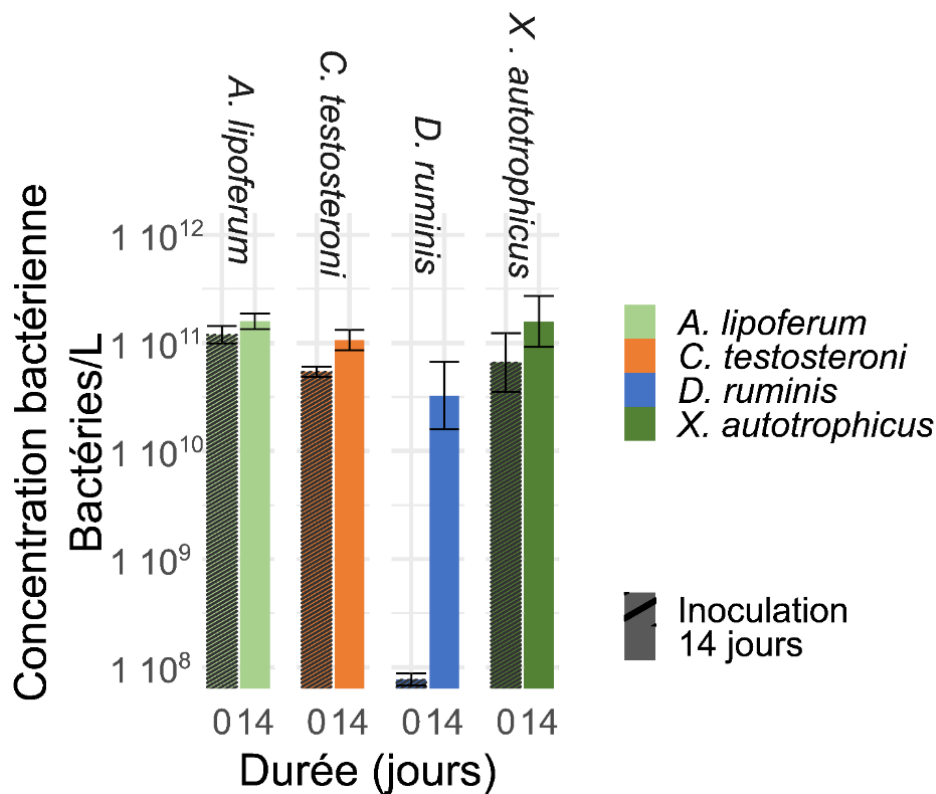


Figure 5-6 : Concentrations en bactéries dans les cultures pures au cours du troisième batch avec apport d'acétate. Elles correspondent aux concentrations en gène d'ADNr 16S obtenues par qPCR divisées par les nombres de copies du gène d'ADNr 16S dans les génomes selon la base de donnée rrndb 5.7. Les concentrations initiales correspondent aux mesures réalisées au moment de l'inoculation. Les concentrations finales correspondent aux mesures réalisées après 14 jours de culture. Les barres d'erreurs sont calculées comme l'écart-type des triplicats des cultures de chaque souche.

Pour *X. autotrophicus*, aucune croissance significative n'a été mesurée ( $t$ -test,  $P > 0,05$ ) par la qPCR comme ce qu'a montré la mesure de densité optique. Pour *A. lipoferum*, la croissance est significative ( $t$ -test,  $P = 0,02$ ) contrairement à ce qui a été montré par la mesure de la

densité optique. À la différence de la mesure de la concentration en bactéries des cultures sur H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> seul, *C. testosteroni* a vu sa biomasse augmenter de manière significative (*t*-test, P = 0,02). Cette augmentation est cohérente avec l'augmentation significative de densité optique observée pour cette souche. Ces observations supposent l'utilisation de l'acétate pour la croissance de *C. testosteroni* dans nos conditions, contrairement au mélange H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> seul. Un suivi des concentrations en acétate a été fait pour confirmer la consommation par *C. testosteroni* comme présenté ci-dessous. Cette utilisation de l'acétate pour sa croissance était déjà référencée (Willems & Gillis, 2015).

### 2.1.3. Utilisation de l'acétate

Ces résultats semblent indiquer une consommation d'acétate comme seule source de carbone et d'énergie pour la croissance de *C. testosteroni* mais pas pour les autres souches.

Les variations de concentration en acétate dans les milieux des cultures des différents batchs ont été mesurées et sont présentés en Figure 5-7. On peut voir une consommation d'acétate pour toutes les souches. On a pu observer des diminutions significatives des concentrations en acétate pour toutes les souches au premier batch (*t*-test, P < 0,05). De même pour le second batch (*t*-test, P < 0,05). Enfin, au troisième batch, *C. testosteroni*, *X. autotrophicus* et *A. lipoferum* ont toutes trois eu des diminutions significatives de la concentration en acétate (*t*-test, P < 0,05). Ces résultats confirment l'utilisation d'acétate par toutes les souches. Cette consommation est particulièrement marquée dans les cultures de *C. testosteroni* où les vitesses de consommation ont été de 19,7±1,7 mg/L/j, 13,0±1,9 mg/L/j et 10,5±1,5 mg/L/j d'acétate pour chaque batch. En comparaison avec les observations de croissance, on peut confirmer l'utilisation de l'acétate par *C. testosteroni* et *A. lipoferum* qui ont toutes deux eu des croissances significatives (*t*-test, P < 0,05) d'après la qPCR avec des consommations significatives d'acétate (*t*-test, P < 0,05).

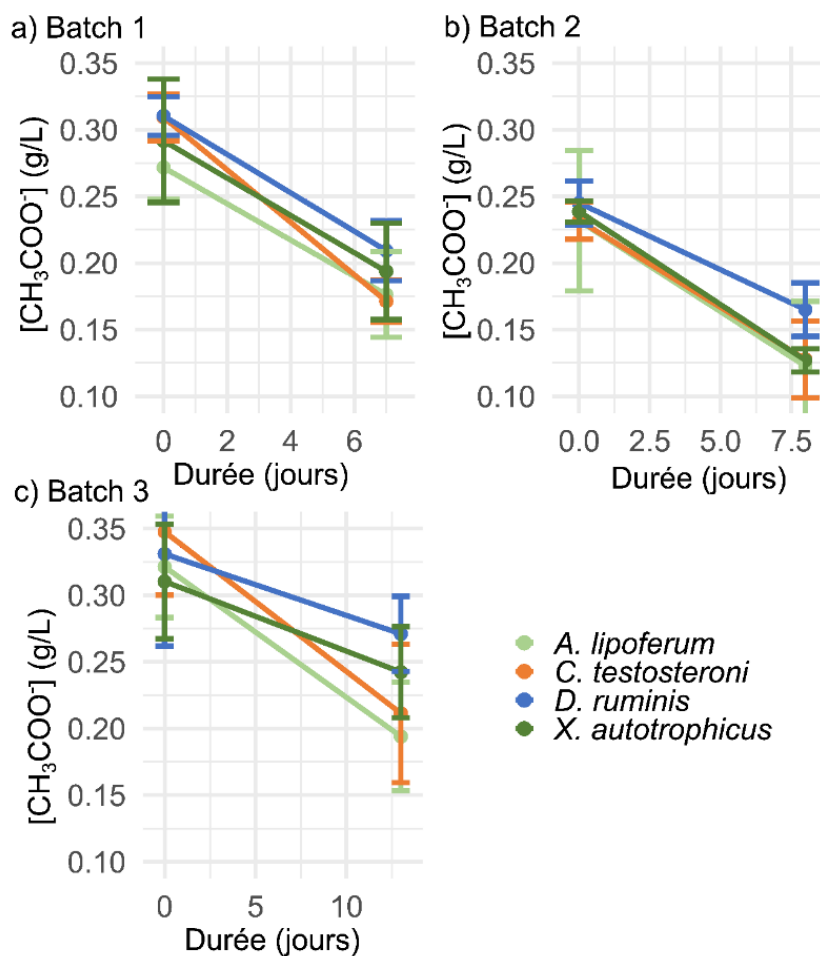


Figure 5-7 : Concentrations initiales et finales d'acétate dans les trois batchs de pour *A. lipoferum*, *C. testosteroni*, *D. ruminis* et *X. autotrophicus* : a) le premier batch de sept jours, b) le second batch de huit jours et c) le dernier batch de 14 jours. Les barres d'erreurs sont obtenues par calcul de l'écart-type des mesures sur les triplicats de culture pour chaque souche.

## 2.2. Fixation de N<sub>2</sub> sur acétate et H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>

En plus de la croissance bactérienne, la fixation de N<sub>2</sub> a également été mesurée pour les trois batchs avec ajout d'acétate comme source d'énergie et de carbone. La fixation de N<sub>2</sub> a été évaluée selon les mêmes modalités que pour les cultures sur H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>, à savoir avec deux bouteilles (sur trois) et des prélèvements tous les un à trois jours.

### 2.2.1. Méthode ARA

La fixation de N<sub>2</sub> a été mesurée par le suivi des vitesses de réduction de l'acétylène (ARA). Ces vitesses sont présentées en Figure 5-8.

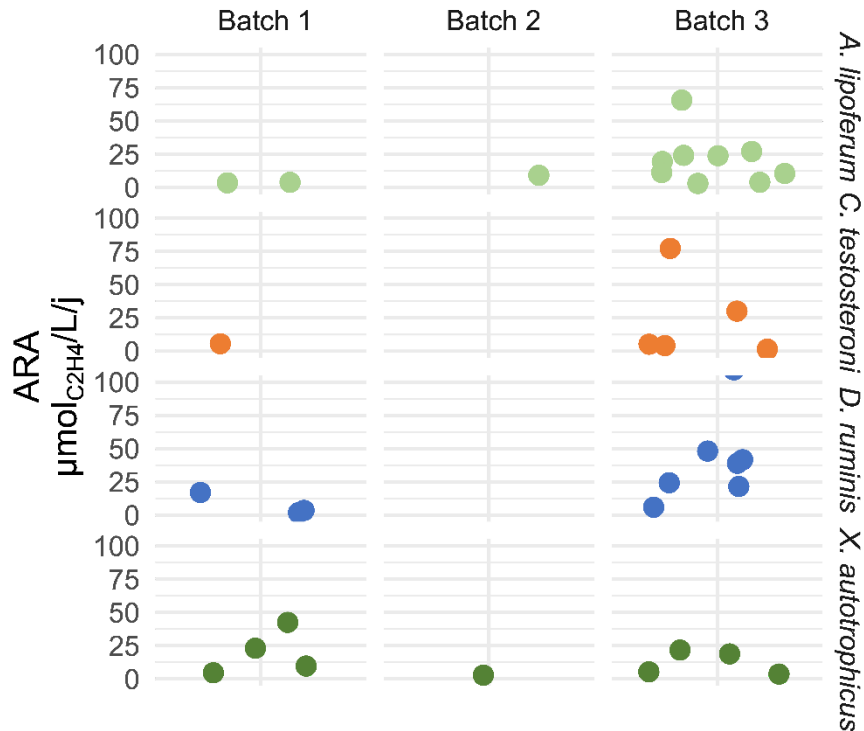


Figure 5-8 : Vitesses de réduction de l'acétylène en éthylène mesurées par la méthode ARA pour les différentes cultures pures en milieu minéral avec ajout de 0,5g/L Na-acétate comme source d'énergie. Seuls les résultats pour lesquels du C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> a été mesuré sont présentés. Les points représentent les vitesses de fixation de chaque duplicat à différents moments au cours du batch.

L'utilisation de l'éthylène au cours du premier batch en présence de 0,5 g/L de Na-acétate a montré une fixation de N<sub>2</sub> pour toutes les souches à des vitesses très variables. Au cours du premier batch, la fixation de N<sub>2</sub> a principalement été observée pour *X. autotrophicus* avec une vitesse moyenne de  $19,9 \pm 16,9 \mu\text{mol}_{\text{C}_2\text{H}_4}/\text{L}/\text{j}$  (max  $42,5 \mu\text{mol}_{\text{C}_2\text{H}_4}/\text{L}/\text{j}$ ). Pour les autres souches, cette moyenne des vitesses s'est élevée à  $2,3 \pm 2,3 \mu\text{mol}_{\text{C}_2\text{H}_4}/\text{L}/\text{j}$  (max  $3,8 \mu\text{mol}_{\text{C}_2\text{H}_4}/\text{L}/\text{j}$ ) pour *A. lipoferum*,  $7,4 \pm 8,3 \mu\text{mol}_{\text{C}_2\text{H}_4}/\text{L}/\text{j}$  (max  $17,0 \mu\text{mol}_{\text{C}_2\text{H}_4}/\text{L}/\text{j}$ ) pour *D. ruminis* et un point à  $5,7 \mu\text{mol}_{\text{C}_2\text{H}_4}/\text{L}/\text{j}$  pour *C. testosteroni*. Au second batch, seuls *A. lipoferum* et *X. autotrophicus* ont montré une fixation de N<sub>2</sub> correspondant à des vitesses de  $9,2 \mu\text{mol}_{\text{C}_2\text{H}_4}/\text{L}/\text{j}$  et  $2,8 \mu\text{mol}_{\text{C}_2\text{H}_4}/\text{L}/\text{j}$ . Une seule vitesse non nulle a été observée au cours de ce batch mais aucune explication évidente n'a pu être identifiée. Ceci a probablement pu être causé par un problème analytique de lecture avec la CPG, mais une absence de fixation de N<sub>2</sub> au cours de ce batch ne peut être exclu, par contamination du milieu par exemple. Lors du troisième batch, une activité de fixation de N<sub>2</sub> a été observée pour toutes les cultures avec des moyennes des vitesses de  $20,9 \pm 18,9 \mu\text{mol}_{\text{C}_2\text{H}_4}/\text{L}/\text{j}$  (max  $65,8 \mu\text{mol}_{\text{C}_2\text{H}_4}/\text{L}/\text{j}$ ),  $65,5 \pm 53,8 \mu\text{mol}_{\text{C}_2\text{H}_4}/\text{L}/\text{j}$  (max  $154,7 \mu\text{mol}_{\text{C}_2\text{H}_4}/\text{L}/\text{j}$ , pas visible sur figure),  $12,3 \pm 9,2 \mu\text{mol}_{\text{C}_2\text{H}_4}/\text{L}/\text{j}$  (max  $21,7 \mu\text{mol}_{\text{C}_2\text{H}_4}/\text{L}/\text{j}$ ) et  $23,7 \pm 32,1 \mu\text{mol}_{\text{C}_2\text{H}_4}/\text{L}/\text{j}$  (max  $77,2 \mu\text{mol}_{\text{C}_2\text{H}_4}/\text{L}/\text{j}$ ) respectivement pour *A. lipoferum*, *D. ruminis*, *X.*

*autotrophicus* et *C. testosteroni* dans des milieux avec acétate comme source de carbone et d'énergie. Ces résultats confirment la fixation de N<sub>2</sub> au cours du dernier batch. Les valeurs importantes des écarts types mesurées pourraient être liées à l'utilisation d'un TCD comme détecteur sur la CPG. En effet, la précision de ce type de détecteur pourrait être insuffisante pour suivre précisément les variations de l'éthylène très peu concentré dans nos cultures. La méthode d'utilisation du piège à soude, présentée en annexe (Piège à soude), pour retirer le CO<sub>2</sub> qui a un temps de rétention très proche de celui de l'éthylène (sur notre appareil) a pu aussi entraîner certaines pertes. Les vitesses élevées qui ont pu être observées comme maximums sont néanmoins cohérentes avec des cultures de bactéries diazotrophes avec des vitesses allant jusqu'à 1,4 mmol<sub>C<sub>2</sub>H<sub>4</sub></sub>/L/j mesurées sur acétate et extrait de levure (Okon et al., 1976).

### 2.2.2. Concentration en NH<sub>4</sub><sup>+</sup>

Pour compléter les mesures de fixation de N<sub>2</sub> par la méthode ARA, un suivi du NH<sub>4</sub><sup>+</sup> a été fait. Toutes les cultures ont montré des concentrations inférieures aux limites de quantification de la méthode utilisée (analyseur séquentiel Gallery+, N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 0,2mg/L). Ces résultats sont cohérents avec nos observations sur les vitesses en absence d'acétate et la croissance mesurée par qPCR dans les bouteilles avec ajout d'acétate. En effet, ces très faibles concentrations et les précédentes observations suggèrent que le N<sub>2</sub> fixé est très probablement directement assimilé dans la biomasse et que la libération de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> a lieu quand de la perte de biomasse par lyse est observée. Ainsi, en présence d'acétate comme source de carbone et d'énergie, aucun relargage de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> n'a été observé aux concentrations utilisées malgré le phénomène de fixation de N<sub>2</sub> confirmé par ARA car la biomasse a pu croître. Ces résultats laissent supposer que la mesure de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> comme seul indicateur de la fixation de N<sub>2</sub> n'est pas suffisant et que la comparaison avec la méthode ARA ou une quantification de la biomasse formée en absence d'autre forme d'azote que N<sub>2</sub> restent nécessaires.

## 3. COCULTURES DE SOUCHES PURES D'INTERETS

L'une des interactions les plus importantes dans notre modèle de fixation de N<sub>2</sub> sur une biocathode (Figure 4-8) se trouve dans l'échange d'acétate produit, on suppose par une bactérie proche de *D. ruminis* et son utilisation par des bactéries hétérotrophes ou mixotrophes comme *A. lipoferum*. Pour étudier cette hypothèse, et ce malgré le manque de production d'acétate en culture pure en bouteille de *D. ruminis*, le choix a été fait de mettre en culture les deux souches. En effet, d'autres éléments peuvent avoir été importants pour la croissance des deux souches pendant les enrichissements. Notamment, la capacité

d'oxydation d' $H_2$  par *A. lipoferum* avec  $O_2$  comme accepteur final d'électrons aurait pu avoir joué un rôle dans la formation de zones anaérobies où *D. ruminis* aurait pu se développer. Il est également probable que certaines molécules secrétées par ces bactéries (exemple : indole-3-acide acétique par *A. lipoferum*) aient participé au développement des souches en enrichissement, mais n'aient pas été disponibles lors des cultures en souches pures. Pour déterminer si d'autres éléments pouvaient participer à de meilleures croissances de biomasse lors de l'association de culture de souches pures, quatre bouteilles avec les souches ont été inoculées à des concentrations similaires, sur la base de la densité optique. Leur croissance sur milieu minéral a été suivie pendant 20 jours et comparée avec les cultures de souches pures. Une bouteille sans inoculation a été utilisée comme témoin pour le suivi de l'évolution des gaz dans l'espace de tête. Ces gaz ont été mesurés pour les cultures de souches pures mais n'avaient pas montré de différences répétables et/ou significative entre les différentes souches (données non présentées, *t*-test,  $P > 0,05$ ). La fixation de  $N_2$  de ces cocultures a également été testée par la méthode ARA après 20 jours.

### 3.1. Croissance sur $H_2/CO_2$ en coculture

#### 3.1.1. Densité optique et concentration en 16S

Le suivi de la croissance des bactéries en cocultures est présenté en Figure 5-9. Les cocultures ont montré une augmentation de biomasse après inoculation des bouteilles de milieu minérale, avec une augmentation de la densité optique moyenne mesurée à 600nm de  $0,07 \pm 0,00$  à  $0,1 \pm 0,01$  après 20 jours de culture. En parallèle de cette mesure de la densité optique, les concentrations en ADNr 16S ont été mesurées au moment de l'inoculation et après 16 et 20 jours. Une augmentation de  $1,6 \pm 0,3 \times 10^8$  copies ADNr 16S/mL après inoculation à  $1,0 \pm 0,0 \times 10^9$  copies ADNr16s/mL après 16 jours et  $1,2 \pm 0,1 \times 10^9$  copies ADNr16S/mL après 20 jours ont été observées. Ces augmentations proches du log10 sont significatives (*t*-test,  $P < 0,01$ ).



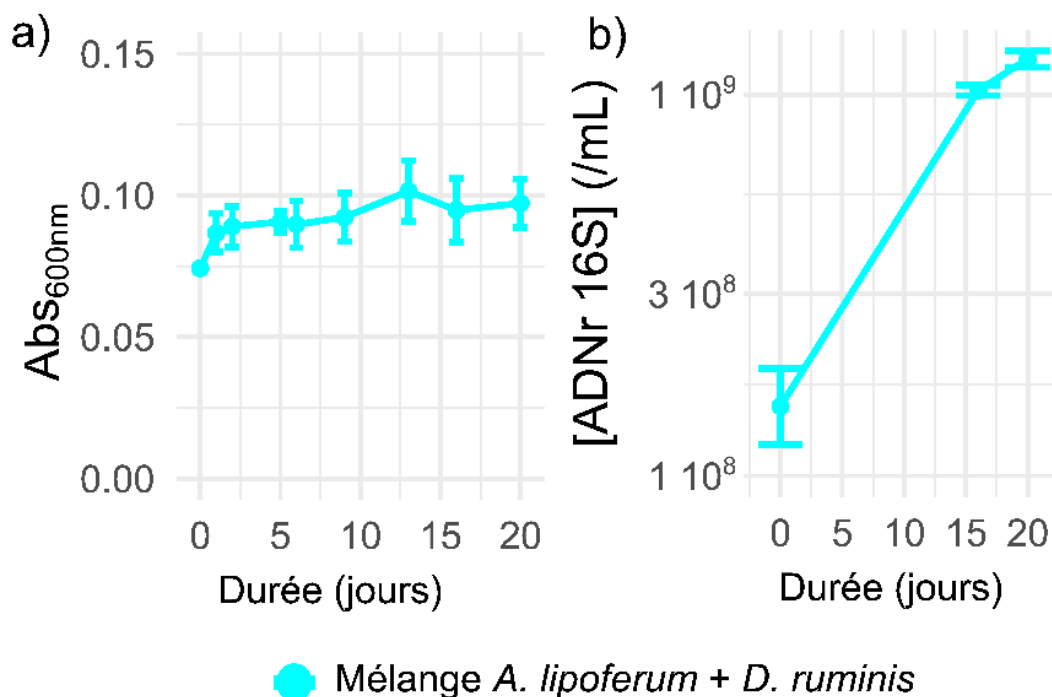


Figure 5-9 : Concentration bactérienne des cocultures de *A. lipoferum* et *D. ruminis* dans un milieu minéral avec H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> comme source d'énergie et de carbone : a) DO mesurée à 600nm au cours du temps, b) concentrations initiales et finales en copies du gène *ADNr 16S*. Pour la densité optique présentée, il s'agit de la moyenne de 4 réplicats de coculture. Pour les résultats de qPCR des gènes *ADNr 16S*, la concentration moyenne à t0 correspond à la moyenne de 4 réplicats. Deux réplicats sont utilisés à 15 jours et les 2 autres à 20 jours. Les barres d'erreurs correspondent à l'écart-type des mesures.

### 3.1.2. Consommation d'O<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>

Les quantités d'O<sub>2</sub> et d'H<sub>2</sub> dans les bouteilles d'après la mesure par CPG et calcul des quantités dissoutes sont présentés dans la Figure 5-10. La quantité moyenne d'O<sub>2</sub> a diminué de 0,25±0,05 mmol d'O<sub>2</sub> à l'inoculation à 0,07±0,02 mmol (*t*-test, *P* < 0,01) après 20 jours de culture. De même pour le H<sub>2</sub> avec une diminution de 1,86±0,09 mmol d'H<sub>2</sub> à 1,40±0,07 mmol après 20 jours de culture (*t*-test, *P* < 0,01). Ainsi, des pertes moyennes de 0,18 mmol d'O<sub>2</sub> et 0,46 mmol d'H<sub>2</sub> ont été obtenues en comparaison avec la bouteille non inoculée qui n'a pas montré de variation (cf Figure 5-10).

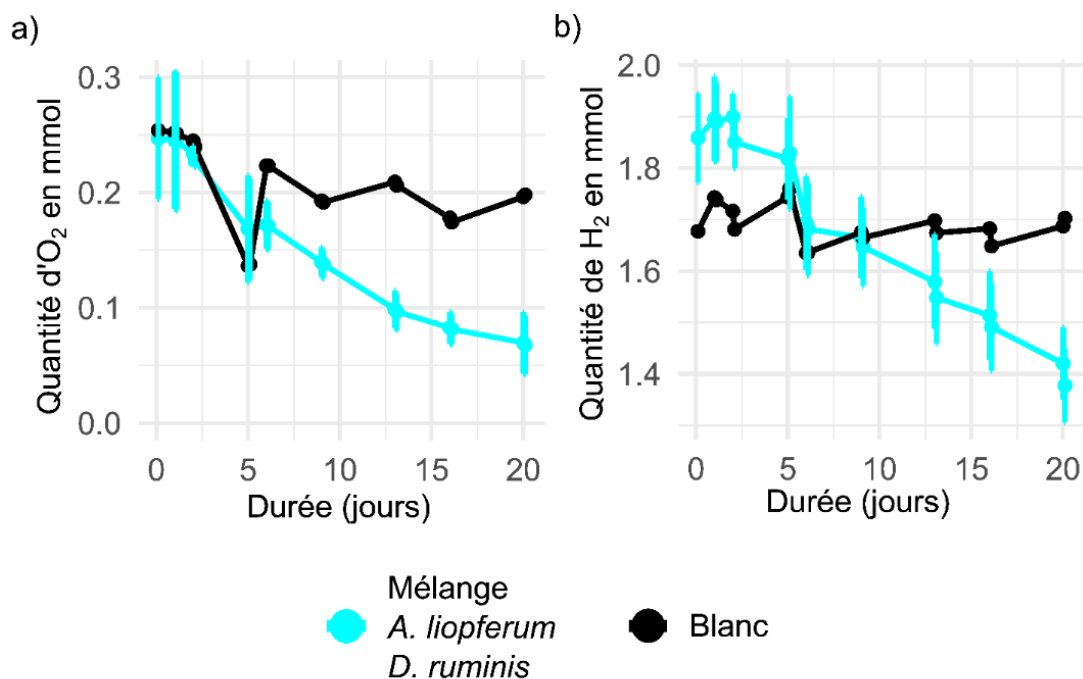


Figure 5-10 : Quantité de a) O<sub>2</sub> et b) H<sub>2</sub> d'après les mesures des concentrations des espaces de têtes des cultures de mélange d'*A. lipoferum* et *D. ruminis* (cyan) par rapport à une bouteille non inoculée appelée Blanc (point et ligne noir). Les deux points pour chaque prélèvements correspondent à la quantité avant et après les différents prélèvements (gaz et liquide) dans les bouteilles et les changements de température, pression et volume sont donc revu et pris en compte.

Ce rapport molaire de 2,5 H<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> consommés suggère un mécanisme d'oxydation du H<sub>2</sub>. Il est en effet très proche du rapport attendu pour la formation de biomasse par des bactéries oxydantes d'H<sub>2</sub> à partir de CO<sub>2</sub> d'après l'équation stœchiométrique de formation de biomasse aérobie à partir de CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> et N<sub>2</sub> ( $3O_2 + 8,4H_2 + CO_2 + 0,1N_2 \rightarrow CH_{1,8}O_{0,5}N_{0,2} + 7,5 H_2O$ , recalculé d'après (Mishra et al., 2020)). Cependant, cette équation nous apprend que cette quantité d'H<sub>2</sub> aurait permis la production d'une biomasse de l'ordre de 10<sup>13</sup> bactéries/L. Or si on convertit nos concentrations en ADNr 16S (Figure 5-9) en nombre de bactéries/L, en supposant des concentrations à hauteur de 50/50 de chaque souche, les concentrations estimées sont près de 100 fois inférieures (+1,2×10<sup>11</sup> bactéries/L en 16 jours et +1,5×10<sup>11</sup> bactéries/L). Cette différence pourrait s'expliquer par les approximations sur la concentration de chacune des bactéries utilisées pour cette coculture. On peut aussi supposer que d'autres réactions ont été utilisés avec le H<sub>2</sub> comme donneur d'électrons mais n'ont pas été suivi. Aucune accumulation d'acide gras volatil n'a été observée dans les milieux des bouteilles de cocultures.

La fixation de N<sub>2</sub> a également pu servir de réaction participant à la consommation d'H<sub>2</sub>. Cependant, aucune variation de N<sub>2</sub> n'a été mesurée dans les espaces de têtes des bouteilles en comparaison avec la bouteille contrôle (données non montrées).

### 3.1.3. Fixation de N<sub>2</sub>

En plus de l'augmentation de biomasse, la fixation de N<sub>2</sub> a été mise en évidence par la méthode ARA avec une quantification de l'acétylène C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> dans l'espace de tête des cocultures (Figure 5-11). Une activité de fixation de N<sub>2</sub> a ainsi pu être mesurée dans chacun des réplicats avec une moyenne des vitesses maximales de l'ordre de 39,6±4,1 μmol<sub>C<sub>2</sub>H<sub>4</sub></sub>/L/j. Ces vitesses confirment la fixation de N<sub>2</sub> dans le milieu minéral avec H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>.

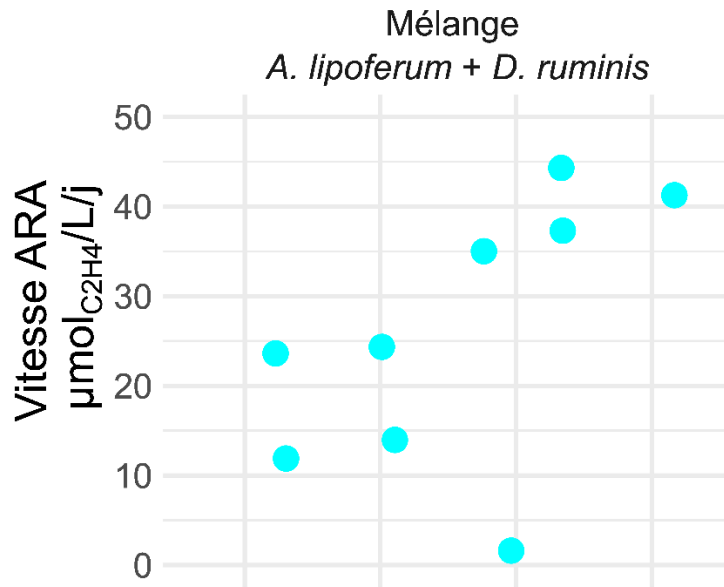


Figure 5-11 : Vitesse de production d'éthylène C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> par les cultures de mélange de *D. ruminis* et *A. lipoferum*. Les différents points correspondent aux réplicats des cultures. Vitesses de réduction de l'acétylène en éthylène mesurées par la méthode ARA pour les cultures de mélange de *D. ruminis* et *A. lipoferum* en milieu minéral avec H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> comme source d'énergie. Seuls les résultats pour lesquels de l'éthylène C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> a été mesuré sont présentés. Les points représentent les vitesses de fixation de chacun des 4 réplicats au cours de 4 mesures en 5 jours après 20 jours de culture.

L'activité de fixation de N<sub>2</sub> avait déjà été démontrée pour *D. ruminis* en culture seule et pure en milieu minéral avec H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> comme sources d'énergie et de carbone (Figure 5-8). En parallèle, pour *A. lipoferum*, une activité de fixation de N<sub>2</sub> avait été mise en évidence sur les deux premiers batchs issus de repiquages successifs (méthodologie 1) mais pas au troisième, ce qui suggère l'absence de source d'énergie utilisable au cours de ce batch. La fixation de N<sub>2</sub> n'a été observée que dans le batch avec diminution de l'apport en O<sub>2</sub> ce qui laissait suggérer une contamination. On avait alors supposé que *A. lipoferum* ne pouvait pas fixer N<sub>2</sub> dans nos conditions uniquement à partir d'H<sub>2</sub> bien que cette capacité ait été démontrée (Malik & Schlegel, 1981).

### 3.1.4. Hypothèses des interactions dans la coculture

Ces observations font supposer que la fixation de  $N_2$  était réalisée par les deux souches avec une utilisation et que les conditions de cocultures ont permis à *A. lipoferum* de fixer le  $N_2$  sur  $H_2$  comme source d'énergie. Les hypothèses formulées sur les interactions entre les deux bactéries sont présentées dans la Figure 5-12.

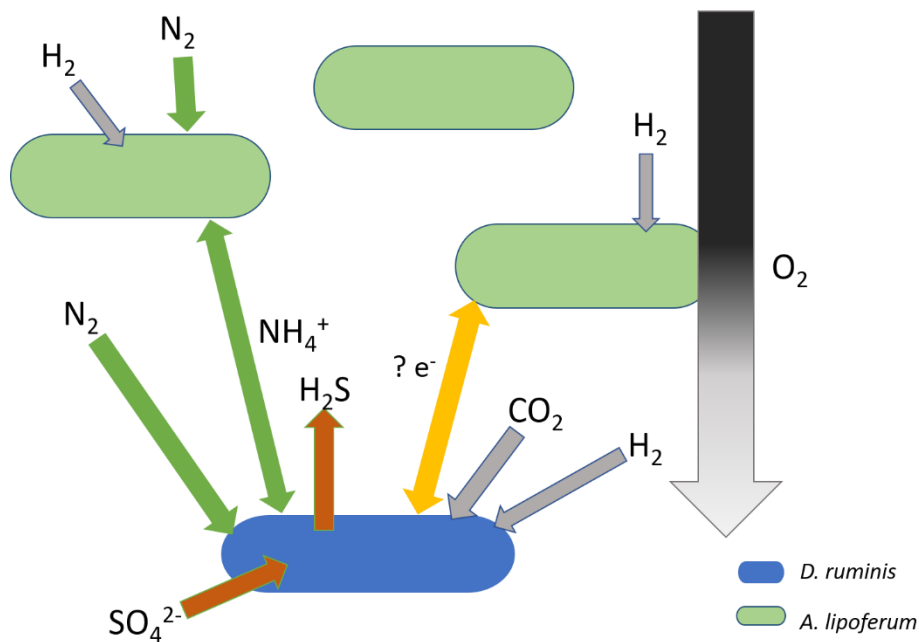


Figure 5-12 : Hypothèses sur les interactions entre *Azospirillum lipoferum* et *Desulforamulus ruminis* d'après nos observations au cours des enrichissements et des résultats des cultures pures. On suppose que *A. lipoferum*, connue comme capable d'oxyder  $H_2$ , utilise  $O_2$  comme accepteur final d'électron. Cette respiration dans les bouteilles non agitées provoque la formation de zones anoxiques par un gradient permettant le fonctionnement du métabolisme anaérobie de *D. ruminis*. Le sulfate ( $SO_4^{2-}$ ) pourrait être utilisé comme accepteur final d'électrons de *D. ruminis* avec  $H_2$  comme donneur d'électrons.

Afin de tester de nouvelles conditions, il a été supposé que l'interaction entre les deux souches qui a permis la croissance de biomasse sur  $H_2/CO_2$ , contrairement aux cultures seules, était basée sur la diminution de l'oxygène dans le milieu par sa réduction. En effet, *D. ruminis* est une bactérie anaérobie utilisant les sulfates comme accepteur d'électrons (Aullo et al., 2013), et *A. lipoferum* est une bactérie aérobie pouvant oxyder  $H_2$  (W. Zhang et al., 2021). Ce métabolisme de *A. lipoferum* aurait permis la formation de zones d'anaérobiose comme il avait été supposé pour les communautés issues des enrichissements (Figure 4-8). *D. ruminis* se développerait dans ces zones d'anaérobiose à proximité de bactéries aérobies oxydantes de l'hydrogène comme *A. lipoferum*. Ces zones se trouveraient donc en profondeur et seraient propices à la croissance de *D. ruminis* (Figure 5-12). Pour évaluer cette hypothèse, le choix a

été fait de mettre en place une culture de *D. ruminis* en anaérobiose stricte, en bouteille et en MEC. D'autres interactions sont supposées pour des échanges d'électrons entre les souches comme présenté en Figure 5-12 mais n'ont pas pu être identifiées.

### 3.2. Croissance de *D. ruminis* sans $O_2$

La croissance de *D. ruminis* en culture en bouteille sans  $O_2$  est présentée en Figure 5-13.

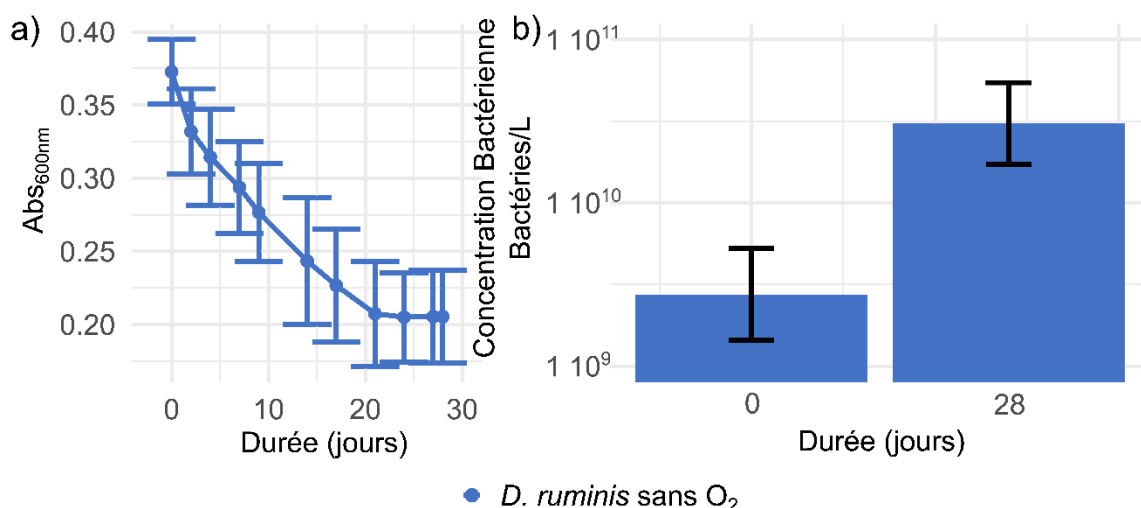


Figure 5-13 : Concentration bactérienne mesurée par la densité optique à 600nm et la mesure de la concentration bactérienne dans les bouteilles de culture de *D. ruminis* sans  $O_2$ . Trois réplicats sont utilisés pour chaque point présenté. a) Densité optique à 600nm mesurée pour cultures de *D. ruminis* pures utilisées sur milieu minéral en présence d' $H_2/CO_2$  avec retrait d' $O_2$  et b) Concentrations en bactérie dans les cultures de *D. ruminis* pures au cours du batch sur milieu minéral avec retrait d' $O_2$ . Elles correspondent aux concentrations en gène d'ADNr 16S obtenues par qPCR divisées par les nombres de copies du gène d'ADNr 16S dans les génomes selon la base de donnée *rrndb* 5.7. Les concentrations initiales correspondent aux mesures réalisées au moment de l'inoculation. Les concentrations finales correspondent aux mesures réalisées après 28 jours de culture. Les barres d'erreurs sont calculées comme l'écart-type des triplicats des cultures de chaque souche. Les barres d'erreurs sont obtenues par calcul de l'écart-type des mesures sur les triplicats de culture.

Pour ce test en mode batch de la souche *D. ruminis*, la quantité d' $O_2$  des bouteilles était de moins de 0,02 mmol en moyenne (<1% de l'espace de tête). La croissance des souches de *D. ruminis* a été suivie par la lecture de la densité optique à 600nm présentée Figure 5-13a. Une décroissance de la densité optique a été observée de  $0,37 \pm 0,02$  à  $0,21 \pm 0,03$  en 27 jours (*t*-test significatif,  $P < 0,01$ ). La quantité de bactéries/L a été estimée depuis la qPCR des copies d'ADNr 16S des cultures et l'utilisation d'un ratio de 5 copies d'ADNr 16S par génome de *D. ruminis* d'après la base de donnée *rrndb* 5-7 pantaxa. Les variations visibles sur la Figure 5-13b, ne sont pas significatives (*t*-test,  $P = 0,08$ ).

Comme vu pour les souches cultivées sur H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> en souche pure, le milieu riche de *D. ruminis* a apporté une coloration qui a pu biaiser la mesure de la densité optique. Pour rappel, la concentration bactérienne en culture de *D. ruminis* sur H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> n'avait pas montré de variations significatives (P = 0,2) mais la densité optique avait montré une baisse significative (P = 0,02). On retrouve les mêmes observations ici avec la culture de *D. ruminis* sans O<sub>2</sub> ce qui indique que ce n'est pas sa présence qui a eu un impact sur la croissance de *D. ruminis*. Il en a été conclu que cette souche n'était pas capable de croissance autotrophe et donc de la production d'acétate contrairement à nos premières hypothèses. On suppose donc que ce serait une autre souche bactérienne comme celles appartenant à la famille des *Clostridiaceae* qui serait responsable de la production d'acétate. Cette famille était minoritaire dans les enrichissements mais elle possède plusieurs genres avec des espèces autotrophes, comme *Clostridium ljungdahlii* pouvant produire de l'acétate (Cotter et al., 2009). Une autre espèce des genres *Desulforamulus/Desulfotomaculum* pourrait aussi être plus proche de la souche retrouvée dans les enrichissements qui avait été identifiée uniquement sur un fragment d'ADNr 16S. On peut aussi supposer, au vu des travaux présentant des membres de la famille des *Peptococcaceae* sur des cathodes, que l'utilisation d'une cathode comme seule source d'énergie par des mécanismes non explorés pour cette souche reste à étudier pour vérifier l'hypothèse faite sur les échanges d'électrons entre *D. ruminis* et la cathode. On a en effet retrouvé une bactérie proche de cette souche en abondance sur les cathodes de nos enrichissements et on suppose donc que celle-ci avait des interactions de transfert d'électrons avec la cathode.

#### 4. CULTURES DES SOUCHES PURES EN MEC

En parallèle des cultures pures en bouteilles, des cultures en compartiment cathodique de cellules d'électrolyse microbienne (MEC) ont été réalisées pour étudier les interactions entre certaines souches et une électrode polarisée au même potentiel que les cathodes de nos enrichissements (-0,94V vs SCE). Deux souches ont été choisies : *Xanthobacter autotrophicus* et *Desulforamulus ruminis*. *X. autotrophicus* a été sélectionnée pour une culture en MEC pour évaluer si la production d'H<sub>2</sub> à la cathode serait suffisante pour répondre aux besoins en énergie de *X. autotrophicus* dans les conditions étudiées. Cette souche a déjà été utilisée dans les travaux de Liu et al. (2017) mais un catalyseur favorisant la formation d'H<sub>2</sub> avait été utilisé (Liu et al., 2017). *D. ruminis* a également été choisie d'après le modèle d'interaction proposé entre cette bactérie et l'électrode, avec des échanges directs supposés, comme précédemment observés chez plusieurs membres de la famille des *Peptococcaceae* (Zaybak et al., 2013). La production d'acétate n'ayant pas été observée en bouteille, il a été envisagé

de tester sa possible production en MEC avec une réduction d'O<sub>2</sub> à la cathode comme proposé dans les enrichissements pour permettre une anaérobiose autour de la cathode. Les souches ont été cultivées en MEC de tailles réduites. Deux batchs ont été réalisés en présence d'O<sub>2</sub> pour chacune des souches et un batch supplémentaire de *D. ruminis* a été réalisé sans O<sub>2</sub>. Deux réplicats ont été utilisés pour chaque souche sauf pour le batch de *D. ruminis* sans O<sub>2</sub> pour lequel un seul réacteur a été utilisé (perte du duplicat en cours de batch). La production d'H<sub>2</sub> s'est avérée être non détectable dans nos conditions en comparaison à ce qui avait été observé avec les cathodes des enrichissements PCE (voir Fixation de N<sub>2</sub> dans une biocathode). Cette différence peut s'expliquer par le biofilm des enrichissements qui aurait participé à la production d'H<sub>2</sub> (Rozendal et al., 2008) et qui a eu le temps de se développer avec un apport de carbone organique avant d'utiliser le CO<sub>2</sub> comme seule source de carbone (Fixation de N<sub>2</sub> dans une biocathode).

#### 4.1. Performances électrochimiques

##### 4.1.1. Densités de courant

Les mesures de densités de courant pour les différents batchs en MEC des cultures de souches pures sont présentées en Figure 5-14.

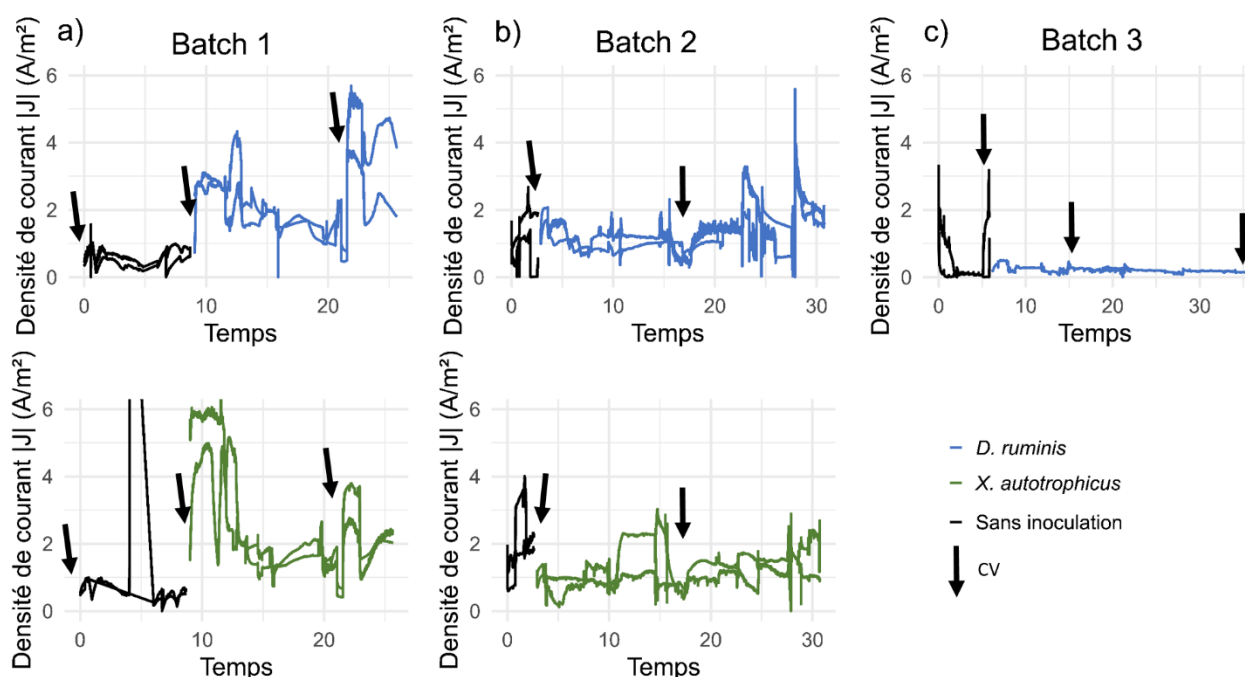


Figure 5-14 : Densités de courant mesurées dans les deux réacteurs de chaque souche de *D. ruminis* et *X. autotrophicus* : a), le premier batch en MEC avant et après inoculation des réacteurs. b) le deuxième batch de 30 jours avec 3 jours avant inoculation avec cultures issues de milieu riche et c) troisième batch en absence d'O<sub>2</sub> avec *D. ruminis*. Les points en noir correspondent aux valeurs mesurées dans les réacteurs avant inoculation, les points en couleur correspondent aux mesures après inoculation. Les flèches correspondent à des cycles de CV. Un lissage des courbes sur cinq jours est utilisé ainsi qu'un retrait des valeurs jugées aberrantes (augmentation de plus de 95% de la valeur de J précédente, soit après dix minutes).

Les cathodes utilisées pour la culture pure ont été polarisées à un même potentiel que celles des travaux d'enrichissements PCE et des travaux de Rago et al (2019), soit -0,7 V vs SHE (-0,94V vs SCE). Lors du premier batch, une moyenne de  $-0,6 \pm 0,2$  A/m<sup>2</sup> a été mesurée pour les quatre réacteurs avant inoculation puis des moyennes de  $-2,8 \pm 1,6$  A/m<sup>2</sup> et  $-2,4 \pm 1,3$  A/m<sup>2</sup> ont été mesurées pour *X. autotrophicus* et *D. ruminis* respectivement. Lors du second batch, les densités de courant suivies pendant 3 jours sans inoculation correspondaient à des moyennes de  $-1,0 \pm 0,6$  A/m<sup>2</sup> et, après inoculation de *X. autotrophicus* et *D. ruminis*, à  $-1,4 \pm 0,6$  A/m<sup>2</sup> et  $-1,2 \pm 0,5$  A/m<sup>2</sup> respectivement. Ces densités de courant mesurées au cours du deuxième batch montrent des différences non significatives (P = 1, pas assez de répétition) entre les moyennes des réacteurs avant et après inoculation, ce qui semble indiquer une absence d'interactions entre électrodes et bactéries.

Les résultats du premier batch ont donc montré des différences significatives entre avant et après inoculation sur les moyennes de densité de courant mesurées (P = 0,03). Ceci pourrait être expliqué par un apport d'O<sub>2</sub> supplémentaire. En effet, une diminution de la densité de courant est observée pour les cultures de *X. autotrophicus* après 4-5 jours de culture. Ces différences pourraient aussi s'expliquer par une différence entre les membranes utilisées (AEM en premier puis CEM pour réduire la perte de CO<sub>2</sub>) qui ont permis de réduire le nombre de remplissages de CO<sub>2</sub> des réacteurs. Après retrait de l'O<sub>2</sub>, le réacteur inoculé avec *D. ruminis* a montré une diminution de la densité moyenne de courant, avec ou sans bactéries, comme le montre la Figure 5-14e. Ces moyennes étaient de  $-0,1 \pm 0,2$  A/m<sup>2</sup> et  $-0,2 \pm 0,1$  A/m<sup>2</sup> avant et après inoculation. Ces résultats semblent indiquer que le niveau élevé ( $-1$  A/m<sup>2</sup>) mesuré en présence d'O<sub>2</sub> était principalement dû à la réduction de celui-ci.

#### 4.2. Voltammétrie cyclique

Pour compléter ces observations, des voltammétries cycliques ont été réalisées dans ces différentes conditions et sont présentés dans la Figure 5-15. Lors des premier et second batches, en présence d'O<sub>2</sub>, une intensité de courant de  $-1,6$  à  $-3,1$  A/m<sup>2</sup> a été obtenue pour le potentiel appliqué ( $-0,7$  V vs SHE). En anaérobiose, ces intensités sont environ à  $-0,5$  A/m<sup>2</sup> (Figure 5-15 b). Ces observations confirmeraient l'hypothèse d'une augmentation de la densité de courant en présence d'O<sub>2</sub>.



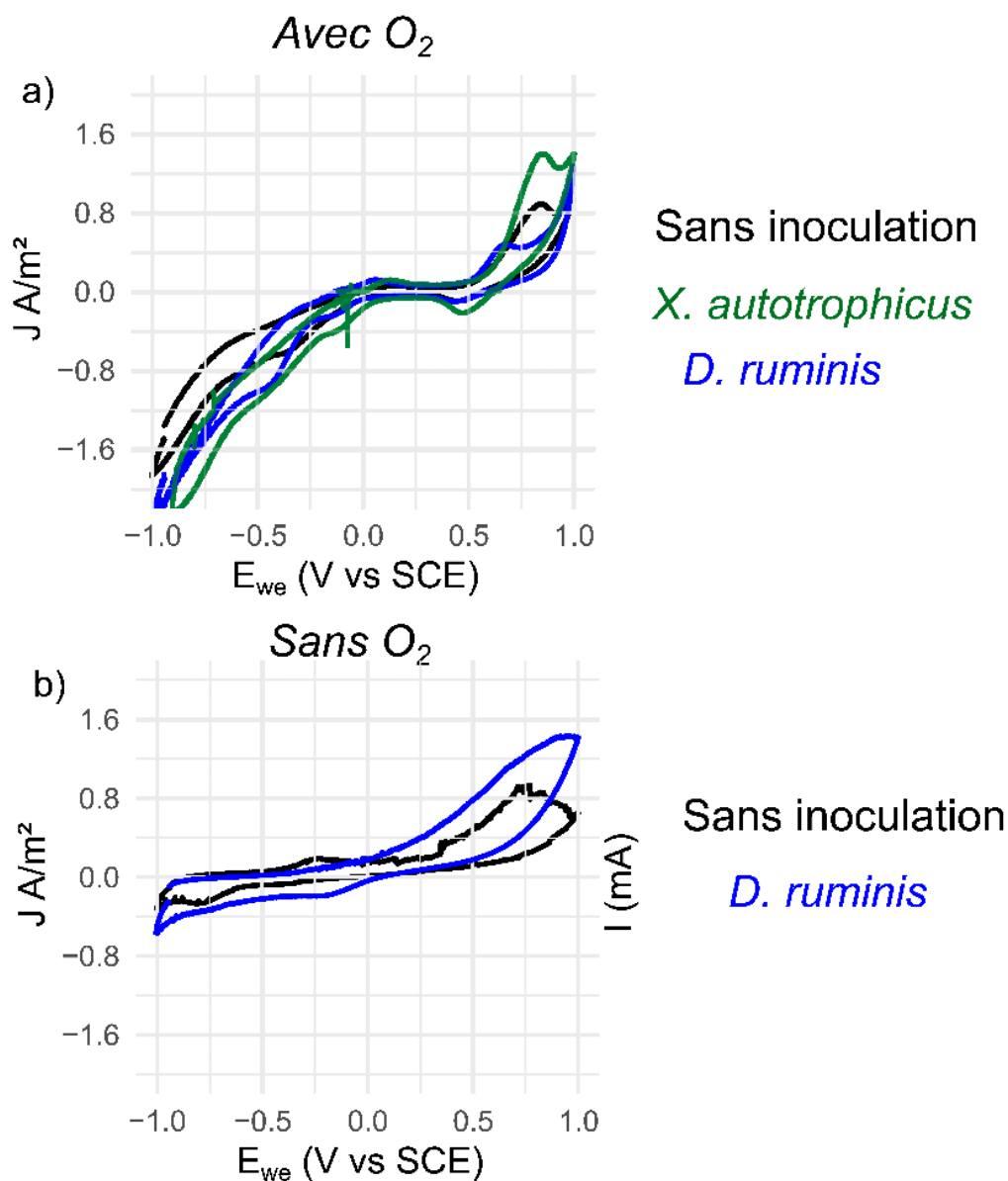


Figure 5-15 : Voltammétrie cyclique a) des réacteurs avec la présence d'O<sub>2</sub> (6 jours sans inoculation et 17 jours après) et b) dans un réacteur avec du N<sub>2</sub> seul comme gaz après 5 jours et 35 jours après inoculation par *D. ruminis*.

#### 4.3. Croissance bactérienne

En parallèle de la mesure de densité de courant, la concentration en biomasse a été suivie dans les milieux et sur l'électrode. La mesure de la densité optique à 600nm est présentée dans la Figure 5-16. Les niveaux de densité optique sont toutefois restés faibles pour chacun des batchs. Au cours du premier batch, une densité optique de  $0,27 \pm 0,03$  a été mesurée pour les cultures de *D. ruminis* et  $0,04 \pm 0,00$  pour *X. autotrophicus* avant de rejoindre un niveau plus faible. Comme pour les bouteilles, ces résultats peuvent s'expliquer par la coloration du milieu de culture de *D. ruminis*. Ces densités n'ont pas montré de variations significatives au premier

(*t*-test,  $P = 0,06$ ) et second batch ( $P > 0,05$ ) entre inoculation et fin de culture. Un pic avec un maximum à 0,087 a été mesuré sur quatre jours pour une des cultures de *X. autotrophicus* mais est vite revenu au niveau moyen de 0,01.

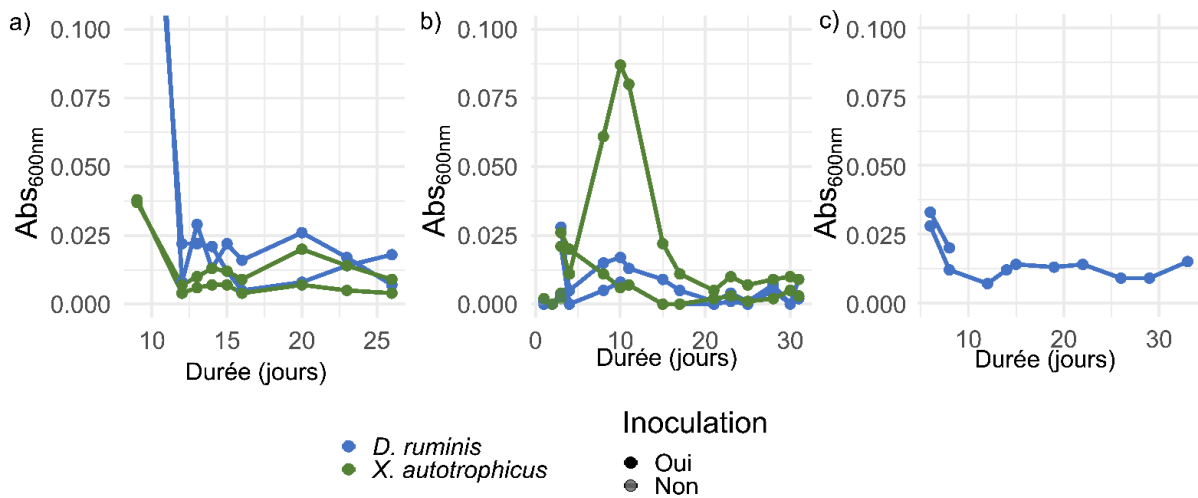


Figure 5-16 : Mesure de la densité optique dans les milieux des réacteurs utilisés pour la culture de *D. ruminis* et *X. autotrophicus* sur cathode. Les trois batchs présentés correspondent à a) le premier batch avec O<sub>2</sub>, b) le second batch en présence d'O<sub>2</sub> et c) le dernier batch réalisé pour *D. ruminis* en anaérobiose.

Lors du dernier batch en absence d'O<sub>2</sub>, aucune croissance n'a été observé pour la culture de *D. ruminis* avec des absorbances initiale et finale de 0,03 et 0,02 après plus de 30 jours. Ces résultats de densité optique suggèrent que la concentration bactérienne dans les milieux n'a pas varié et que l'absence d'H<sub>2</sub> dans les espaces de tête des réacteurs expliquerait cette absence de croissance. En parallèle, la concentration en bactéries a pu être calculée à partir des qPCR des ADNr 16S réalisées sur les milieux et les électrodes des réacteurs utilisés pour les cultures avec des électrodes polarisées. Ces concentrations en bactéries sont présentées dans la Figure 5-17.

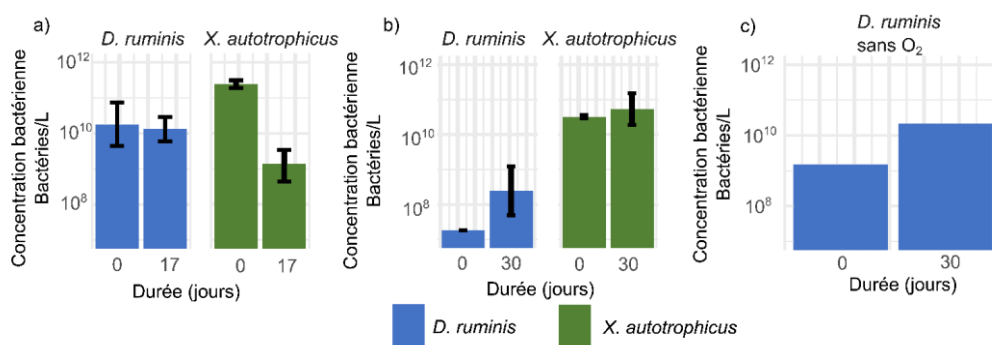


Figure 5-17 : Concentrations en bactérie estimées par qPCR des ADNr 16S. Les concentrations correspondent aux concentrations en gène d'ADNr 16S obtenues par qPCR divisées par les nombres de copies du gène d'ADNr 16S dans les génomes selon la base de donnée rrndb 5.7. Les concentrations sont calculées en utilisant les quantités de bactérie des milieux et des électrodes avant de rapporter l'ensemble au volume de la chambre cathodique utilisée. Les barres d'erreurs correspondent aux écarts-types entre les deux réacteurs pour chaque condition sauf pour le troisième batch où un seul réacteur de *D. ruminis* a été utilisé. Le graphique a) correspond au premier batch avec O<sub>2</sub> et b) au second batch. C) représentent les concentrations bactériennes initiale et finale du réacteur de *D. ruminis* sans O<sub>2</sub>.

Les concentrations en bactéries mesurées au cours du premier batch montrent des concentrations sans variations significatives de  $1,6 \pm 2,2 \times 10^{10}$  bactéries/L à l'inoculation puis  $1,1 \pm 1,2 \times 10^{10}$  bactéries/L après 17 jours pour *D. ruminis* ( $t$ -test,  $P = 0,6$ ) et  $2,5 \pm 0,6 \times 10^{11}$  bactéries/L à  $1,4 \pm 1,4 \times 10^9$  bactéries/L pour *X. autotrophicus* ( $t$ -test,  $P = 0,1$ ). Au cours du second batch, les concentrations initiales étaient de  $1,8 \pm 0,0 \times 10^7$  bactéries/L pour *D. ruminis* et  $3,2 \pm 0,3 \times 10^{10}$  bactéries/L pour *X. autotrophicus*. Après 30 jours, les concentrations ont atteint  $4,2 \pm 4,9 \times 10^8$  bactéries/L et  $6,9 \pm 6,1 \times 10^{10}$  bactéries/L. Les évolutions de concentration observées pour *D. ruminis* et *X. autotrophicus* n'étaient pas significatives ( $t$ -test,  $P = 0,45$  et  $0,57$ ) comme pour ce qui avait été observé en bouteille avec H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>. De même, au cours du troisième batch avec l'absence de l'apport en O<sub>2</sub>, la concentration de *D. ruminis* est passée de  $1,5 \times 10^9$  bactéries/L à  $2,2 \times 10^{10}$  bactéries/L, mais nous ne pouvons pas discuter la significativité de cette observation avec un seul réplicat. Ces concentrations sont cohérentes avec la mesure de densité optique où aucune variation significative n'avait été mesurée.

#### 4.4. Fixation de N<sub>2</sub> en MEC avec des souches pures

La fixation de N<sub>2</sub> par la méthode ARA n'a montré que des traces d'éthylène (de l'ordre de 0,02% de l'espace de tête après retrait du CO<sub>2</sub> contre des résultats de l'ordre de 0,15-0,3% en bouteille). Toutefois, les valeurs étant proches du seuil de quantification (0,03%), la fixation de N<sub>2</sub> ne peut pas être confirmée pour ces cultures de souches pures en MEC, ce qui est cohérent avec l'absence d'augmentation significative de biomasse.

## 5. CONCLUSION

Les travaux présentés dans ce chapitre sur souches pures ont été réalisés pour valider ou invalider les hypothèses formulées à la suite des enrichissements. Celles-ci se sont concentrées en grande partie sur la mise à disposition de carbone organique par des bactéries issues des genres *Desulfotomaculum/Desulforamulus*. Or, on a vu que la souche choisie (*D. ruminis*) n'avait pas montré de croissance significatives (*t*-test,  $P > 0,05$ ) dans nos conditions, avec ou sans acétate, ce qui invalide le rôle supposé de *D. ruminis* dans nos enrichissements. Cependant, la croissance significative (*t*-test,  $P < 0,01$ ) observée au cours des cocultures de *D. ruminis* et *A. lipoferum* étant la seule croissance sur  $H_2/CO_2$  significative, on suppose que d'autres interactions participent aux développements des deux souches. Une autre espèce de *Desulforamulus*, comme *D. aquiferis* qui a montré une croissance autotrophe (Watanabe et al., 2020) ou *Desulfotomaculum orientis* qui a montré un métabolisme homoacétogène (Klemp et al., 1985), pourraient également être plus proche de la souche retrouvée dans nos enrichissements. Cette observation suggère également que l'acétate de nos enrichissements a été produit par d'autres bactéries, plutôt minoritaires, comme par exemple des espèces du genre *Clostridium* dont plusieurs espèces ont été retrouvées et utilisées dans des systèmes bioélectrochimiques microbiens et sont visibles sur les cathodes de nos enrichissements (Cotter et al., 2009).

Concernant la fixation de  $N_2$ , celle-ci a pu être démontrée pour toutes les souches utilisées en bouteilles. *D. ruminis* et *X. autotrophicus* ont montré la possibilité de fixer  $N_2$  avec  $H_2$  seul, mais pas *A. lipoferum* et *C. testosteroni* qui n'ont pas montré d'activité de fixation de  $N_2$ . Les tests en batch sur milieu minéral et  $H_2/CO_2$  où la fixation de  $N_2$  avait été observée pour ces souches ont alors été suspectés d'avoir été contaminés ou, pour le cas de la première série de batchs, que les repiquages ont apporté du carbone organique et de l'azote assimilable, au moins sur le premier batch. Sur l'acétate, toutes les souches ont montré la fixation de  $N_2$ , ce qui confirme bien leur capacité de diazotrophie et semble confirmer la partie des hypothèses sur les interactions par l'utilisation de l'acétate par certaines souches. Les croissances significatives avec les consommations significatives d'acétate pour *C. testosteroni* et *A. lipoferum* confirme leur croissance et fixation de  $N_2$  à partir de l'oxydation de cette source de carbone organique comme supposé (Figure 4-8).

Concernant les bactéries utilisées avec ces cathodes pour souche pure, *X. autotrophicus* n'avait pas présenté de croissance, ce qui est cohérent avec l'absence de production d' $H_2$  dans ces MEC et son métabolisme de bactérie oxydante d' $H_2$  qui ne peut pas croître sans ce gaz (ou une source de matière organique). Pour *D. ruminis*, aucune croissance significative n'a pu être

mise en évidence ( $t$ -test,  $P > 0,05$ ). Ce qui irait dans le sens du choix d'une autre souche pour ce rôle de bactérie acétogène.

Après la fin des cultures, des tests d'identification des cultures pures ont été réalisés. Les résultats du séquençage des échantillons des cryo-banques de souches pures ont été reçus et ont montré des contaminations. Ces échantillons ont été prélevés dans des cultures de repiquage des cryo-banques de souche dans du milieu riche. Les séquençages ont indiqué une abondance relative de 100% d'un membre du genre des *Staphylococcus* à la place de *X. autotrophicus*. Pour les autres, seule *C. testosteroni* était présente dans sa culture à 22% (Voir Contamination des cultures de souches pures). Ces résultats indiquent que des contaminations ont pu survenir au cours de cette culture de repiquage utilisée comme inoculum pour le dernier batch en bouteille avec  $H_2$ . D'autres repiquage des cryobanques ont été utilisés pour les autres cultures mais des contaminations des tubes utilisés pour nos cryo-banques de souche ne peuvent être exclues.

Ces résultats rendent impossible l'exploitation des observations précédentes car nous ne pouvons pas valider avec certitude la présence des souches que nous voulions étudier. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ces contaminations. Des contaminations lors des cultures en laboratoire sont à envisager au moment de la récupération et du repiquage des souches. En effet, les risques de contamination lors du travail avec des souches pures en milieu riche avec  $O_2$  restent importants malgré toutes les précautions qui peuvent être mise en place. Enfin, une contamination des souches envoyées n'est pas non plus à exclure.

Quelle que soit la raison de contamination, il est difficile d'identifier le moment de la contamination, surtout avec des délais très important entre échantillonnage et récupération des résultats de séquençage (plusieurs mois) qui ont obligé à faire des choix sur les échantillons envoyés.

En ce qui concerne le rôle des cathodes par rapport aux enrichissements, aucune à peu de production d' $H_2$  n'a été observée dans nos chambres cathodiques, à l'inverse de ce qui avait pu être observé pendant les enrichissements ou pour la nouvelle cathode PCE B1. Il peut donc être supposé que la production d' $H_2$  à la cathode de nos enrichissements était liée à des bactéries (Rozendal et al., 2008). Cette catalyse de la production d' $H_2$  par des bactéries a pu participer au développement de bactéries hydrogénotrophes dans les enrichissements profitant du  $H_2$  produit pour la fixation de  $N_2$  et  $CO_2$ . L'utilisation d'un réacteur abiotique en parallèle aurait pu répondre à cette problématique. Les mesures de densités de courant en réacteur avec souches pures ont montré des densités de courant qui sont faibles en comparaison avec les enrichissements réalisés précédemment, on en conclut que les densités

de courant mesurées pour les PCE, bien que liées en partie à la réduction d'O<sub>2</sub>, étaient également liées au développement bactérien.

## Chapitre 6 - Discussion et Perspectives

### 1. DISCUSSION : POTENTIEL DES SYSTEMES DE BIOELECTROCHIMIE MICROBIENS POUR LA FIXATION BIOLOGIQUE DE N<sub>2</sub>

Nous avons vu au cours de ces travaux de thèse que la fixation de N<sub>2</sub> pouvait être mise en œuvre dans les systèmes bioélectrochimiques. Une comparaison avec le procédé Haber-Bosch ou la réduction électrocatalysée de N<sub>2</sub> peut aider à discuter le potentiel de ces procédés de fixation de N<sub>2</sub> en BES. Pour cela, j'ai évalué les vitesses de production d'azote sous forme NH<sub>3</sub>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ou de de biomasse microbienne et les demandes en énergie de chaque procédé ont aussi été calculées en utilisant l'Équation 15 suivante :

*Équation 15 : Calcul de la demande en énergie des procédés*

$$E_N = \frac{Q \times U + E_{substrat} - E_{produit}}{n_N}$$

Avec  $E_N$  l'énergie en joules par mole de N (de la biomasse ou NH<sub>4</sub><sup>+</sup>),  $Q$  la charge transférée, calculée par l'intégrale de l'intensité de courant  $I$  par rapport aux temps et exprimé en C,  $U$  la différence de potentiel entre anode et cathode en V,  $E_{substrat}$  l'énergie apportée par l'oxydation du substrat en joules,  $E_{produit}$  l'énergie récupérée (ie : H<sub>2</sub>) en joules et  $n_N$  la quantité de N (biomasse ou NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) mesurée en mole.

#### 1.1. Production de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>

Le projet CATHOMIX dans lequel s'inscrivent ces travaux de thèse a pour objectif la production de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> à partir de la fixation de N<sub>2</sub> en biocathode. Nous avons observé des productions de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> avec des bioanodes et également des biocathodes. La production de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> a été estimée dans tous les systèmes étudiés, cependant, seuls les travaux sur biocathodes ont pu être testés avec une méthode de validation de la fixation de N<sub>2</sub> (méthode ARA). La fixation de N<sub>2</sub> en bioanode a cependant été validée par d'autres chercheurs dans des conditions proches des nôtres, notamment dans les différents travaux d'Ortiz-Medina et al. (2019,2022) et ceux de Jing et al. (2022).

Pour être compétitifs avec le procédé Haber-Bosch, les procédés électrochimiques de réduction de N<sub>2</sub> auraient besoin d'atteindre densités de réactions de l'ordre de 100

nmol/s/cm<sup>2</sup> (3,6 mol/h/m<sup>2</sup>) (Rezai et al., 2023). Les systèmes électrochimiques allant jusqu'à environ 10 nmol/s/cm<sup>2</sup>, la production possiblement utilisable serait concurrencée par des vitesses 10 fois plus élevées dans le procédé Haber-Bosch (Choi et al., 2020; Giddey et al., 2013). On peut donc utiliser cette valeur comme référence pour les travaux avec des catalyseurs microbiens.

Les vitesses de production de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> sur bioanodes et biocathodes rapportées dans la littérature sont présentées dans les Tableau 6-1 et Tableau 6-2 respectivement.

### 1.1.1. Production de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> en bioanode

Les bioanodes ont été les premiers systèmes mis en place au cours de ces travaux avec l'utilisation d'une anode comme accepteur d'électrons et d'acétate comme source de carbone et d'énergie pour la croissance et la fixation de N<sub>2</sub>. Dans nos travaux avec des anodes colonisées par *G. sulfurreducens*, nous avons mesuré une vitesse de libération de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> de 0,6 mmol<sub>NH4</sub>/h/m<sup>2</sup> au cours des batchs 3, 4 et 5. Cette vitesse a été calculée en soustrayant le NH<sub>4</sub><sup>+</sup> mesuré en début de batch. Pour calculer les besoins en énergie (Équation 15) il est nécessaire d'évaluer la différence de potentiel entre anode et cathode. Celle-ci s'exprime comme suit :

Équation 16 : Calcul de la tension

$$U = E_{an} - E_{cat} + j \frac{d}{\sigma}$$

Où  $E_{an}$  est le potentiel de l'anode,  $E_{cat}$  est le potentiel de la cathode,  $j$  la densité de courant,  $d$  la distance entre anode et cathode et  $\sigma$  la conductivité du milieu. Pour une densité de courant de  $j = 7,5 \text{ A/m}^2$ , le potentiel de l'anode était de  $E_{an} = -0,20 \text{ V vs. SCE}$  (cf. courbe intensité/potentiel disponible en Annexe : Courbe densité/). Par ailleurs, la distance inter-électrode était de  $d = 7,5 \text{ cm}$  et la conductivité du milieu de  $\sigma = 3 \text{ S/m}$ . Le potentiel de la cathode n'a pas été mesuré, mais il peut être estimé à partir d'un modèle de cathode abiotique (Desmond-Le Quémener et al., 2019) :  $E_{cat} = -1,11 \text{ V vs. SCE}$ . Ceci me permet d'estimer la différence de potentiel  $U = 1,09 \text{ V}$  et de calculer la demande en énergie qui était alors de  $92 \text{ MJ/mol NH}_4^+$  en prenant en compte le substrat. Toutefois, nous ne pouvons pas relier directement production de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> à la fixation de N<sub>2</sub> dans nos systèmes et la libération de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> pourrait être partiellement liée à la lyse cellulaire des bactéries utilisées comme inoculum. Dans des expériences en cultures mixtes, Ortiz-Medina et al. (2019) ont mis en évidence une vitesse de production de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> plus faible que de celle mesurée dans nos travaux avec une vitesse maximale de  $0,19 \text{ mmol}_{\text{NH}_4}/\text{h/m}^2$  et des demandes en énergie du même ordre de grandeur (24 à 84 MJ/mol, (Ortiz-Medina et al., 2019)).

Les différentes vitesses mesurées pour les procédés en bioanode avec fixation de  $N_2$  sont résumées dans le Tableau 6-1. Globalement, les vitesses mesurées sont près de 10000 fois plus faible que ce qui est espéré pour la réduction électrocatalysée de l'azote ( $100 \text{ nmol/s/cm}^2 = 3,6 \text{ mol/h/m}^2$ ) et les demandes en énergie estimées plus importantes que pour le procédé Haber-Bosch.



Tableau 6-1 : Tableau récapitulatif des différents travaux sur bioanodes pour la fixation de N<sub>2</sub>. Sont présentés les matériaux utilisés pour les électrodes, les vitesses de production de N total et NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/NH<sub>3</sub> normalisées à la taille des électrodes (ou volume du réacteur quand indisponible) et les potentiels appliqués à l'électrode de travail par rapport à une électrode de référence ou la différence de potentiel (ddp) entre les deux électrodes du système.

148

	PRESENCE MAJORITAIRE	DESIGN DES ELETRODES	VITESSE PRODUCTION N DANS BIOMASSE/NTOTAL	INHIBITEUR ASSIMILATION NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	VITESSE DE PRODUCITON EN NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /NH <sub>3</sub>	POTENTIEL APPLIQUE	TRAVAUX
CULTURE MIXTE	<i>Geobacter</i>	Plaque de graphite	1,8 mmol <sub>N</sub> /h/m <sup>2</sup> (40 μM <sub>NH4</sub> /h)	Oui (MSX)	0,19 mmol <sub>NH4</sub> /h/m <sup>2</sup>	Ddp = 1V	(Ortiz-Medina et al., 2019)
		Plaque de graphite	1,7 mmol <sub>N</sub> /h/m <sup>2</sup> (5,6 mg <sub>N</sub> /L/j)	Non	NA	0,3V vs SCE	(Jing et al., 2022)
	<i>Clostridia</i>	Granule de graphite	~79 mmol <sub>N</sub> /h/L (237 μmol <sub>C2H4</sub> /L/j)	Non	NA	~0,2V vs Ag/AgCl	(Wong et al., 2014)
SOUCHES PURES	<i>Anabaena variabilis</i> + MV	ITO (indium tin oxide)	431 nmol <sub>C2H4</sub> /OD730/L/h	Non	~0,1 mmol <sub>NH4</sub> /h/m <sup>2</sup> (3,6μL/h)	-0,8 à 0,8V vs SCE	(Knoche et al., 2017)
	<i>Geobacter sulfurreducens</i>	Plaque de graphite	160 nmol <sub>C2H4</sub> /mg <sub>prot</sub> /min	Non	NA	-0,15V vs SHE	(Ortiz-Medina et al., 2023)
			64 nmol <sub>C2H4</sub> /mg <sub>prot</sub> /min			+0,15V vs SHE	
		Plaque de graphite	0,8 mmol <sub>N</sub> /h/m <sup>2</sup>	Non	0,6 mmol <sub>NH4</sub> /h/m <sup>2</sup>	0,2V vs SCE	Ces travaux

### 1.1.2. Production de $\text{NH}_4^+$ en biocathode

Les bioanodes sans source d'azote autres que  $\text{N}_2$  ont montré des vitesses de production de  $\text{NH}_4^+$  de l'ordre de 0,1 à 0,6  $\text{mmol}_{\text{NH}_4}/\text{h}/\text{m}^2$  pour des demandes en énergie qui ont été calculées à 24-84 MJ/mol par Ortiz-Medina (en présence d'un inhibiteur de l'assimilation de l'azote) et 92 MJ/mol pour nous. En se plaçant à la cathode, la fixation de  $\text{N}_2$  peut avoir lieu soit à partir d' $\text{H}_2$  (Liu et al., 2017) soit directement sur la cathode (avec  $\text{H}_2$  comme intermédiaire non mesuré ou via des transferts directs d'électrons) (Rago et al., 2019). Les vitesses de fixation de  $\text{N}_2$  sont présentées dans le Tableau 6-2. À la suite des travaux sur bioanodes, les enrichissements de biofilms cathodiques diazotrophes ont permis de mettre en évidence la fixation de  $\text{N}_2$  dans des systèmes avec des cathodes comme seules sources d'énergie. Pour la production de  $\text{NH}_4^+$  au cours des enrichissements, la plus grande vitesse de sécrétion a été mesurée entre 398 et 473 jours d'enrichissements pour la cathode PCE 2 avec une vitesse de  $9,1 \pm 10,0 \mu\text{mol}_{\text{NH}_4}/\text{L}/\text{j}$  soit  $151,7 \pm 166,7 \mu\text{mol}_{\text{NH}_4}/\text{h}/\text{m}^2$ . Cependant, aucune réduction de l'acétylène n'a été observée dans ce réacteur après 340 jours d'enrichissement. L'ammonium  $\text{NH}_4^+$  retrouvé dans ces milieux a donc probablement été lié à la lyse cellulaire, hypothèse confirmée avec la diminution du nombre de bactéries observée à la cathode. L'azote perdu lors de la lyse a déjà été compté dans l'azote de la biomasse sur les périodes précédentes (131 à 214 jours). Lors de la période de 131 à 214 jours, quand une croissance microbienne a été observée par qPCR, les moyennes des vitesses mesurées pour les réacteurs PCE (1 et 2) étaient de 0,11 et 0,16  $\mu\text{mol}_{\text{NH}_4}/\text{L}/\text{j}$  pour des demandes en énergie de 13,3 et 27,2 GJ/mol de  $\text{NH}_4^+$  (en prenant en compte l'acétate et le  $\text{H}_2$  récupérés). Après 398 jours d'enrichissement, deux nouvelles cathodes ont été inoculées, mais la fixation de  $\text{N}_2$  n'a été mise en évidence par la méthode ARA que pour une seule de ces cathodes. Ce réacteur (PCE B1) avait une vitesse de production de  $11,6 \mu\text{mol}_{\text{NH}_4}/\text{h}/\text{m}^2$ . Ce réacteur est le seul dans lequel la biomasse s'est accumulée après inoculation contrairement à PCE B2 qui, en plus de la lyse bactérienne visible par la diminution des concentrations bactérienne dans le temps, n'a pas montré de fixation de  $\text{N}_2$  (méthode ARA). Toutefois, en absence de fixation de  $\text{N}_2$ , une production de  $\text{NH}_4^+$  dans le milieu a été observée à près de 8 fois plus élevée que celle de PCE B1 ( $87,5 \mu\text{mol}_{\text{NH}_4}/\text{h}/\text{m}^2$  pour PCE B2). Cette observation nous indique que la libération de  $\text{NH}_4^+$  dans ces nouvelles biocathodes était probablement liée à la lyse comme préalablement observé pour PCE 2. La production de  $\text{NH}_4^+$  par PCE B1 représente une demande en énergie d'environ 16,3 GJ/mol et 0,9 GJ/mol pour PCE B2 sur une période de 75 jours. On voit donc que les demandes en énergie pour la production de  $\text{NH}_4^+$  sont plus avantageuses lorsqu'il y a de la lyse bactérienne cependant, nos demandes en énergie restent supérieures à celles présentées par Ortiz-Medina et al. (2019).

Tableau 6-2 : Tableau récapitulatif des différents travaux sur biocathodes ou cathode abiotique comme source d'H<sub>2</sub> pour la fixation de N<sub>2</sub>. Sont présentés les matériaux utilisés pour les électrodes, les vitesses de production de N total et NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/NH<sub>3</sub> normalisées à la taille des électrodes (ou volume du réacteur quand indisponible) et les potentiels appliqués à l'électrode de travail par rapport à une électrode de référence ou la différence de potentiel (ddp) entre les deux électrodes du système.

	BACTÉRIES	DESIGN DES ÉLECTRODES	VITESSE PRODUCTION N DANS BIOMASSE/NTOTAL	INHIBITEUR ASSIMILATION NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	VITESSE DE PRODUCTION EN NH <sub>4</sub>	POTENTIEL APPLIQUÉ	TRAVAUX
<b>SOUCHES PURES</b>	<i>Xanthobacter autotrophicus</i>	Cathode Co-P HER et anode CoPi	7,0 mmol <sub>N</sub> /L/j (47 mg <sub>N</sub> /L)	phosphinothricine (PPT)	1,3 mmol <sub>NH<sub>3</sub></sub> /h/m <sup>2</sup> (11mg <sub>N</sub> /L)	3V	(Liu et al., 2017)
			8,9 mmol <sub>N</sub> /h/m <sup>2</sup> (72,5 mg <sub>N</sub> /L 5 jours)	Non	NA	3V	(Liu et al., 2017)
		Pt nanowire network	2,3 mol <sub>N</sub> /h/m <sup>3</sup> (570 mg <sub>N</sub> /L 6 days)	Non	NA	-0,15V vs RHE	(Lu et al., 2020)
	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Pt nanowire network	0,8 mol <sub>N</sub> /h/m <sup>3</sup> (190 mg <sub>N</sub> /L 6 days)	Non	Negligeable	-0,15V vs RHE	(Lu et al., 2020)
	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Ti-wire	NA	Non	0,4 nmol <sub>NH<sub>4</sub></sub> /L/h	-0,3V vs SHE	(S. Chen et al., 2020)
	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	Cu-Pt wire	0,76 mmol <sub>N</sub> /h/m <sup>2</sup> (16,25µmol <sub>N</sub> /100mL 8 jours)	Non	NA	3V	(Soundararajan et al., 2019)
<b>CULTURES MIXTES</b>		toile de carbone	2,4 µmol <sub>N</sub> /h/m <sup>2</sup> (0,2 mg <sub>N</sub> /L/j)	Non	NA	-0,7V vs SHE	(Rago et al., 2019)
		Feutre de carbone	NA	Non	3,5 mmol <sub>NH<sub>4</sub></sub> /h/m <sup>2</sup> (10,6mg <sub>NH<sub>4</sub></sub> /L/j)	-0,9 V vs Ag/AgCl	(L. Zhang et al., 2022)
		Plaque de graphite	0,56 mmol <sub>N</sub> /h/m <sup>2</sup> (43,53mg <sub>biomass</sub> /L 14jours)	Non	59,8 µmol <sub>NH<sub>3</sub></sub> /h/m <sup>2</sup> (0,061mg <sub>NH<sub>3</sub></sub> /L/j)	-0,995V vs SHE	(Yadav et al., 2022)
		Feutre de carbone	NA	Non	25 µmol <sub>NH<sub>4</sub></sub> /h/m <sup>2</sup> (0,63mg <sub>NH<sub>4</sub></sub> /L/j)	1,5V	(F. Li et al., 2022)
		Feutre de carbone	55-1165 µmol <sub>N</sub> /h/m <sup>2</sup>	Non	2,4 µmol <sub>NH<sub>4</sub></sub> /h/m <sup>2</sup> (151,7µmol <sub>NH<sub>4</sub></sub> /h/m <sup>2</sup> avec lyse)	-0,94V vs SCE	Ces travaux

Si l'on compare avec d'autres travaux publiés sur biocathodes, dont les vitesses de production d'azote  $\text{NH}_4^+$  et de  $\text{N}_{\text{total}}/\text{N}_{\text{biomasse}}$  depuis la fixation de  $\text{N}_2$  sont présentées dans le Tableau 6-2, la vitesse la plus élevée tout système confondu a été obtenue par Zhang et al (2022) avec  $3,5 \text{ mmol}_{\text{NH}_4}/\text{h}/\text{m}^2$  avec le meilleur rendement faradique mesuré en communauté mixte de près de 20,25% pour la production de  $\text{NH}_4^+$  (L. Zhang et al., 2022). Cependant, cette vitesse élevée par rapport à nos travaux reste à relativiser par rapport aux vitesses obtenues en réduction électrocatalysée qui peuvent atteindre  $2 \text{ mol}/\text{h}/\text{m}^2$  (X. Chen et al., 2022). De plus, le  $\text{NH}_4^+$  obtenu dans les travaux de Zhang et al. (2022) est issu de la lyse de la biomasse par une des familles bactériennes retrouvées dans leur communauté (L. Zhang et al., 2022). Ils ont supposé l'existence d'une association entre bactéries autotrophes fixatrices de  $\text{N}_2$  et bactéries hétérotrophes capables de dégrader l'azote organique et notamment l'azote assimilé dans la biomasse (L. Zhang et al., 2022). Le  $\text{NH}_4^+$  pourrait être issu de la lyse de la biomasse utilisée comme inoculum comme ce qui est probablement observé dans nos enrichissements (215 à 380 jours et 398 à 473 pour PCE E2 et PCE B2).

### *1.1.3. Conclusion sur la production de $\text{NH}_4^+$*

Ces résultats montrent des quantités de  $\text{NH}_4^+$  produites à des vitesses faibles aussi bien pour les bioanodes que pour les biocathodes en comparaison avec les procédés de réduction électrocatalysée de  $\text{N}_2$  ou la synthèse de  $\text{NH}_3$  par le procédé Haber-Bosch. Quelques exceptions comme Zhang et al (2022) ont montré des vitesses plus élevées de l'ordre des  $\text{mmol}/\text{h}.\text{m}^2$  mais qui restent encore limitées en comparaison avec les vitesses attendues en électrochimie pour concurrencer le procédé Haber-Bosch de l'ordre de  $1 \text{ mol}/\text{h}/\text{m}^2$ . Les bioanodes avec inhibiteur de l'assimilation de l'azote d'Ortiz-Medina et al. (2019) présentent tout de même des coûts énergétiques plus faibles que ceux mesurés pour nos biocathodes pour la production de  $\text{NH}_4^+$  (Ortiz-Medina et al., 2019). Il est connu que les inhibiteurs de l'assimilation de  $\text{NH}_4^+$  sont nécessaires car la fixation biologique de  $\text{N}_2$  va permettre l'assimilation d'azote pour l'anabolisme bactérien en absence d'autres formes d'azote assimilables (ie.  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$ ). Le  $\text{NH}_4^+$  issu de la fixation de  $\text{N}_2$  est utilisé directement par les enzymes glutamine synthétase et glutamate synthase pour la production de protéines. Avec des inhibiteurs de la glutamine synthétase (GS) comme le MSX utilisé par Ortiz-Medina et al. (2019), la production de protéine est interrompue et l'azote peut être libéré sans production de biomasse. Toutefois la croissance de biomasse est interrompue par l'inhibition complète de l'assimilation de l'azote comme le rappelle Ortiz-Medina et al. (2019). Ces systèmes à bioanode présentent tout de même un intérêt en terme de demande en énergie. En effet, les demandes en énergie calculées l'ont été en prenant en compte l'énergie apporté par l'acétate

utilisé comme source de matière organique. Or il est possible d'utiliser des déchets organiques pour remplacer l'acétate et on peut donc calculer, dans notre cas, des diminutions jusqu'à 27 MJ/mol<sub>NH4</sub> au lieu des 92 MJ/mol<sub>NH4</sub> calculés avec l'énergie du substrat. De plus, nous avons montré des rendements de récupération à la cathode de l'ordre de 50 à 60% dans nos systèmes, on peut supposer que pour un rendement supérieur, la demande en énergie pourrait concurrencer le procédé Haber-Bosch. Avec un rendement faradique et un rendement de récupération à la cathode de 100%, la dépense en énergie avec acétate serait de l'ordre de 37 MJ/mol et -9,5 MJ/mol sans l'acétate. Cette demande en énergie négative permettrait des productions de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> avec une récupération d'énergie.

Pour les travaux sur cathode, les travaux de Zhang et al. (2022) apportent une autre alternative à l'utilisation des inhibiteurs d'assimilation de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> avec la libération de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> par une communauté composée de bactéries autotrophes diazotrophes et de bactéries pouvant dégrader l'azote organique des autres microorganismes (L. Zhang et al., 2022). Cependant, une inhibition de la fixation de N<sub>2</sub> a limité la concentration finale de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> à environ 40mg/L (L. Zhang et al., 2022), ce qui est cohérent avec les inhibitions connues pour la nitrogénase en présence de source d'azote assimilable (voir Annexe Inhibition des nitrogénases). En ce qui concerne la demande en énergie du procédé, elle n'a pas été calculée mais on peut supposer que la demande en énergie était de l'ordre du MJ/mol à la centaine de kJ/mol pour des densités de courant de l'ordre de -1 à -3 A/m<sup>2</sup> à un potentiel cathodique équivalent au nôtre (-0,9V vs Ag/AgCl contre -0,94V vs SCE pour nous).

### 1.2. Production de biomasse diazotrophe

Dans les travaux de Zhang et al (2022), la présence de bactéries capables de dégrader l'azote organique a permis d'augmenter la vitesse de production de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> avec jusqu'à près de 10 fois plus de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> produit que dans les autres procédés bioélectrochimiques microbiens et sans inhibiteur de l'assimilation de l'azote (L. Zhang et al., 2022). Cet azote organique est issu de l'azote assimilé dans la biomasse qui aurait été fixé depuis le N<sub>2</sub>. On s'est donc intéressé à la quantité de biomasse microbienne diazotrophe produite pendant la fixation de N<sub>2</sub> et surtout à la quantité d'azote que cette biomasse microbienne diazotrophe avait assimilé. Comme vu en introduction, la production industrielle de NH<sub>3</sub> est majoritairement utilisée pour la production d'engrais chimiques azotés. Or, comme montré dans les travaux de Liu et al. (2017) sur *X. autotrophicus*, la biomasse microbienne produite peut être directement utilisée comme bioengrais (Liu et al., 2017).

Les demandes en énergie et les vitesses pour la fixation de l'azote et son assimilation dans la biomasse microbienne ont été comparées au procédé Haber Bosch et à une vitesse de 3,6

mol/h/m<sup>2</sup> espérée pour les procédés de réduction électrocatalysée de N<sub>2</sub>. Les vitesses mesurées de production d'azote assimilé dans la biomasse microbienne diazotrophe dans les différents BES sont présentées dans les Tableau 6-1 et Tableau 6-2.

### 1.2.1. Production de biomasse diazotrophe en bioanode

Dans mes travaux, une vitesse de fixation de N<sub>2</sub> de 64,3 μmol<sub>N</sub>/L/j (803,6 μmol<sub>N</sub>/h/m<sup>2</sup>) a été calculée d'après la quantification des bactéries par qPCR en tenant compte de l'estimation de la biomasse initiale d'après la densité optique. Cette vitesse est à nuancer du fait de la présence d'une source d'azote assimilable au cours du premier batch de 7 jours (sur 35 jours) qui pourrait expliquer une partie de l'azote retrouvé. Dans les travaux d'Ortiz-Medina et al (2019), d'après les résultats de la méthode ARA, la vitesse de fixation de l'azote total (40 μmol<sub>N</sub>/L/h) est dix fois plus important que la vitesse de production de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (4,2 μmol<sub>N</sub>/L/h). Ceci qui suggère que l'azote fixé par les bactéries se retrouve principalement dans la biomasse, pour une vitesse d'assimilation de 1,8 mmol<sub>N</sub>/h/m<sup>2</sup> (Ortiz-Medina et al., 2019). Les travaux de Jing et al. (2022) ont montré une vitesse de production de N total comparable aux observations d'Ortiz-Medina et al. (2019) sans production de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> avec environ 1,7 mmol<sub>N</sub>/h/m<sup>2</sup> (Jing et al., 2022).

Concernant la demande en énergie, dans mes réacteurs, celle-ci était de 60 MJ/mol<sub>N</sub> en prenant en compte la production d'H<sub>2</sub> à la cathode et l'acétate apporté, si on suppose que la croissance de *G. sulfurreducens* est associée à la fixation e N<sub>2</sub>. Cette demande descend à 18 MJ/mol<sub>N</sub> en retirant le coût énergétique de l'acétate. La demande en énergie mesurée par Ortiz-Medina (2019) serait dix fois moins importante si on considère une quantité d'azote fixé dix fois plus élevée, soit environ 2,5 MJ/mol<sub>N</sub>. Ces demandes en énergie montrent une meilleure conversion de l'énergie apportée que pour le procédé Haber-Bosch pour une quantité de N équivalente. D'après nos observations, on peut en conclure que les procédés à bioanodes ne seraient pas forcément viables pour la production de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> à grande échelle avec les flux mesurés jusqu'à présent, mais ces procédés permettent la synthèse d'azote assimilable sous forme de biomasse diazotrophe à des coûts en énergie très faibles. De même que pour ce qui a été montré avec la production de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, une meilleure gestion de nos rendements de récupération permettrait d'obtenir des demandes en énergie négatives.

### 1.2.2. Production de biomasse diazotrophe en biocathode

Dans mes travaux d'enrichissements de biocathode à fixation de N<sub>2</sub>, la production de biomasse a été évaluée par des mesures en qPCR des copies des gènes ADN<sub>r</sub> 16S. La masse bactérienne a été calculée à l'aide d'un facteur de conversion basé sur les données pour *E.*

*coli*. Des croissances de l'ordre de 0,9 et  $4,6 \times 10^{10}$  bactéries/L/j ont été estimées dans chacun de nos réacteurs ce qui est proche du  $0,5 \times 10^{10}$  bactéries/L/j rapporté par Rago et al. (2019). Ces productions de biomasse microbienne diazotrophe correspondent, d'après nos calculs, en considérant 11,4% de la biomasse sous forme d'azote, à une vitesse maximum d'assimilation de N dans la biomasse de  $1165 \mu\text{mol}_\text{N}/\text{h}/\text{m}^2$  sur la période allant de 131 à 214 jours d'enrichissement. La période suivante a vu la diminution de biomasse sur les cathodes et l'augmentation des vitesses de libération de  $\text{NH}_4^+$  jusqu'à près de 20 fois la vitesse mesurée avant les coupures de courant aux jours 230 et 260 des enrichissements. Cette observation correspond probablement à un phénomène de lyse d'une partie de la biomasse et des bactéries dégradant l'azote organique (L. Zhang et al., 2022). Cette vitesse de  $1165 \mu\text{mol}_\text{N}/\text{h}/\text{m}^2$  de production d'azote dans la biomasse microbienne diazotrophe correspond à une demande en énergie de 25,1 MJ/mol<sub>N</sub> en prenant en compte la récupération d'acétate et d' $\text{H}_2$ . On retrouve alors des demandes en énergie comparables avec celles mesurées pour la production de  $\text{NH}_4^+$  en bioanode mais toujours supérieures à celles de la biomasse microbienne diazotrophe sur anodes. Ces demandes en énergie sont également comparables avec la demande relevée pour la production de  $\text{NH}_4^+$  lors de la lyse bactérienne supposée pour PCE 2 entre 398 et 473 jours d'enrichissement. En effet, une demande de 77,1 MJ/mol<sub>NH4</sub> avait été estimée, ceci en absence de fixation de  $\text{N}_2$ .

Dans les autres travaux de la littérature utilisant des biocathodes, différentes quantités de biomasse ont pu être mesurées mais les demandes en énergie n'ont pas souvent été discutées. En absence d'inhibiteur de l'assimilation de  $\text{NH}_4^+$ , Liu et al (2017) ont mis en évidence une vitesse de  $8,9 \text{ mmol}_\text{N}/\text{h}/\text{m}^2$  ( $1,0 \text{ mmol}_\text{N}/\text{L}/\text{j}$ ) en utilisant *X. autotrophicus* et le  $\text{H}_2$  produit à la cathode en présence d' $\text{O}_2$  (Liu et al., 2017). Ces résultats sont très supérieurs à ceux qui avaient été observés par Rago et al. (2019) avec près de  $2,4 \mu\text{mol}_\text{N}/\text{h}/\text{m}^2$  ( $0,2 \text{ mg}_\text{N}/\text{L}/\text{j}$ ) pour une densité de courant moyenne relevée de quelques  $\text{mA}/\text{m}^2$  (Rago et al., 2019). Par ailleurs, Yadav et al. (2022) ont montré que les bactéries diazotrophes en biocathodes pouvaient également servir de source d'azote pour d'autres bactéries comme pour la production d'acétate (Yadav et al., 2022). Ils ont estimé la production de biomasse à  $557 \mu\text{mol}_\text{N}/\text{h}/\text{m}^2$  (ou  $0,76 \text{ mg}_\text{N}/\text{L}/\text{j}$ ) (Yadav et al., 2022). Les systèmes à biocathode utilisant le  $\text{N}_2$  comme source d'azote montrent donc des vitesses d'assimilation de la biomasse qui restent faibles en comparaison avec les procédés bioanodiques. Néanmoins, il semble que ce moyen de production soit suffisant pour servir de source d'azote pour d'autres procédés biologique comme l'ont montré Yadav et al. (2022).

### 1.2.3. Comparaison avec la production de biomasse diazotrophe phototrophe en BES (cyanobactéries, bactéries pourpres/verte)

L'utilisation de cathodes pour la production de biomasse microbienne diazotrophe peut être dans un premier temps discuté au regard de systèmes utilisant la lumière en présence de bactéries phototrophes. Ainsi, dans les travaux de Soundararajan et al. (2019) sur *Rhodospseudomonas palustris* TIE-1, il a été montré la possibilité d'utiliser des bactéries phototrophes et une cathode pour l'accumulation d'azote dans la biomasse microbienne à partir de fixation de  $N_2$  et  $CO_2$  (Soundararajan et al., 2019). L'utilisation de cette bactérie pourpre non sulfureuse dans un système de production d' $H_2$  (électrolyseur) avec un apport de lumière à 850nm a permis une production de près de  $20,3 \mu mol_N/L/j$  (soit  $0,76 mmol_N/h/m^2$  en rapportant à la taille de la cathode) avec  $CO_2$  et  $N_2$  comme sources de C et N (Soundararajan et al., 2019). Cette vitesse reste de l'ordre de grandeur des mesures dans les travaux précédents sur biocathode mais on notera un rendement faradique de 8,5% pour la fixation de  $N_2$  supérieur à celui mesuré par Liu et al. (2017) avec un rendement de 4,5% (Liu et al., 2017; Soundararajan et al., 2019). Cette « meilleure » utilisation du  $H_2$  produit pourrait s'expliquer par l'utilisation de lumière comme source d'énergie pour la croissance bactérienne. La quantité d'énergie nécessaire à la formation de cette biomasse n'a pas été calculée mais on peut supposer que la demande est plus faible que pour les autres systèmes à biocathode avec l'apport de lumière utilisable par cette bactérie pourpre non sulfureuse. Dong et al. (2021) ont aussi utilisé l'apport de lumière conjointement à l'électrochimie pour étudier la croissance de *Synechococcus elongatus*, une cyanobactérie non diazotrophe qu'ils ont modifié en ajoutant les gènes de la fixation de  $N_2$  à son génome. Ces expériences ont été faites en présence d'un médiateur pour le transport des électrons (Methyl Viologen). Ils ont montré une amélioration de la vitesse de fixation de  $N_2$  en BES en comparaison avec la fixation de  $N_2$  avec photosynthèse seule (21 fois plus) (Dong et al., 2021). Ils ont pu mettre en évidence une vitesse de production de  $NH_4^+$  de l'ordre de  $3,6 \mu mol_{NH_4}/L/h$  ce qui reste proche des résultats précédents (Tableau 6-1 et Tableau 6-2)

### 1.2.4. Comparaison avec la production de biomasse diazotrophe hydrogénotrophe

En plus des systèmes utilisant la lumière, on a vu que les bactéries hydrogénotrophes pouvaient apporter une solution pour la production de biomasse microbienne diazotrophe à bas coût en carbone. Il est alors intéressant d'utiliser des cathodes directement dans des cultures de bactéries hydrogénotrophes pour apporter le  $H_2$  nécessaire. C'est notamment ce qui a été fait par Liu et al (2017) avec *X. autotrophicus*. Des productions de biomasse de l'ordre du  $mmol_N/h/m^2$  ont été atteintes (Liu et al., 2017). Ces travaux ont montré la plus grande



assimilation en N en présence d'une cathode spécifiquement utilisée pour l'apport en H<sub>2</sub>. Une production intéressante a aussi été obtenue par Lu et al. (2021) lors de l'utilisation de la même bactérie et d'une cathode en Pt (Lu et al., 2020). Ces auteurs ont mis en évidence des concentrations en azote dans la biomasse bactérienne allant jusqu'à 570 et 190 mg<sub>N</sub>/L (6,8mmol<sub>N</sub>/L/j et 2,3mmol<sub>N</sub>/L/j) assimilés respectivement par *Xanthobacter autotrophicus* et *Bradyrhizobium japonicum*, cette dernière étant une bactérie modèle de la fixation de N<sub>2</sub> dans la rhizosphère (Lu et al., 2020). La cathode a permis de former des gradients en O<sub>2</sub> semblable aux gradients dans les nodules où l'O<sub>2</sub> est maintenu à un niveau assez faible pour ne pas inhiber la fixation de N<sub>2</sub> mais suffisant pour servir d'accepteur d'électrons aux bactéries aérobies (Lu et al., 2020). Cette vitesse de 6,8mmol<sub>N</sub>/L/j obtenue par Lu et al. (2020) est près de 30 fois supérieure aux vitesses d'assimilation d'azote mesurées sur nos biofilms cathodiques (Lu et al., 2020). La structure de l'électrode utilisée dans ces travaux, spécifiquement utilisée pour créer des zones microaérobies avec une structure en réseau de microfibres, a permis d'apporter les conditions d'oxygénation optimales à la croissance de biomasse à partir d'H<sub>2</sub>.

Dans des expériences d'enrichissement de biomasse diazotrophe hydrogénéotrophe à partir d'inocula environnementaux, une production de  $5,5 \times 10^6$  cellules/L/j a été observée (X. Hu et al., 2020). Cette production correspond à une accumulation d'environ 0,1 μmol<sub>N</sub>/L/j ce qui est très inférieur à ce qui a pu être mesuré en présence de cathodes. De même pour les enrichissements de bactéries diazotrophes hydrogénéotrophes réalisés au cours de mes travaux de thèse où une concentration bactérienne de  $1,3 \times 10^9$  bactéries/L a été mesurée. Cette concentration a cependant été atteinte après la lyse des bactéries de ces enrichissements initialement à  $1,1 \times 10^{12}$  bactéries/L, il est donc difficile d'estimer la fixation de N<sub>2</sub> dans la biomasse mais la mesure de la réduction de l'acétylène (ARA) a montré des vitesses similaires à celles des enrichissements sur cathode pour un même volume (Figure 4-1). Ces vitesses similaires pourraient s'expliquer par une fixation de N<sub>2</sub> non activée pour une partie de la biomasse des enrichissements sur cathode et donc des interactions au sein de la communauté qui participent à la formation de biomasse qui n'ont pas eu lieu dans nos enrichissements de bactérie hydrogénéotrophes.

## 2. PERSPECTIVES : ETUDE DES MECANISMES DE LA FIXATION DE N<sub>2</sub>

### 2.1. Par la variation des potentiels appliqués

Afin d'assurer une meilleure fixation sur les anodes, il a été montré que l'utilisation d'un potentiel de -0,15V vs SHE appliqué à une anode était plus favorable que des potentiels plus

élevés avec *G. sulfurreducens* (Ortiz-Medina et al., 2023). Cette amélioration semble liée à une augmentation de la transcription des gènes de la fixation de N<sub>2</sub>. Il pourrait alors être intéressant de faire de même à la cathode avec une bactérie électrotrophe diazotrophe pour étudier les changements dans la transcription des gènes de fixation de N<sub>2</sub> mais aussi des hydrogénases et des enzymes impliquées dans le transfert des électrons comme les cytochromes. Ces observations permettraient de mieux comprendre la gestion des électrons dans ces bactéries et viser à l'amélioration des rendements faradiques en favorisant l'utilisation des électrons dans la fixation de N<sub>2</sub>. Le suivi de la transcription de gène de la fixation du CO<sub>2</sub> pourrait aussi apporter des compléments aux observations de Zhang et al. (2022) sur l'importance de l'association des deux modes de fixation (CO<sub>2</sub> et N<sub>2</sub>) (L. Zhang et al., 2022). Pour ce faire, les potentiels appliqués pourraient être amenés à varier autour des -0,7V vs SHE comme ceux utilisés dans nos travaux en passant d'un potentiel plus bas mais favorable à une forte évolution d'H<sub>2</sub> à un potentiel plus élevé qui ne permettrait pas la production d'H<sub>2</sub> mais serait suffisant pour la réduction d'O<sub>2</sub>.

Il serait également intéressant de mettre en place des systèmes utilisant d'autres bactéries connues comme fixatrice de N<sub>2</sub> comme certains *Azospirillum* déjà retrouvés sur des électrodes (Manchon et al., 2023) ou des *Azotobacter* connus pour la fixation de N<sub>2</sub> (Aasfar et al., 2021). Il serait possible de cultiver des souches de ces genres bactériens à différent potentiel et avec des suivis des courbes intensité/potentiel en plus de l'analyse transcriptomique, pour déterminer les applications de ces bactéries en BES pour la fixation de N<sub>2</sub>.

## 2.2. Par l'association de différents métabolismes et/ou ingénierie génétique

Sur des bioanodes, la capacité de fixation de N<sub>2</sub> est déjà documentée pour *G. sulfurreducens* qui est déjà un modèle de ces systèmes. Il serait toutefois utile d'étudier les possibles interactions que *G. sulfurreducens* peut avoir avec d'autres bactéries pour participer à des échanges d'azote avec le reste de la communauté. C'est ce qu'avait mis en évidence Ortiz-Medina et al. (2019) avec l'azote fixé possiblement utilisé par des archées méthanogènes à la cathode (Ortiz-Medina et al., 2019). Dans leurs travaux, des inhibiteurs de l'assimilation de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> avaient été utilisés. De leur côté, Jing et al. (2022) ont sélectionné une communauté bactérienne dont tous les membres n'étaient pas référencés comme des bactéries fixatrices de N<sub>2</sub> (Jing et al., 2022). Cependant ils n'ont pas observé de libération de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, ce qui peut suggère que l'azote fixé n'est pas échangé sous forme de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, ou que s'il est échangé sous forme de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, il est assimilé aussi vite qu'il est produit. Une meilleure compréhension de ce phénomène participerait à la compréhension des échanges ayant lieu dans ces systèmes pour

étudier la faisabilité de l'utilisation d'une bioanode comme source d'azote pour d'autres bactéries.

Pour les travaux sur des biocathodes, on peut proposer l'assemblage de bactéries électrotrophes non diazotrophes et de bactéries diazotrophes incapables d'utiliser la cathode comme source d'énergie. Cette association permettrait de mettre en lumière un possible échange de l'azote fixé.

L'étude de ces associations permettrait de mieux comprendre les interactions mises en œuvre lors de la fixations conjointes de CO<sub>2</sub> et N<sub>2</sub> (J. Hu et al., 2015; X. Hu et al., 2022). Des méthodes de suivi de la transcription dans ces cultures en comparaison avec des cultures pures permettraient aussi de mettre en lumière les moyens de communication utilisés entre bactéries et peut-être, en adéquation avec les travaux sur les potentiels, permettre de piloter les interactions entre bactéries fixatrices à partir des potentiels appliqués.

Pour mieux contrôler la fixation de N<sub>2</sub> en biocathode, on pourrait aussi suggérer l'ingénierie génétique comme proposé par Dong et al. (2021) qui ont travaillé sur une cyanobactérie, *Synechoccus elongatus* qui a été modifiée pour fixer le N<sub>2</sub>. On pourrait de même proposer la modification de bactéries électrotrophes non fixatrices de N<sub>2</sub> telles que *Sporomusa ovata*.

### 2.3. Par l'amélioration du modèle des interactions

Mes enrichissements sur biocathode m'ont permis de faire des hypothèses sur un modèle de la fixation de N<sub>2</sub> dans les communautés mixtes électrotrophes. J'avais supposé des interactions via l'acétate produit qui représenterait une source de carbone organique nécessaire pour certains membres de la communauté. Mes travaux en cultures pures n'ont pas permis de tester cette hypothèse en raison des contaminations. De nouveaux travaux avec des souches similaires serait à envisager pour valider notre modèle. Il serait également intéressant d'ajouter d'autres souches que l'on suppose responsables de la réduction du CO<sub>2</sub> comme des souches appartenant à la famille des *Clostridiaceae* observées sur nos cathodes d'enrichissement. Ainsi, des bactérie référencée comme homoacétogènes telles que *Clostridium ljungdahlii* (Cotter et al., 2009) qui est également capable de fixation de N<sub>2</sub> (Tremblay et al., 2012) ou *Sporomusa ovata* qui n'a pas montré de fixation de N<sub>2</sub> (Cestellos-Blanco et al., 2022) serait intéressantes à tester. Dans le cas de la croissance de *S. ovata* avec une bactérie fixatrice de N<sub>2</sub>, la croissance des deux souches permettrait ainsi de compléter les hypothèses sur les interactions avec un possible échange d'azote fixé. Un suivi de la transcription de certains gènes, en comparaison avec des cultures de bactéries pures, aiderait à mettre en lumière si des changements de métabolisme ont lieu comme une augmentation

de la transcription en nitrogénase du fait de la présence d'une bactérie non fixatrice de N<sub>2</sub> par exemple.

L'autre type d'interaction dont j'ai fait l'hypothèse, aussi bien dans les enrichissements que dans les travaux en souches pures, concerne la gestion de la concentration en O<sub>2</sub>. Dans les enrichissements, la réduction d'O<sub>2</sub> a pu avoir lieu à la fois directement sur la cathode et via les microorganismes aérobies. Pour mes travaux en souches pures, j'avais choisi des bactéries aérobies (*A. lipoferum* et *C. testosteroni*) et des bactéries strictement anaérobies (*Desulforamulus/Desulfotomaculum*). Les travaux sur la coculture entre *A. lipoferum* et *D. ruminis* avaient pour objectif de démontrer la possibilité pour *A. lipoferum* de créer des zones anaérobies favorables à la croissance de *D. ruminis*. L'association de bactéries aérobies capables d'oxyder H<sub>2</sub> avec des bactéries anaérobies pourrait ainsi être une voie pour favoriser la croissance de biomasse sur les biocathodes. L'utilisation d'autres accepteurs d'électrons, tels que les sulfates, serait aussi intéressante à étudier. On peut proposer l'utilisation de bactéries sulfato-réductrices et de bactéries oxydantes d'H<sub>2</sub> toutes capables de fixer N<sub>2</sub> et on suppose que ce type d'interaction permettrait un meilleur développement bactérien qu'en absence d'interactions. Là aussi, l'utilisation de bactéries diazotrophes ou non et les suivis de la transcription de certains gènes (i.e. : *nifH*) aideraient à mieux comprendre les interactions basées sur les échanges d'azote et la gestion de l'oxygénation du système.

### 3. PERSPECTIVES : AMELIORATION DE LA CROISSANCE DE LA BIOMASSE CATHODIQUE DIAZOTROPHE

#### 3.1. Par l'optimisation de l'apport en oxygène

Dans les systèmes cathodiques, une gestion de la présence d'O<sub>2</sub> a déjà été étudiée avec des souches pures par Lu et al (2020) avec la formation de biomasse en conditions microaérobies (Lu et al., 2020). Il a aussi été montré que des zones d'anoxies se formaient en profondeur dans la cathode en réseau de microfibre (C. Liu et al., 2015). La formation de ces zones anoxiques serait un avantage pour nos modèles de fixation de N<sub>2</sub> pour la production de biomasse. En effet, la fixation du CO<sub>2</sub> se fait généralement par des bactéries anaérobies qui pourraient alors se développer dans ces zones. C'est d'ailleurs ce qui a été démontré dans les travaux de Liu et al. (2015) avec des cathodes en réseau de microfibres permettant la fixation de CO<sub>2</sub> en acétate par *Sporomusa ovata* en conditions aérobies (C. Liu et al., 2015). On propose donc d'utiliser à la fois cette gestion de l'O<sub>2</sub> pour la fixation de N<sub>2</sub> mais aussi pour la fixation du CO<sub>2</sub>. On peut imaginer que les bactéries anaérobies se développeraient au plus profond de la cathode en réseau de microfibres où l'O<sub>2</sub> n'est plus présent. En utilisant des bactéries électrotrophes acétogènes anaérobies, la fixation de CO<sub>2</sub> servirait de source de matière

organique pour des bactéries hétérotrophes diazotrophes au niveau des pointes des microfibrilles, là où l'O<sub>2</sub> est encore présent mais à des concentrations assez faibles pour servir d'accepteur d'électrons sans inhiber les nitrogénases.

Il serait également possible de faire varier l'apport d'O<sub>2</sub> à des souches diazotrophes utilisées dans des chambres cathodiques pour suivre l'impact sur les densités de courant, la croissance et la fixation de N<sub>2</sub> et/ou CO<sub>2</sub> et en déterminer une concentration ou une architecture d'électrode idéale pour les différents points suivis.

Dans nos travaux, l'inhibition de la nitrogénase par O<sub>2</sub> n'a pas été suivie mais la mesure de cette inhibition à des concentrations variables en O<sub>2</sub> avec un suivi de la transcription des gènes de régulation des nitrogénases (notamment *nifA* et *nifL*) pourrait participer à mieux comprendre les mécanismes de protection utilisée et comment les exploiter pour améliorer les productions dans les BES pour la fixation de N<sub>2</sub>.

### 3.2. Par l'association de différents métabolismes

Comme démontré par Zhang et al. (2022), la fixation de N<sub>2</sub> serait liée à la fixation de CO<sub>2</sub>. De même, nous avons vu que l'association de bactéries hydrogénotrophes et diazotrophes associées à des bactéries hétérotrophes non fixatrices de N<sub>2</sub> pouvait favoriser la fixation de N<sub>2</sub> (et CO<sub>2</sub>). Afin de mieux comprendre ces interactions et comment les exploiter pour améliorer la production de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ou la formation de biomasse (diazotrophe ou non), on pourrait envisager des cultures de plusieurs bactéries avec des métabolismes différents pour identifier quelles seraient les meilleures associations. En utilisant des métabolismes similaires à ceux observés par Zhang et al. (2022), on pourrait s'attendre à une plus grande production de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> mais il serait aussi intéressant de chercher à optimiser la croissance de biomasse comme par l'association de bactéries fixatrices d'azote hétérotrophes et non fixatrices d'azote mais électrotrophes et fixatrices de CO<sub>2</sub>. Avec les travaux précédents sur les études des interactions, le choix de différents métabolismes sera plus facile à orienter. On pourrait envisager le couplage d'une bactérie modèle en électrosynthèse microbienne *Sporomusa* (Aryal et al., 2017) (ou *Desulfohalobium* comme vu dans nos enrichissements) en association avec une bactérie hétérotrophe diazotrophe aérobie comme une bactérie du genre *Azotobacter* (Aasfar et al., 2021). L'étude des associations de ces différentes bactéries participerait à une meilleure gestion de la fixation de N<sub>2</sub> dans ces systèmes en permettant théoriquement d'améliorer les vitesses de production et/ou diminuer la demande en énergie. On peut aussi, en fonction des interactions observées, être amené à utiliser des métabolismes bactériens différents dans des systèmes différents. On pourrait par exemple avoir la fixation de CO<sub>2</sub> dans un compartiment et la fixation de N<sub>2</sub> dans un autre comme ce qui a été proposé

par Mishra et al. (2020) en remplaçant la réduction électrocatalysée de  $N_2$  par une fixation de  $N_2$  par une biocathode et en soutirant les effluents contenant des traces de  $NH_4^+$ . Ce type de système apporterait comme avantage de diminuer le temps de rétention de la phase liquide des biocathodes qui, une fois chargée en  $NH_4^+$  ou autre forme de N, qui est inhibitrice pour la fixation de  $N_2$  (voir Annexe inhibition des nitrogénases).

### *3.3. Par l'optimisation du rapport surface d'électrode sur volume du bioprocédé*

Les cathodes utilisées par Lu et al (2022) et Liu et al. (2015) formées de réseaux de microfibres ont permis la formation de gradients en  $O_2$  favorables à la fixation de  $N_2$  et  $CO_2$ . Ces électrodes présentent aussi l'avantage d'augmenter la surface d'échange de l'électrode. En effet, on suppose que pour améliorer la fixation de  $N_2$  dans une biocathode, la quantité de biomasse fixatrice de  $N_2$  sur la cathode est un facteur limitant du fait de nos observations sur nos enrichissements (cathodique vs  $H_2$ ). En effet, j'ai observé des différences importantes entre les concentrations en bactéries sur les cathodes et celles dans les bouteilles avec  $H_2$ . Or une des explications possibles de cette différence pourrait être dans la présence d'une surface sur laquelle un biofilm se forme. Pour améliorer le développement de biomasse, on peut donc envisager d'utiliser des cathodes offrant une plus grande surface par rapport au volume du réacteur. Une évaluation des designs favorisant à la fois la formation de gradient en  $O_2$  et un grand rapport surface/volume pour permettre le dépôt d'un plus grand biofilm serait nécessaire. Les réseaux à microfibre comme ceux de Liu et al. (2015) et Lu et al. (2020) serait un premier design à expérimenter avec des matériaux biocompatibles (C. Liu et al., 2015; Lu et al., 2020). La vitesse de fixation de  $N_2$  normalisée à la taille des électrodes devrait rester du même ordre de grandeur que dans nos observations mais la vitesse rapportée au volume du réacteur serait augmentée.

L'utilisation de granules pour les cathodes pourrait être un autre outil pour permettre l'augmentation de surface des électrodes (D. Liu et al., 2018). C'est notamment ce qui a été fait dans les travaux de Wong et al. (2014) pour la formation de bioanodes.

## **4. PERSPECTIVES : APPLICATION DE LA FIXATION DE $N_2$ DANS LES BES**

La fixation de  $N_2$  a été démontrée aussi bien en bioanode (Wong et al., 2014) que dans des biocathodes (Rago et al., 2019). Les performances de ces systèmes, surtout en termes de vitesse mais aussi en termes de besoins en énergie, restent des points limitants pour envisager leur utilisation comme un moyen de production d'une source d'azote utilisable comme

engrais. Cependant, ces systèmes ont montré leur efficacité pour la croissance de biomasse microbienne sans source d'azote assimilable et ont permis d'autres réactions comme la production de méthane en MEC (Ortiz-Medina et al., 2019). On pourrait donc envisager d'utiliser des bactéries diazotrophes en BES comme source d'azote pour d'autres procédés. C'est ce qu'ont montré Yadav et al. (2022) avec des travaux sur l'électrosynthèse microbienne d'acétate sans autre source d'azote que le  $N_2$ . Ils ont démontré qu'il était possible d'utiliser la fixation de  $N_2$  dans ce type de système avec une production d'acétate avec un rendement faradique de 85% (Yadav et al., 2022). Ce qui permet de se passer de l'apport de  $NH_4Cl$  et donc des rejets de gaz à effet de serre liés à sa production. On peut donc chercher à utiliser des biocathodes et bioanodes avec fixation de  $N_2$  dans différentes conditions d'aérations pour permettre de subvenir aux besoins en azote d'autres procédés. Par exemple, dans les procédés décrits par Mishra et al. (2020) pour la production de protéines à partir d'électricité. Des bactéries sont utilisées pour la fixation de  $CO_2$  à partir d' $H_2$  produit par électrolyse de l'eau dans un autre système. Le  $NH_3$  est utilisé comme source d'azote produit par réduction électrocatalysée (Mishra et al., 2020). Il serait alors intéressant de voir la possible utilisation d'une biocathode directement dans le système, ce qui permettrait de réaliser la fixation de  $N_2$  in-situ.

En suivant le même raisonnement, on pourrait imaginer utiliser des anodes dans des systèmes anaérobies à rapport C/N élevé pour la dégradation de déchets, comme proposé dans les différents travaux sur des bioanodes avec fixation de  $N_2$  (Jing et al., 2022; Ortiz-Medina et al., 2019).

Les travaux sur les bactéries phototrophes donnent aussi de nouvelles perspectives pour les systèmes bioélectrochimiques microbiens en ajoutant la lumière comme source d'énergie. C'est notamment ce qui a permis de réduire le potentiel appliqué et la demande en énergie dans les expériences de Soundararajan et al. (2019) avec *Rhodopseudomonas palustris* et dans les travaux Dong et al. (2021) avec *Synechococcus elongatus*. Les travaux de Manchon et al. (2022) proposent justement d'avoir recours aux bactéries pourpres phototrophes pour la production de biomasse à partir d'un apport en électricité. En effet, ils ont montré la capacité de bactéries du genre *Rhodopseudomonas* à utiliser les électrons apportés à une cathode pour les échanger avec d'autres genres bactériens. Ils ont notamment observé la présence de bactéries du genre *Azospirillum* qu'ils supposent avoir utilisé des électrons récupérés à la cathode par les *Rhodopseudomonas* à un potentiel ne permettant pas la formation d' $H_2$  (-0,6V vs Ag/AgCl) (Manchon et al., 2023). Ils n'ont pas pu mettre en évidence les intermédiaires utilisés au cours de ces échanges mais ils ont supposé que des capacités de respiration extracellulaire de *Azospirillum* ont été utilisées (Manchon et al., 2023). Ces deux bactéries ont montré la capacité de fixer  $N_2$ , seule pour *R. palustris* TIE-1 et dans des communautés pour

*Azospirillum*, on pourrait donc envisager d'utiliser ce type de système en condition de fixation de N<sub>2</sub> avec une réduction de la demande en énergie de la fixation par l'utilisation de la phototrophie des bactéries pourpres.



## Références

- Aasfar, A., Bargaz, A., Yaakoubi, K., Hilali, A., Bennis, I., Zeroual, Y., & Meftah Kadmiri, I. (2021). Nitrogen Fixing Azotobacter Species as Potential Soil Biological Enhancers for Crop Nutrition and Yield Stability. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.628379>
- Alburquerque, J. A., de la Fuente, C., Campoy, M., Carrasco, L., Nájera, I., Baixauli, C., Caravaca, F., Roldán, A., Cegarra, J., & Bernal, M. P. (2012). Agricultural use of digestate for horticultural crop production and improvement of soil properties. *European Journal of Agronomy*, 43, 119–128. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2012.06.001>
- Arunasri, K., & Mohan, S. V. (2019). Chapter 2.3 - Biofilms: Microbial Life on the Electrode Surface. In S. V. Mohan, S. Varjani, & A. Pandey (Eds.), *Microbial Electrochemical Technology* (pp. 295–313). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64052-9.00011-X>
- Aryal, N., Tremblay, P.-L., Lizak, D. M., & Zhang, T. (2017). Performance of different Sporomusa species for the microbial electrosynthesis of acetate from carbon dioxide. *Bioresource Technology*, 233, 184–190. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.02.128>
- Aullo, T., Ranchou-Peyruse, A., Ollivier, B., & Magot, M. (2013). Desulfotomaculum spp. And related gram-positive sulfate-reducing bacteria in deep subsurface environments. *Frontiers in Microbiology*, 4. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00362>
- Ayilara, M. S., Olanrewaju, O. S., Babalola, O. O., & Odeyemi, O. (2020). Waste Management through Composting: Challenges and Potentials. *Sustainability*, 12(11), Article 11. <https://doi.org/10.3390/su12114456>
- Bagali, S. (2012). Review: Nitrogen fixing microorganisms. *Int. J. Microbiol. Res.*, 3, 46–52. <https://doi.org/10.5829/idosi.ijmr.2012.3.1.61103>
- Baldani, I., Videira, S., Teixeira, K., & Reis, V. (2014). The Family Rhodospirillaceae. In *The Prokaryotes: Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria* (pp. 533–618). [https://doi.org/10.1007/978-3-642-30197-1\\_300](https://doi.org/10.1007/978-3-642-30197-1_300)
- Berardi, S., Drouet, S., Francàs, L., Gimbert-Suriñach, C., Guttentag, M., Richmond, C., Stoll, T., & Llobet, A. (2014). Molecular artificial photosynthesis. *Chemical Society Reviews*, 43(22), 7501–7519. <https://doi.org/10.1039/C3CS60405E>
- Bergersen, F. J. (1970). The Quantitative Relationship between Nitrogen Fixation and the Acetylene-Reduction Assay. *Australian Journal of Biological Sciences*, 23(4), Article 4. <https://doi.org/10.1071/bi9701015>
- Berthrong, S. T., Yeager, C. M., Gallegos-Graves, L., Steven, B., Eichorst, S. A., Jackson, R. B., & Kuske, C. R. (2014). Nitrogen Fertilization Has a Stronger Effect on Soil Nitrogen-Fixing Bacterial Communities than Elevated Atmospheric CO<sub>2</sub>. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(10), 3103–3112. <https://doi.org/10.1128/AEM.04034-13>

- Bertics, V. J., Löscher, C. R., Salonen, I., Dale, A. W., Gier, J., Schmitz, R. A., & Treude, T. (2013). Occurrence of benthic microbial nitrogen fixation coupled to sulfate reduction in the seasonally hypoxic Eckernförde Bay, Baltic Sea. *Biogeosciences*, *10*(3), 1243–1258. <https://doi.org/10.5194/bg-10-1243-2013>
- Bothe, H., Schmitz, O., Yates, M. G., & Newton, W. E. (2010). Nitrogen Fixation and Hydrogen Metabolism in Cyanobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *74*(4), Article 4. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00033-10>
- Bowers, T. H., Reid, N. M., & Lloyd-Jones, G. (2008). Composition of nifH in a wastewater treatment system reliant on N<sub>2</sub> fixation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *79*(5), 811–818. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1486-2>
- Boyd, E., & Peters, J. (2013). New insights into the evolutionary history of biological nitrogen fixation. *Frontiers in Microbiology*, *4*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00201>
- Bratsch, S. G. (1989). Standard Electrode Potentials and Temperature Coefficients in Water at 298.15 K. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, *18*(1), 1–21. <https://doi.org/10.1063/1.555839>
- Bueno Batista, M., & Dixon, R. (2019). Manipulating nitrogen regulation in diazotrophic bacteria for agronomic benefit. *Biochemical Society Transactions*, *47*(2), 603–614. <https://doi.org/10.1042/BST20180342>
- Burgess, B. K., & Lowe, D. J. (1996). Mechanism of Molybdenum Nitrogenase. *Chemical Reviews*, *96*(7), 2983–3012. <https://doi.org/10.1021/cr950055x>
- Burris, R. H., & Roberts, G. P. (1993). Biological Nitrogen Fixation. *Annual Review of Nutrition*, *13*(1), 317–335. <https://doi.org/10.1146/annurev.nu.13.070193.001533>
- Carmona-Martínez, A. A., Trably, E., Milferstedt, K., Lacroix, R., Etcheverry, L., & Bernet, N. (2015). Long-term continuous production of H<sub>2</sub> in a microbial electrolysis cell (MEC) treating saline wastewater. *Water Research*, *81*, 149–156. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.05.041>
- Carr, P. M., Cavigelli, M. A., Darby, H., Delate, K., Eberly, J. O., Fryer, H. K., Gramig, G. G., Heckman, J. R., Mallory, E. B., Reeve, J. R., Silva, E. M., Suchoff, D. H., & Woodley, A. L. (2020). Green and animal manure use in organic field crop systems. *Agronomy Journal*, *112*(2), 648–674. <https://doi.org/10.1002/agj2.20082>
- Cassan, F., & García de Salamone, I. (2008). *Azospirillum: Cell physiology, plant response, agronomic and environmental research in Argentina*, ISBN : [978-987-98475-8-9](https://doi.org/10.1002/agj2.20082).
- Cestellos-Blanco, S., Chan, R. R., Shen, Y., Kim, J. M., Tacken, T. A., Ledbetter, R., Yu, S., Seefeldt, L. C., & Yang, P. (2022). Photosynthetic biohybrid coculture for tandem and tunable CO<sub>2</sub> and N<sub>2</sub> fixation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *119*(26), e2122364119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2122364119>

- Chakraborty, T., & Akhtar, N. (2021). Biofertilizers: Prospects and Challenges for Future. In *Biofertilizers* (pp. 575–590). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781119724995.ch20>
- Chen, H., Yuan, D., Wu, A., Lin, X., & Li, X. (2021). Review of low-temperature plasma nitrogen fixation technology. *Waste Disposal & Sustainable Energy*, 3(3), 201–217. <https://doi.org/10.1007/s42768-021-00074-z>
- Chen, H., Zheng, C., Qiao, Y., Du, S., Li, W., Zhang, X., Zhao, Z., Cao, C., & Zhang, W. (2021). Long-term organic and inorganic fertilization alters the diazotrophic abundance, community structure, and co-occurrence patterns in a vertisol. *Science of The Total Environment*, 766, 142441. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142441>
- Chen, S., Jing, X., Yan, Y., Huang, S., Liu, X., Chen, P., & Zhou, S. (2020). Bioelectrochemical nitrogen fixation to extracellular ammonium by *Pseudomonas stutzeri*. *Applied and Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/AEM.01998-20>
- Chen, X., Ma, C., Tan, Z., Wang, X., Qian, X., Zhang, X., Tian, J., Yan, S., & Shao, M. (2022). One-dimensional screw-like MoS<sub>2</sub> with oxygen partially replacing sulfur as an electrocatalyst for the N<sub>2</sub> reduction reaction. *Chemical Engineering Journal*, 433, 134504. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.134504>
- Cherkasov, N., Ibhaddon, A. O., & Fitzpatrick, P. (2015). A review of the existing and alternative methods for greener nitrogen fixation. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 90, 24–33. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2015.02.004>
- Chew, K. W., Chia, S. R., Yen, H.-W., Nomanbhay, S., Ho, Y.-C., & Show, P. L. (2019). Transformation of Biomass Waste into Sustainable Organic Fertilizers. *Sustainability*, 11(8), Article 8. <https://doi.org/10.3390/su11082266>
- Chittora, D., Meena, M., Barupal, T., Swapnil, P., & Sharma, K. (2020). Cyanobacteria as a source of biofertilizers for sustainable agriculture. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 22, 100737. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2020.100737>
- Choi, J., Suryanto, B. H. R., Wang, D., Du, H.-L., Hodgetts, R. Y., Ferrero Vallana, F. M., MacFarlane, D. R., & Simonov, A. N. (2020). Identification and elimination of false positives in electrochemical nitrogen reduction studies. *Nature Communications*, 11(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19130-z>
- Chung, H., Ju, W. J., Jho, E. H., & Nam, K. (2016). Applicability of a submersible microbial fuel cell for Cr(VI) detection in water. *Environmental Monitoring and Assessment*, 188(11), 613. <https://doi.org/10.1007/s10661-016-5625-4>
- Colnaghi, R., Green, A., He, L., Rudnick, P., & Kennedy, C. (1997). Strategies for increased ammonium production in free-living or plant associated nitrogen fixing bacteria. *Plant and Soil*, 194(1), 145–154. <https://doi.org/10.1023/A:1004268526162>
- Cotter, J. L., Chinn, M. S., & Grunden, A. M. (2009). Ethanol and acetate production by *Clostridium ljungdahlii* and *Clostridium autoethanogenum* using resting cells.

- Bioprocess and Biosystems Engineering*, 32(3), 369–380.  
<https://doi.org/10.1007/s00449-008-0256-y>
- Cruz-Hernández, M. A., Mendoza-Herrera, A., Bocanegra-García, V., & Rivera, G. (2022). Azospirillum spp. From Plant Growth-Promoting Bacteria to Their Use in Bioremediation. *Microorganisms*, 10(5), Article 5.  
<https://doi.org/10.3390/microorganisms10051057>
- Darnajoux, R., Reji, L., Zhang, X. R., Luxem, K. E., & Zhang, X. (2022). Ammonium Sensitivity of Biological Nitrogen Fixation by Anaerobic Diazotrophs in Cultures and Benthic Marine Sediments. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences*, 127(7), e2021JG006596.  
<https://doi.org/10.1029/2021JG006596>
- De Corato, U. (2020). Agricultural waste recycling in horticultural intensive farming systems by on-farm composting and compost-based tea application improves soil quality and plant health: A review under the perspective of a circular economy. *Science of The Total Environment*, 738, 139840. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139840>
- Delgado, M. j., Garrido, J. m., Ligeró, F., & Lluch, C. (1993). Nitrogen fixation and carbon metabolism by nodules and bacteroids of pea plants under sodium chloride stress. *Physiologia Plantarum*, 89(4), 824–829. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1993.tb05291.x>
- Delwiche, C. C. (1970). THE NITROGEN CYCLE. *Scientific American*, 223(3), 136–147. JSTOR, ISSN [00368733](https://doi.org/10.1086/38733), [19467087](https://doi.org/10.1086/387087).
- Desmond-Le Quémener, E., Bridier, A., Tian, J.-H., Madigou, C., Bureau, C., Qi, Y., & Bouchez, T. (2019). Biorefinery for heterogeneous organic waste using microbial electrochemical technology. *Bioresource Technology*, 292, 121943.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121943>
- Dixon, R., & Kahn, D. (2004). Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nature Reviews Microbiology*, 2(8), Article 8. <https://doi.org/10.1038/nrmicro954>
- Dong, F., Lee, Y. S., Gaffney, E. M., Grattieri, M., Haddadin, H., Minteer, S. D., & Chen, H. (2021). An engineered, non-diazotrophic cyanobacterium and its application in bioelectrochemical nitrogen fixation. *Cell Reports Physical Science*, 100444.  
<https://doi.org/10.1016/j.xcrp.2021.100444>
- Dos Santos, P. C., Fang, Z., Mason, S. W., Setubal, J. C., & Dixon, R. (2012). Distribution of nitrogen fixation and nitrogenase-like sequences amongst microbial genomes. *BMC Genomics*, 13(1), 162. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-162>
- Dumon, A. (2019). *L'évolution de la modélisation de l'oxydoréduction: Vol. N° 443 (Septembre 2019)*, p. 54-59, ISSN: 0151-9093,  
<https://www.researchgate.net/publication/335652998>
- Dynarski, K. A., & Houlton, B. Z. (2018). Nutrient limitation of terrestrial free-living nitrogen fixation. *New Phytologist*, 217(3), 1050–1061. <https://doi.org/10.1111/nph.14905>

- Eady, R. R. (2003). Current status of structure function relationships of vanadium nitrogenase. *Coordination Chemistry Reviews*, 237(1), 23–30. [https://doi.org/10.1016/S0010-8545\(02\)00248-5](https://doi.org/10.1016/S0010-8545(02)00248-5)
- Eliaz, N., & Gileadi, E. (2019). *Physical Electrochemistry: Fundamentals, Techniques, and Applications*. John Wiley & Sons. ISBN : [978-3-527-34139-9](https://doi.org/10.1002/9781118413999).
- Engel, C. E. A., Vorländer, D., Biedendieck, R., Krull, R., & Dohnt, K. (2020). Quantification of microaerobic growth of *Geobacter sulfurreducens*. *PLoS ONE*, 15(1), e0215341. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215341>
- Fani, R., Gallo, R., & Liò, P. (2000). Molecular Evolution of Nitrogen Fixation: The Evolutionary History of the nifD, nifK, nifE, and nifN Genes. *Journal of Molecular Evolution*, 51(1), 1–11. <https://doi.org/10.1007/s002390010061>
- Fatemi, R., Hoseini, S. M. B., Moghadam, H., Motesarezadeh, B., & Ahmadabadi, Z. (2023). How biofertilizers and intercropping pattern affect yield and nitrogen efficiency indices of maize? *Arabian Journal of Geosciences*, 16(6), 378. <https://doi.org/10.1007/s12517-023-11450-w>
- Fay, P. (1992). Oxygen relations of nitrogen fixation in cyanobacteria. *Microbiological Reviews*, 56(2), 340–373. <https://doi.org/10.1128/mr.56.2.340-373.1992>
- Fu, C., & Knowles, R. (1988). H<sub>2</sub> supports nitrogenase activity in carbon-starved *Azospirillum lipoferum* and *A. amazonense*. *Canadian Journal of Microbiology*, 34(6), 825–829. <https://doi.org/10.1139/m88-141>
- Gaby, J. C., & Buckley, D. H. (2012). A Comprehensive Evaluation of PCR Primers to Amplify the nifH Gene of Nitrogenase. *PLoS ONE*, 7(7), e42149. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042149>
- Gallon, J. R. (1981). The oxygen sensitivity of nitrogenase: A problem for biochemists and micro-organisms. *Trends in Biochemical Sciences*, 6, 19–23. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(81\)90008-6](https://doi.org/10.1016/0968-0004(81)90008-6)
- Gallon, J. R. (2001). N<sub>2</sub> fixation in phototrophs: Adaptation to a specialized way of life. *Plant and Soil*, 230(1), 39–48. <https://doi.org/10.1023/A:1004640219659>
- Giddey, S., Badwal, S. P. S., & Kulkarni, A. (2013). Review of electrochemical ammonia production technologies and materials. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38(34), 14576–14594. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.09.054>
- Glasstone, S. (2011). *An Introduction to Electrochemistry*. Read Books Ltd. ISBN : [978-1-4465-4546-1](https://doi.org/10.1002/9781118413999).
- Hardy, R. W. F., Burns, R. C., & Holsten, R. D. (1973). Applications of the acetylene-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation. *Soil Biology and Biochemistry*, 5(1), 47–81. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(73\)90093-X](https://doi.org/10.1016/0038-0717(73)90093-X)
- Harindintwali, J. D., Wang, F., Yang, W., Zhou, J., Muhoza, B., Mugabowindekwe, M., & Yu, X. (2022). Harnessing the power of cellulolytic nitrogen-fixing bacteria for biovalorization

- of lignocellulosic biomass. *Industrial Crops and Products*, 186, 115235. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.115235>
- Hartmann, A., & Burris, R. H. (1987). Regulation of nitrogenase activity by oxygen in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*. *Journal of Bacteriology*, 169(3), 944–948. <https://doi.org/10.1128/jb.169.3.944-948.1987>
- Heldal, M., Norland, S., & Tumyr, O. (1985). X-ray microanalytic method for measurement of dry matter and elemental content of individual bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 50(5), 1251–1257. <https://doi.org/10.1128/aem.50.5.1251-1257.1985>
- Hickey, W. (2022). *How Nitrogenase Works*. <https://wisc.pb.unizin.org/nitrogencycle/>
- Hill, S. (1988). How is nitrogenase regulated by oxygen? *FEMS Microbiology Reviews*, 4(2), 111–129. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1988.tb02738.x>
- Hu, J., Wang, L., Zhang, S., Xi, X., Le, Y., Fu, X., Tsang, Y., & Gao, M. (2015). Interactions Between Autotrophic and Heterotrophic Strains Improve CO<sub>2</sub> Fixing Efficiency of Non-photosynthetic Microbial Communities. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 176(5), 1459–1471. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1657-4>
- Hu, X., Kerckhof, F.-M., Ghesquière, J., Bernaerts, K., Boeckx, P., Clauwaert, P., & Boon, N. (2020). Microbial Protein out of Thin Air: Fixation of Nitrogen Gas by an Autotrophic Hydrogen-Oxidizing Bacterial Enrichment. *Environmental Science & Technology*, 54(6), Article 6. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b06755>
- Hu, X., Vandamme, P., & Boon, N. (2022). Co-cultivation enhanced microbial protein production based on autotrophic nitrogen-fixing hydrogen-oxidizing bacteria. *Chemical Engineering Journal*, 429, 132535. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.132535>
- Huang, Z., Rafiq, M., Woldu, A. R., Tong, Q.-X., Astruc, D., & Hu, L. (2023). Recent progress in electrocatalytic nitrogen reduction to ammonia (NRR). *Coordination Chemistry Reviews*, 478, 214981. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2022.214981>
- Humphreys, J., Lan, R., & Tao, S. (2021). Development and Recent Progress on Ammonia Synthesis Catalysts for Haber–Bosch Process. *Advanced Energy and Sustainability Research*, 2(1), 2000043. <https://doi.org/10.1002/aesr.202000043>
- Hutchins, D. A., Fu, F.-X., Zhang, Y., Warner, M. E., Feng, Y., Portune, K., Bernhardt, P. W., & Mulholland, M. R. (2007). CO<sub>2</sub> control of *Trichodesmium* N<sub>2</sub> fixation, photosynthesis, growth rates, and elemental ratios: Implications for past, present, and future ocean biogeochemistry. *Limnology and Oceanography*, 52(4), 1293–1304. <https://doi.org/10.4319/lo.2007.52.4.1293>
- IEA. (2021). *Ammonia Technology Roadmap*. <https://www.iea.org/reports/ammonia-technology-roadmap>
- IEA, I. (2022). *Global Hydrogen Review 2022*. <https://www.iea.org/reports/global-hydrogen-review-2022>

- Inomura, K., Bragg, J., Riemann, L., & Follows, M. J. (2018). A quantitative model of nitrogen fixation in the presence of ammonium. *PLOS ONE*, 13(11), e0208282. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208282>
- Jia, R., Wang, K., Li, L., Qu, Z., Shen, W., & Qu, D. (2020). Abundance and community succession of nitrogen-fixing bacteria in ferrihydrite enriched cultures of paddy soils is closely related to Fe(III)-reduction. *Science of The Total Environment*, 720, 137633. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137633>
- Jing, X., Liu, X., Zhang, Z., Wang, X., Rensing, C., & Zhou, S. (2022). Anode respiration-dependent biological nitrogen fixation by *Geobacter sulfurreducens*. *Water Research*, 208, 117860. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117860>
- Jourdin, L., Freguia, S., Donose, B. C., & Keller, J. (2015). Autotrophic hydrogen-producing biofilm growth sustained by a cathode as the sole electron and energy source. *Bioelectrochemistry*, 102, 56–63. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2014.12.001>
- Kandemir, T., Schuster, M. E., Senyshyn, A., Behrens, M., & Schlögl, R. (2013). The Haber–Bosch Process Revisited: On the Real Structure and Stability of “Ammonia Iron” under Working Conditions. *Angewandte Chemie International Edition*, 52(48), Article 48. <https://doi.org/10.1002/anie.201305812>
- Khan, K. S., Mack, R., Castillo, X., Kaiser, M., & Joergensen, R. G. (2016). Microbial biomass, fungal and bacterial residues, and their relationships to the soil organic matter C/N/P/S ratios. *Geoderma*, 271, 115–123. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2016.02.019>
- Kifle, M. H., & Laing, M. D. (2016). Isolation and Screening of Bacteria for Their Diazotrophic Potential and Their Influence on Growth Promotion of Maize Seedlings in Greenhouses. *Frontiers in Plant Science*, 6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01225>
- Kissel, D. E. (2014). *The Historical Development and Significance of the Haber Bosch Process*. 98(2). IPNI. <http://www.ipni.net/publication/bettercrops.nsf/issue/BC-2014-2>
- Klemps, R., Cypionka, H., Widdel, F., & Pfennig, N. (1985). Growth with hydrogen, and further physiological characteristics of *Desulfotomaculum* species. *Archives of Microbiology*, 143(2), 203–208. <https://doi.org/10.1007/BF00411048>
- Knoche, K. L., Aoyama, E., Hasan, K., & Minter, S. D. (2017). Role of Nitrogenase and Ferredoxin in the Mechanism of Bioelectrocatalytic Nitrogen Fixation by the Cyanobacteria *Anabaena variabilis* SA-1 Mutant Immobilized on Indium Tin Oxide (ITO) Electrodes. *Electrochimica Acta*, 232, 396–403. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2017.02.148>
- Kranz, S. A., Levitan, O., Richter, K.-U., Prájl, O., Berman-Frank, I., & Rost, B. (2010). Combined Effects of CO<sub>2</sub> and Light on the N<sub>2</sub>-Fixing Cyanobacterium *Trichodesmium* IMS101: Physiological Responses. *Plant Physiology*, 154(1), 334–345. <https://doi.org/10.1104/pp.110.159145>
- Kumar, S. (2012). *Biogas*. BoD – Books on Demand. ISBN [978-953-51-0204-5](https://doi.org/10.1007/978-953-51-0204-5).

- Kumar, V. V. (2018). Biofertilizers and Biopesticides in Sustainable Agriculture. In V. S. Meena (Ed.), *Role of Rhizospheric Microbes in Soil: Volume 1: Stress Management and Agricultural Sustainability* (pp. 377–398). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-8402-7\\_14](https://doi.org/10.1007/978-981-10-8402-7_14)
- Kumawat, N. (2017). Role of Biofertilizers in Agriculture. *Popular Kheti*, 5, 63–66. <https://www.researchgate.net/publication/323185331>.
- Lapinsonnière, L. (2013). Contribution à l'évaluation et à l'optimisation des application des systèmes microbio-électrochimiques: Traitement des eaux, production d'électricité, bioélectrosynthèse [Thesis, Rennes 1]. In [Http://www.theses.fr](http://www.theses.fr). <http://www.theses.fr/2013REN1S130>
- Latham, E., Anderson, R., Pinchak, W., & Nisbet, D. (2016). Insights on Alterations to the Rumen Ecosystem by Nitrate and Nitrocompounds. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00228>
- Leigh, J. A. (2000). Nitrogen Fixation in Methanogens: The Archaeal Perspective. *Current Issues in Molecular Biology*, 2(4), Article 4. <https://doi.org/10.21775/cimb.002.125>
- Leigh Krietsch Boerner. (2021). Industrial ammonia production emits more CO<sub>2</sub> than any other chemical-making reaction. Chemists want to change that. *Chemical & Engineering News*, 28–34. <https://doi.org/10.47287/cen-09932-cover>
- Lespinat, P. A., Berlier, Y. M., Fauque, G. D., Toci, R., Denariáz, G., & LeGall, J. (1987). The relationship between hydrogen metabolism, sulfate reduction and nitrogen fixation in sulfate reducers. *Journal of Industrial Microbiology*, 1(6), 383–388. <https://doi.org/10.1007/BF01569336>
- Li, F., Li, F., Lin, Y., Guo, L., Zhang, L., Li, R., Tian, Q., Wang, Y., Wang, Y., Zhang, X., Liu, J., & Fan, C. (2022). Investigating the performance and mechanism of nitrogen gas fixation and conversion to ammonia based on biocathode bioelectrochemistry system. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 97(8), 2163–2170. <https://doi.org/10.1002/jctb.7092>
- Li, J., Li, Z., Xiao, S., Fu, Q., Kobayashi, H., Zhang, L., Liao, Q., & Zhu, X. (2020). Startup cathode potentials determine electron transfer behaviours of biocathodes catalysing CO<sub>2</sub> reduction to CH<sub>4</sub> in microbial electrosynthesis. *Journal of CO<sub>2</sub> Utilization*, 35, 169–175. <https://doi.org/10.1016/j.jcou.2019.09.013>
- Li, Y., Guo, L., Kolton, M., Yang, R., Zhang, M., Qi, F., Soleimani, M., Sun, X., Li, B., Gao, W., Yan, G., Xu, R., & Sun, W. (2023). Chemolithotrophic Biological Nitrogen Fixation Fueled by Antimonite Oxidation May Be Widespread in Sb-Contaminated Habitats. *Environmental Science & Technology*, 57(1), 231–243. <https://doi.org/10.1021/acs.est.2c06424>
- Liao, J., Li, Z., Wang, J., Tian, D., Tian, D., & Niu, S. (2021). Nitrogen use efficiency of terrestrial plants in China: Geographic patterns, evolution, and determinants. *Ecological Processes*, 10(1), 69. <https://doi.org/10.1186/s13717-021-00338-w>



- Liu, C., Colón, B. C., Ziesack, M., Silver, P. A., & Nocera, D. G. (2016). Water splitting–biosynthetic system with CO<sub>2</sub> reduction efficiencies exceeding photosynthesis. *Science*, 352(6290), Article 6290. <https://doi.org/10.1126/science.aaf5039>
- Liu, C., Gallagher, J. J., Sakimoto, K. K., Nichols, E. M., Chang, C. J., Chang, M. C. Y., & Yang, P. (2015, April 7). *Nanowire–Bacteria Hybrids for Unassisted Solar Carbon Dioxide Fixation to Value-Added Chemicals* (world) [Rapid-communication]. ACS Publications; American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.5b01254>
- Liu, D., Roca-Puigros, M., Geppert, F., Caizán-Juanarena, L., Na Ayudthaya, S. P., Buisman, C., & ter Heijne, A. (2018). Granular Carbon-Based Electrodes as Cathodes in Methane-Producing Bioelectrochemical Systems. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2018.00078>
- Liu, Sakimoto, K. K., Colón, B. C., Silver, P. A., & Nocera, D. G. (2017). Ambient nitrogen reduction cycle using a hybrid inorganic–biological system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(25), Article 25. <https://doi.org/10.1073/pnas.1706371114>
- Lo, K.-J., Lee, S.-K., & Liu, C.-T. (2020). Development of a low-cost culture medium for the rapid production of plant growth-promoting *Rhodospseudomonas palustris* strain PS3. *PLOS ONE*, 15(7), e0236739. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0236739>
- Loferer-Krößbacher, M., Klima, J., & Psenner, R. (1998). Determination of Bacterial Cell Dry Mass by Transmission Electron Microscopy and Densitometric Image Analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(2), 688–694. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.2.688-694.1998>
- Logan, B. E., Rossi, R., Ragab, A., & Saikaly, P. E. (2019). Electroactive microorganisms in bioelectrochemical systems. *Nature Reviews Microbiology*, 17(5), Article 5. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0173-x>
- Loss, A., Couto, R., Brunetto, G., Veiga, M., Toselli, M., & Baldi, E. (2019). ANIMAL MANURE AS FERTILIZER: CHANGES IN SOIL ATTRIBUTES, PRODUCTIVITY AND FOOD COMPOSITION. *International Journal of Research -GRANTHAALAYAH*, 7, 307–331. <https://doi.org/10.29121/granthaalayah.v7.i9.2019.615>
- Lovley, D. R. (2022). Electrotrophy: Other microbial species, iron, and electrodes as electron donors for microbial respirations. *Bioresource Technology*, 345, 126553. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126553>
- Lovley, D. R., & Holmes, D. E. (2022). Electromicrobiology: The ecophysiology of phylogenetically diverse electroactive microorganisms. *Nature Reviews Microbiology*, 20(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00597-6>
- Lowe, D. J., Thorneley, R. N. F., & Postgate, J. R. (1984). The Mechanism of Substrate Reduction by Nitrogenase. In C. Veeger & W. E. Newton (Eds.), *Advances in Nitrogen Fixation Research: Proceedings of the 5th International Symposium on Nitrogen Fixation, Noordwijkerhout, The Netherlands, August 28 – September 3, 1983* (pp. 133–138). Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-94-009-6923-0\\_46](https://doi.org/10.1007/978-94-009-6923-0_46)

- Lu, S., Guan, X., & Liu, C. (2020). Electricity-powered artificial root nodule. *Nature Communications*, 11(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15314-9>
- Ma, R., Yu, K., Xiao, S., Liu, S., Ciais, P., & Zou, J. (2022). Data-driven estimates of fertilizer-induced soil NH<sub>3</sub>, NO and N<sub>2</sub>O emissions from croplands in China and their climate change impacts. *Global Change Biology*, 28(3), 1008–1022. <https://doi.org/10.1111/gcb.15975>
- MacFarlane, D. R., Cherepanov, P. V., Choi, J., Suryanto, B. H. R., Hodgetts, R. Y., Bakker, J. M., Vallana, F. M. F., & Simonov, A. N. (2020). A Roadmap to the Ammonia Economy. *Joule*, 4(6), 1186–1205. <https://doi.org/10.1016/j.joule.2020.04.004>
- Madigan, M. T. (1995). Microbiology of Nitrogen Fixation by Anoxygenic Photosynthetic Bacteria. In R. E. Blankenship, M. T. Madigan, & C. E. Bauer (Eds.), *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria* (pp. 915–928). Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/0-306-47954-0\\_42](https://doi.org/10.1007/0-306-47954-0_42)
- Maeda, I. (2022). Potential of Phototrophic Purple Nonsulfur Bacteria to Fix Nitrogen in Rice Fields. *Microorganisms*, 10(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10010028>
- Malik, K. A., & Schlegel, H. G. (1981). Chemolithoautotrophic growth of bacteria able to grow under N<sub>2</sub>-fixing conditions. *FEMS Microbiology Letters*, 11(1), 63–20. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1981.tb06936.x>
- Manchon, C., Muniesa-Merino, F., Llorente, M., & Esteve-Núñez, A. (2023). Microbial photoelectrosynthesis: Feeding purple phototrophic bacteria electricity to produce bacterial biomass. *Microbial Biotechnology*, 16(3), 569–578. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.14190>
- Manzano-Gómez, L. A., Rincón-Rosales, R., Flores-Felix, J. D., Gen-Jimenez, A., Ruíz-Valdiviezo, V. M., Ventura-Canseco, L. M. C., Rincón-Molina, F. A., Villalobos-Maldonado, J. J., & Rincón-Molina, C. I. (2023). Cost-Effective Cultivation of Native PGPB Sinorhizobium Strains in a Homemade Bioreactor for Enhanced Plant Growth. *Bioengineering*, 10(8), Article 8. <https://doi.org/10.3390/bioengineering10080960>
- Meyer, J., Kelley, B. C., & Vignais, P. M. (1978). Nitrogen fixation and hydrogen metabolism in photosynthetic bacteria. *Biochimie*, 60(3), 245–260. [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(78\)80821-9](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(78)80821-9)
- Mishra, A., Ntihuga, J. N., Molitor, B., & Angenent, L. T. (2020). Power-to-Protein: Carbon Fixation with Renewable Electric Power to Feed the World. *Joule*, 4(6), 1142–1147. <https://doi.org/10.1016/j.joule.2020.04.008>
- Misra, R. V., Roy, R. N., & Hiraoka, H. (2003). *On-Farm Composting Methods*. <https://vtechworks.lib.vt.edu/handle/10919/65466>
- Mohanakrishna, G., Abu Reesh, I. M., Vanbroekhoven, K., & Pant, D. (2020). Microbial electrosynthesis feasibility evaluation at high bicarbonate concentrations with

- enriched homoacetogenic biocathode. *Science of The Total Environment*, 715, 137003. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137003>
- Montañez, A., Danso, S. K. A., & Hardarson, G. (1995). The effect of temperature on nodulation and nitrogen fixation by five Bradyrhizobium japonicum strains. *Applied Soil Ecology*, 2(3), 165–174. [https://doi.org/10.1016/0929-1393\(95\)00052-M](https://doi.org/10.1016/0929-1393(95)00052-M)
- Morales-Borrell, D., González-Fernández, N., Mora-González, N., Pérez-Heredia, C., Campal-Espinosa, A., Bover-Fuentes, E., Salazar-Gómez, E., & Morales-Espinosa, Y. (2020). Design of a culture medium for optimal growth of the bacterium Pseudoxanthomonas indica H32 allowing its production as biopesticide and biofertilizer. *AMB Express*, 10(1), 190. <https://doi.org/10.1186/s13568-020-01127-y>
- Moscoviz, R., de Fouchécour, F., Santa-Catalina, G., Bernet, N., & Trably, E. (2017). Cooperative growth of Geobacter sulfurreducens and Clostridium pasteurianum with subsequent metabolic shift in glycerol fermentation. *Scientific Reports*, 7(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/srep44334>
- Moscoviz, R., Desmond-Le Quéméner, E., Trably, E., & Bernet, N. (2019). Bioelectrochemical Systems for the Valorization of Organic Residues. In J.-R. Bastidas-Oyanedel & J. E. Schmidt (Eds.), *Biorefinery: Integrated Sustainable Processes for Biomass Conversion to Biomaterials, Biofuels, and Fertilizers* (pp. 511–534). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-10961-5\\_21](https://doi.org/10.1007/978-3-030-10961-5_21)
- Moshiri, F., Kim, J. W., Fu, C., & Maier, R. J. (1994). The FeSII protein of Azotobacter vinelandii is not essential for aerobic nitrogen fixation, but confers significant protection to oxygen-mediated inactivation of nitrogenase in vitro and in vivo. *Molecular Microbiology*, 14(1), 101–114. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1994.tb01270.x>
- Muschietti-Piana, P., McBeath, T. M., McNeill, A. M., Cipriotti, P. A., & Gupta, V. V. S. R. (2020). Combined nitrogen input from legume residues and fertilizer improves early nitrogen supply and uptake by wheat. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 183(3), 355–366. <https://doi.org/10.1002/jpln.202000002>
- Nedwell, D. B., & Azni bin Abdul Aziz, S. (1980). Heterotrophic nitrogen fixation in an intertidal saltmarsh sediment. *Estuarine and Coastal Marine Science*, 10(6), 699–702. [https://doi.org/10.1016/S0302-3524\(80\)80097-1](https://doi.org/10.1016/S0302-3524(80)80097-1)
- Nelson, M. S., & Sadowsky, M. J. (2015). Secretion systems and signal exchange between nitrogen-fixing rhizobia and legumes. *Frontiers in Plant Science*, 6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00491>
- Nevin, K. P., Hensley, S. A., Franks, A. E., Summers, Z. M., Ou, J., Woodard, T. L., Snoeyenbos-West, O. L., & Lovley, D. R. (2011). Electrosynthesis of Organic Compounds from Carbon Dioxide Is Catalyzed by a Diversity of Acetogenic Microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(9), 2882–2886. <https://doi.org/10.1128/AEM.02642-10>

- Nicolaisen, K., Hahn, A., & Schleiff, E. (2009). The cell wall in heterocyst formation by *Anabaena* sp. PCC 7120. *Journal of Basic Microbiology*, 49(1), 5–24. <https://doi.org/10.1002/jobm.200800300>
- Nicoletti, M. (2022). Chapter 10—The nutraceutical potential of cyanobacteria. In G. Lopes, M. Silva, & V. Vasconcelos (Eds.), *The Pharmacological Potential of Cyanobacteria* (pp. 287–330). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821491-6.00010-7>
- Okon, Y., Albrecht, S. L., & Burris, R. H. (1976). Factors affecting growth and nitrogen fixation of *Spirillum lipoferum*. *Journal of Bacteriology*, 127(3), 1248–1254. <https://doi.org/10.1128/jb.127.3.1248-1254.1976>
- Omara, P., Aula, L., Oyebiyi, F., & Raun, W. R. (2019). World Cereal Nitrogen Use Efficiency Trends: Review and Current Knowledge. *Agrosystems, Geosciences & Environment*, 2(1), 180045. <https://doi.org/10.2134/age2018.10.0045>
- Op den Camp, H. J. M., Jetten, M. S. M., & Strous, M. (2007). Chapter 16—Anammox. In H. Bothe, S. J. Ferguson, & W. E. Newton (Eds.), *Biology of the Nitrogen Cycle* (pp. 245–262). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-044452857-5.50017-5>
- Ortiz-Medina, J. F., Grunden, A. M., Hyman, M. R., & Call, D. F. (2019). Nitrogen Gas Fixation and Conversion to Ammonium Using Microbial Electrolysis Cells. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 7(3), Article 3. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b05763>
- Ortiz-Medina, J. F., Poole, M. R., Grunden, A. M., & Call, D. F. (2023). Nitrogen Fixation and Ammonium Assimilation Pathway Expression of *Geobacter sulfurreducens* Changes in Response to the Anode Potential in Microbial Electrochemical Cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 89(4), e02073-22. <https://doi.org/10.1128/aem.02073-22>
- Osman, J. R., Cardon, H., Montagnac, G., Picard, A., & Daniel, I. (2021). Pressure effects on sulfur-oxidizing activity of *Thiobacillus thioparus*. *Environmental Microbiology Reports*, 13(2), 169–175. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12922>
- Oszust, K., & Frac, M. (2020). First report on the microbial communities of the wild and planted raspberry rhizosphere – A statement on the taxa, processes and a new indicator of functional diversity. *Ecological Indicators*, 121, 107117. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2020.107117>
- Pan, X., Zhao, L., Li, C., Angelidaki, I., Lv, N., Ning, J., Cai, G., & Zhu, G. (2021). Deep insights into the network of acetate metabolism in anaerobic digestion: Focusing on syntrophic acetate oxidation and homoacetogenesis. *Water Research*, 190, 116774. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116774>
- Patil, B., Hessel, V., Lang, J., & Wang, Q. (2016). *Plasma-Assisted Nitrogen Fixation Reactions* (pp. 296–338). <https://doi.org/10.1039/9781782623632-00296>

- Patil, S. A., Harnisch, F., Koch, C., Hübschmann, T., Fetzer, I., Carmona-Martínez, A. A., Müller, S., & Schröder, U. (2011). Electroactive mixed culture derived biofilms in microbial bioelectrochemical systems: The role of pH on biofilm formation, performance and composition. *Bioresource Technology*, 102(20), 9683–9690. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.07.087>
- Paul, D., Noori, M. T., Rajesh, P. P., Ghangrekar, M. M., & Mitra, A. (2018). Modification of carbon felt anode with graphene oxide-zeolite composite for enhancing the performance of microbial fuel cell. *Sustainable Energy Technologies and Assessments*, 26, 77–82. <https://doi.org/10.1016/j.seta.2017.10.001>
- Pedrosa, F. O., Dobereiner, J., & Yates, M. G. (1980). Hydrogen-dependent Growth and Autotrophic Carbon Dioxide Fixation in *Derxia*. *Microbiology*, 119(2), 547–551. <https://doi.org/10.1099/00221287-119-2-547>
- Pimentel, D. (1996). Green revolution agriculture and chemical hazards. *Science of The Total Environment*, 188, S86–S98. [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(96\)05280-1](https://doi.org/10.1016/0048-9697(96)05280-1)
- Pisciotta, J. M., Zaybak, Z., Call, D. F., Nam, J.-Y., & Logan, B. E. (2012). Enrichment of Microbial Electrolysis Cell Biocathodes from Sediment Microbial Fuel Cell Bioanodes. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(15), 5212. <https://doi.org/10.1128/AEM.00480-12>
- Pogoreutz, C., Rädercker, N., Cárdenas, A., Gärdes, A., Wild, C., & Voolstra, C. R. (2017). Nitrogen Fixation Aligns with nifH Abundance and Expression in Two Coral Trophic Functional Groups. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01187>
- Poly, F., Ranjard, L., Nazaret, S., Gourbière, F., & Monrozier, L. J. (2001). Comparison of nifH Gene Pools in Soils and Soil Microenvironments with Contrasting Properties. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(5), 2255–2262. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.5.2255-2262.2001>
- Postgate, J. R. (1970). Nitrogen Fixation by Sporulating Sulphate-reducing Bacteria Including Rumen Strains. *Microbiology*, 63(1), 137–139. <https://doi.org/10.1099/00221287-63-1-137>
- Prasad, H., Parmar, Y., Sajwan, P., Kumari, M., & Solanki, S. (2017). *Effect of Organic Manures and Biofertilizer on Plant Growth, Yield and Quality of Horticultural Crop: A Review*. 217, 217–221. <https://www.researchgate.net/publication/321479997>.
- Prasad, R. (2009). Efficient fertilizer use: The key to food security and better environment. *Journal of Tropical Agriculture*, 47(1), Article 1. ISSN 0973-5399. <http://jtropag.kau.in/index.php/ojs2/article/view/198>.
- Qiu, Z., Paungfoo-Lonhienne, C., Ye, J., Garcia, A. G., Petersen, I., Di Bella, L., Hobbs, R., Ibanez, M., Heenan, M., Wang, W., Reeves, S., & Schmidt, S. (2022). Biofertilizers can enhance nitrogen use efficiency of sugarcane. *Environmental Microbiology*, 24(8), 3655–3671. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.16027>

- Rabaey, K., Lissens, G., Siciliano, S. D., & Verstraete, W. (2003). A microbial fuel cell capable of converting glucose to electricity at high rate and efficiency. *Biotechnology Letters*, 25(18), 1531–1535. <https://doi.org/10.1023/A:1025484009367>
- Rago, L., Zecchin, S., Villa, F., Goglio, A., Corsini, A., Cavalca, L., & Schievano, A. (2019). Bioelectrochemical Nitrogen fixation (e-BNF): Electro-stimulation of enriched biofilm communities drives autotrophic nitrogen and carbon fixation. *Bioelectrochemistry*, 125, 105–115. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2018.10.002>
- Rajaie, M., & Tavakoly, A. R. (2016). Effects of municipal waste compost and nitrogen fertilizer on growth and mineral composition of tomato. *International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture*, 5(4), 339–347. <https://doi.org/10.1007/s40093-016-0144-4>
- Rao, V. R. (1978). Effect of carbon sources on asymbiotic nitrogen fixation in a paddy soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 10(4), 319–321. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(78\)90029-9](https://doi.org/10.1016/0038-0717(78)90029-9)
- Reddy, K. J., Haskell, J. B., Sherman, D. M., & Sherman, L. A. (1993). Unicellular, aerobic nitrogen-fixing cyanobacteria of the genus *Cyanothece*. *Journal of Bacteriology*, 175(5), 1284–1292. <https://doi.org/10.1128/jb.175.5.1284-1292.1993>
- Rees, D. C., Akif Tezcan, F., Haynes, C. A., Walton, M. Y., Andrade, S., Einsle, O., & Howard, J. B. (2005). Structural basis of biological nitrogen fixation. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 363(1829), 971–984. <https://doi.org/10.1098/rsta.2004.1539>
- Rezai, F., Læsaa, S., Sahin, N. E., Catalano, J., & Dražević, E. (2023). *Low-temperature electrochemical ammonia synthesis: Measurement reliability and comparison to Haber-Bosch in terms of energy efficiency*. ChemRxiv. <https://doi.org/10.26434/chemrxiv-2022-mw2lr-v4>
- Rieger, P. H. (1993). *Electrochemistry*. Springer Science & Business Media, ISBN : [978-0-412-04391-8](https://doi.org/10.1007/978-0-412-04391-8).
- Ritika, B., & Utpal, D. (2014). Biofertilizer, a way towards organic agriculture: A review. *African Journal of Microbiology Research*, 8(24), 2332–2343. <https://doi.org/10.5897/AJMR2013.6374>
- Rojas-Tapias, D., Moreno-Galván, A., Pardo-Díaz, S., Obando, M., Rivera, D., & Bonilla, R. (2012). Effect of inoculation with plant growth-promoting bacteria (PGPB) on amelioration of saline stress in maize (*Zea mays*). *Applied Soil Ecology*, 61, 264–272. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2012.01.006>
- Roper, M. M., & Ladha, J. K. (1995). Biological N<sub>2</sub> fixation by heterotrophic and phototrophic bacteria in association with straw. *Plant and Soil*, 174(1), 211–224. <https://doi.org/10.1007/BF00032248>

- Rous, A. (2022) Script and data used for the article "Comparison of enrichment methods for efficient nitrogen fixation on a biocathode", <https://doi.org/10.57745/ONNGWZ>
- Rous, A. (2023) Supplementary data and script for thesis manuscript "Etude du potentiel des systèmes bioélectrochimiques microbiens pour la fixation de N<sub>2</sub>", <https://doi.org/10.57745/VIIJFJ>
- Rouwenhorst, K. H. R., Krzywda, P. M., Benes, N. E., Mul, G., & Lefferts, L. (2021). Chapter 4— Ammonia Production Technologies. In A. Valera-Medina & R. Banares-Alcantara (Eds.), *Techno-Economic Challenges of Green Ammonia as an Energy Vector* (pp. 41–83). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820560-0.00004-7>
- Rozendal, R. A., Jeremiase, A. W., Hamelers, H. V. M., & Buisman, C. J. N. (2008). Hydrogen Production with a Microbial Biocathode. *Environmental Science & Technology*, 42(2), 629–634. <https://doi.org/10.1021/es071720+>
- Rozendal, R. A., Leone, E., Keller, J., & Rabaey, K. (2009). Efficient hydrogen peroxide generation from organic matter in a bioelectrochemical system. *Electrochemistry Communications*, 11(9), 1752–1755. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2009.07.008>
- Ryan, R. P., Monchy, S., Cardinale, M., Taghavi, S., Crossman, L., Avison, M. B., Berg, G., van der Lelie, D., & Dow, J. M. (2009). The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*. *Nature Reviews Microbiology*, 7(7), Article 7. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2163>
- Samoraj, M., Mironiuk, M., Izydorczyk, G., Witek-Krowiak, A., Szopa, D., Moustakas, K., & Chojnacka, K. (2022). The challenges and perspectives for anaerobic digestion of animal waste and fertilizer application of the digestate. *Chemosphere*, 295, 133799. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.133799>
- Sander, R. (2023). *Compilation of Henry's law constants (version 5.0.0-rc.0) for water as solvent* [Preprint]. Gases/Laboratory Studies/Troposphere/Chemistry (chemical composition and reactions). <https://doi.org/10.5194/egusphere-2023-1584>
- Santoro, C., Arbizzani, C., Erable, B., & Ieropoulos, I. (2017). Microbial fuel cells: From fundamentals to applications. A review. *Journal of Power Sources*, 356, 225–244. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2017.03.109>
- Schlesier, J., Rohde, M., Gerhardt, S., & Einsle, O. (2016). A Conformational Switch Triggers Nitrogenase Protection from Oxygen Damage by Shethna Protein II (FeSII). *Journal of the American Chemical Society*, 138(1), 239–247. <https://doi.org/10.1021/jacs.5b10341>
- Seefeldt, L. C., Yang, Z.-Y., Duval, S., & Dean, D. R. (2013). Nitrogenase reduction of carbon-containing compounds. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1827(8), 1102–1111. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2013.04.003>

- Sharma, A. (2017). A Review on the Effect of Organic and Chemical Fertilizers on Plants. *International Journal for Research in Applied Science and Engineering Technology*, *V*, 677–680. <https://doi.org/10.22214/ijraset.2017.2103>
- Shi, L., Dong, H., Reguera, G., Beyenal, H., Lu, A., Liu, J., Yu, H.-Q., & Fredrickson, J. K. (2016). Extracellular electron transfer mechanisms between microorganisms and minerals. *Nature Reviews Microbiology*, *14*(10), Article 10. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.93>
- Sim, J., An, J., Elbeshbishy, E., Ryu, H., & Lee, H.-S. (2015). Characterization and optimization of cathodic conditions for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> synthesis in microbial electrochemical cells. *Bioresource Technology*, *195*, 31–36. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.06.076>
- Simoes, A., & Hidalgo, C. (2011). *The Economic Complexity Observatory: An Analytical Tool for Understanding the Dynamics of Economic Development*. <https://www.researchgate.net/publication/221605462>.
- Sivasakthivelan, P., & Saranraj, P. (2013). *Azospirillum and its Formulations: A Review*. <https://doi.org/10.5829/idosi.ijmr.2013.4.3.825>
- Smercina, D. N., Evans, S. E., Friesen, M. L., & Tiemann, L. K. (2019). To Fix or Not To Fix: Controls on Free-Living Nitrogen Fixation in the Rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, *85*(6), e02546-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.02546-18>
- Soper, F. M., Simon, C., & Jauss, V. (2021). Measuring nitrogen fixation by the acetylene reduction assay (ARA): Is 3 the magic ratio? *Biogeochemistry*, *152*(2), 345–351. <https://doi.org/10.1007/s10533-021-00761-3>
- Soundararajan, M., Ledbetter, R., Kusuma, P., Zhen, S., Ludden, P., Bugbee, B., Ensign, S. A., & Seefeldt, L. C. (2019). Phototrophic N<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> Fixation Using a Rhodospseudomonas palustris-H<sub>2</sub> Mediated Electrochemical System With Infrared Photons. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 1817. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01817>
- Stacey, G. S., Burris, R. H., & Evans, H. J. (1992). *Biological Nitrogen Fixation*. Springer Science & Business Media. ISBN : [978-0-412-02421-4](https://doi.org/10.1007/978-0-412-02421-4).
- Steenhoudt, O., & Vanderleyden, J. (2000). Azospirillum, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: Genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiology Reviews*, *24*(4), 487–506. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2000.tb00552.x>
- Stoddard, S. F., Smith, B. J., Hein, R., Roller, B. R. K., & Schmidt, T. M. (2015). rrnDB: Improved tools for interpreting rRNA gene abundance in bacteria and archaea and a new foundation for future development. *Nucleic Acids Research*, *43*(D1), D593–D598. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1201>
- Sun, X., Kong, T., Häggblom, M. M., Kolton, M., Li, F., Dong, Y., Huang, Y., Li, B., & Sun, W. (2020). Chemolithoautotrophic Diazotrophy Dominates the Nitrogen Fixation Process in



Mine Tailings. *Environmental Science & Technology*.  
<https://doi.org/10.1021/acs.est.9b07835>

- Sydow, A., Krieg, T., Mayer, F., Schrader, J., & Holtmann, D. (2014). Electroactive bacteria—Molecular mechanisms and genetic tools. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(20), 8481–8495. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6005-z>
- Tallou, A., Salcedo, F. P., Haouas, A., Jamali, M. Y., Atif, K., Aziz, F., & Amir, S. (2020). Assessment of biogas and biofertilizer produced from anaerobic co-digestion of olive mill wastewater with municipal wastewater and cow dung. *Environmental Technology & Innovation*, 20, 101152. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.101152>
- Tilak, K. V. B. R., Schneider, K., & Schlegel, H. G. (1986). Autotrophic growth of nitrogen-fixing *Azospirillum* species and partial characterization of hydrogenase from strain CC. *Current Microbiology*, 13(6), 291–297. <https://doi.org/10.1007/BF01577194>
- Tremblay, P.-L., Zhang, T., Dar, S. A., Leang, C., & Lovley, D. R. (2012). The Rnf Complex of *Clostridium ljungdahlii* Is a Proton-Translocating Ferredoxin:NAD<sup>+</sup> Oxidoreductase Essential for Autotrophic Growth. *MBio*, 4(1), 10.1128/mbio.00406-12. <https://doi.org/10.1128/mbio.00406-12>
- Tripp, H. J., Bench, S. R., Turk, K. A., Foster, R. A., Desany, B. A., Niazi, F., Affourtit, J. P., & Zehr, J. P. (2010). Metabolic streamlining in an open-ocean nitrogen-fixing cyanobacterium. *Nature*, 464(7285), Article 7285. <https://doi.org/10.1038/nature08786>
- Udvardi, M., Below, F. E., Castellano, M. J., Eagle, A. J., Giller, K. E., Ladha, J. K., Liu, X., Maaz, T. M., Nova-Franco, B., Raghuram, N., Robertson, G. P., Roy, S., Saha, M., Schmidt, S., Tegeder, M., York, L. M., & Peters, J. W. (2021). A Research Road Map for Responsible Use of Agricultural Nitrogen. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.660155>
- U.S. Geological Survey, U. S. G. S. (2022). *Mineral commodity summaries 2022*. 202. <https://doi.org/10.3133/mcs2022>.
- Vassilev, N., Vassileva, M., Lopez, A., Martos, V., Reyes, A., Maksimovic, I., Eichler-Löbermann, B., & Malusà, E. (2015). Unexploited potential of some biotechnological techniques for biofertilizer production and formulation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(12), 4983–4996. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6656-4>
- Villano, M., Aulenta, F., Ciucci, C., Ferri, T., Giuliano, A., & Majone, M. (2010). Bioelectrochemical reduction of CO<sub>2</sub> to CH<sub>4</sub> via direct and indirect extracellular electron transfer by a hydrogenophilic methanogenic culture. *Bioresource Technology*, 101(9), 3085–3090. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.12.077>
- Wahlund, T. M., & Madigan, M. T. (1993). Nitrogen fixation by the thermophilic green sulfur bacterium *Chlorobium tepidum*. *Journal of Bacteriology*, 175(2), 474–478. <https://doi.org/10.1128/jb.175.2.474-478.1993>

- Watanabe, M., Fukui, M., & Kuever, J. (2020). Desulforamulus gen. Nov. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (pp. 1–8). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm01770>
- White, J., Prell, J., James, E. K., & Poole, P. (2007). Nutrient Sharing between Symbionts. *Plant Physiology*, *144*(2), 604–614. <https://doi.org/10.1104/pp.107.097741>
- Wiegel, J. K. W. (2015). Xanthobacter. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (pp. 1–22). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00829>
- Willems, A., & Gillis, M. (2015). Comamonas. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (pp. 1–17). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00945>
- Wong, P. Y., Cheng, K. Y., Kaksonen, A. H., Sutton, D. C., & Ginige, M. P. (2014). Enrichment of anodophilic nitrogen fixing bacteria in a bioelectrochemical system. *Water Research*, *64*, 73–81. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.06.046>
- Wresta, A., Widyarani, R., Boopathy, R., & Setiadi, T. (2021). Thermodynamic approach to estimating reactions and stoichiometric coefficients of anaerobic glucose and hydrogen utilization. *Engineering Reports*, *3*(6), e12347. <https://doi.org/10.1002/eng2.12347>
- Wu, L., Shen, M., Li, J., Huang, S., Li, Z., Yan, Z., & Peng, Y. (2019). Cooperation between partial-nitrification, complete ammonia oxidation (comammox), and anaerobic ammonia oxidation (anammox) in sludge digestion liquid for nitrogen removal. *Environmental Pollution*, *254*, 112965. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.112965>
- Wu, Y., Zaiden, N., & Cao, B. (2018). The Core- and Pan-Genomic Analyses of the Genus Comamonas: From Environmental Adaptation to Potential Virulence. *Frontiers in Microbiology*, *9*, 3096. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03096>
- Y. Hafeez, F., Yasmin, S., Ariani, D., Mehboob-ur-Rahman, Yusuf, Z., & A. Malik, K. (2006). Plant growth-promoting bacteria as biofertilizer. *Agronomy for Sustainable Development*, *26*(2), 143–150. <https://doi.org/10.1051/agro:2006007>
- Yadav, R., Chiranjeevi, P., Yadav, S., Singh, R., & Patil, S. A. (2022). Electricity-driven bioproduction from CO<sub>2</sub> and N<sub>2</sub> feedstocks using enriched mixed microbial culture. *Journal of CO<sub>2</sub> Utilization*, *60*, 101997. <https://doi.org/10.1016/j.jcou.2022.101997>
- Yamashita, N., Tanabata, S., Ohtake, N., Sueyoshi, K., Sato, T., Higuchi, K., Saito, A., & Ohshima, T. (2019). Effects of Different Chemical Forms of Nitrogen on the Quick and Reversible Inhibition of Soybean Nodule Growth and Nitrogen Fixation Activity. *Frontiers in Plant Science*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00131>
- Yu, T., & Zhuang, Q. (2020). Modeling biological nitrogen fixation in global natural terrestrial ecosystems. *Biogeosciences*, *17*(13), 3643–3657. <https://doi.org/10.5194/bg-17-3643-2020>

- Zaybak, Z., Pisciotta, J. M., Tokash, J. C., & Logan, B. E. (2013). Enhanced start-up of anaerobic facultatively autotrophic biocathodes in bioelectrochemical systems. *Journal of Biotechnology*, 168(4), 478–485. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.10.001>
- Zhang, C.-C., Laurent, S., Sakr, S., Peng, L., & Bédu, S. (2006). Heterocyst differentiation and pattern formation in cyanobacteria: A chorus of signals. *Molecular Microbiology*, 59(2), 367–375. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04979.x>
- Zhang, L., Tian, C., Wang, H., Gu, W., Zheng, D., Cui, M., Wang, X., He, X., Zhan, G., & Li, D. (2022). Improving electroautotrophic ammonium production from nitrogen gas by simultaneous carbon dioxide fixation in a dual-chamber microbial electrolysis cell. *Bioelectrochemistry (Amsterdam, Netherlands)*, 144, 108044. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2021.108044>
- Zhang, W., Chen, Y., Huang, K., Wang, F., & Mei, Z. (2023). Molecular Mechanism and Agricultural Application of the NifA–NifL System for Nitrogen Fixation. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/ijms24020907>
- Zhang, W., Li, Y.-X., Niu, Y., Zhang, F., Li, Y.-B., & Zeng, R. J. (2021). Two-stage enrichment of hydrogen-oxidizing bacteria as biofertilizers. *Chemosphere*, 266, 128932. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128932>
- Zhang, X., Davidson, E. A., Mauzerall, D. L., Searchinger, T. D., Dumas, P., & Shen, Y. (2015). Managing nitrogen for sustainable development. *Nature*, 528(7580), Article 7580. <https://doi.org/10.1038/nature15743>
- Zhao, Y., Bian, S.-M., Zhou, H.-N., & Huang, J.-F. (2006). Diversity of Nitrogenase Systems in Diazotrophs. *Journal of Integrative Plant Biology*, 48(7), 745–755. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2006.00271.x>
- Zhou, F., Azofra, L. M., Ali, M., Kar, M., Simonov, A. N., McDonnell-Worth, C., Sun, C., Zhang, X., & MacFarlane, D. R. (2017). Electro-synthesis of ammonia from nitrogen at ambient temperature and pressure in ionic liquids. *Energy & Environmental Science*, 10(12), 2516–2520. <https://doi.org/10.1039/C7EE02716H>
- Zhou, X., Zhang, Z., Zhang, X., & Liu, Y. (2018). A novel single-stage process integrating simultaneous COD oxidation, partial nitrification-denitrification and anammox (SCONDA) for treating ammonia-rich organic wastewater. *Bioresource Technology*, 254, 50–55. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.057>
- Zhu, X., Ros, G. H., Xu, M., Cai, Z., Sun, N., Duan, Y., & de Vries, W. (2023). Long-term impacts of mineral and organic fertilizer inputs on nitrogen use efficiency for different cropping systems and site conditions in Southern China. *European Journal of Agronomy*, 146, 126797. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2023.126797>
- Ziegenbalg, D., Zander, J., & Marschall, R. (2021). Photocatalytic Nitrogen Reduction: Challenging Materials with Reaction Engineering. *ChemPhotoChem*, 5(9), 792–807. <https://doi.org/10.1002/cptc.202100084>

Zubair, M., Wang, S., Zhang, P., Ye, J., Liang, J., Nabi, M., Zhou, Z., Tao, X., Chen, N., Sun, K., Xiao, J., & Cai, Y. (2020). Biological nutrient removal and recovery from solid and liquid livestock manure: Recent advance and perspective. *Bioresource Technology*, 301, 122823. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122823>

## Annexes

### 1. PRINCIPE D'ÉLECTROCHIMIE

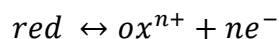
#### 1.1. L'électrochimie

L'électrochimie s'intéresse aux réactions chimiques couplées à des échanges d'électrons. Elle permet donc la conversion d'énergie chimique en énergie électrique et inversement (Eliaz & Gileadi, 2019; Lapinsonnière, 2013). On parlera de pile dans le cas où il y a conversion d'énergie chimique en énergie électrique et d'électrolyseur quand c'est l'apport d'énergie électrique qui est converti en énergie chimique (Lapinsonnière, 2013). Ces échanges se font entre deux matériaux conducteurs électroniques (exemple : métaux, carbone) et un matériau conducteur ionique (ex : eau salée) (Eliaz & Gileadi, 2019; Lapinsonnière, 2013). On parlera d'électrode pour parler des matériaux conducteurs électroniques et d'électrolyte pour le conducteur ionique. Les deux électrodes peuvent être séparées ou non et avoir des électrolytes différents mais il est nécessaire de garder une voie de transport d'ions entre les deux électrodes comme par utilisation d'un pont salin pour permettre de maintenir l'équilibre des charges (Eliaz & Gileadi, 2019; Glasstone, 2011).

##### 1.1.1. Les réactions redox

L'électrochimie s'intéresse aux réactions qui ont lieu à l'interface entre électrodes et électrolyte (Rieger, 1993). Ces réactions sont des réactions d'oxydoréduction qui voient donc intervenir des couples d'espèces chimiques oxydantes (exemple :  $\text{Cu}^{2+}_{(\text{aq})}$ ) et des espèces réductrices (exemple :  $\text{Fe}_{(\text{s})}$ ). Les espèces oxydantes sont les espèces qui vont être amenées à capter des électrons et les espèces réductrices sont celles qui vont pouvoir libérer des électrons comme le présente l'Équation 17 (Glasstone, 2011; Rieger, 1993).

*Équation 17: Demi-équation d'un couple redox avec red = réducteur, ox = oxydant et n la quantité d'électrons échangés*

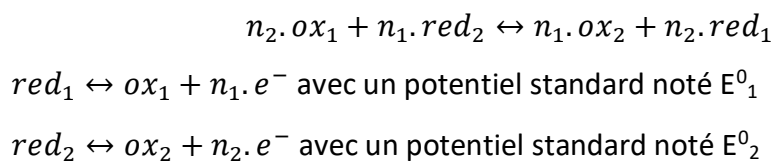


##### 1.1.2. Introduction au potentiel redox standard

Les électrodes sont nommées anode quand, à leur interface (conducteur électronique/conducteur ionique), se produit des réactions d'oxydation et on parlera de cathode quand il s'agit de réaction de réduction (Eliaz & Gileadi, 2019; Lapinsonnière, 2013). Ces réactions d'oxydoréduction sont associées à des potentiels standard, noté  $E^0$ . Ces potentiels sont mesurés en comparaison avec le potentiel du couple  $\text{H}^+/\text{H}_2$  utilisé comme référence et ils permettent de déterminer la réactivité d'un couple redox (Glasstone, 2011;

Rieger, 1993). Pour être mesuré, on peut utiliser un système avec un conducteur électronique et un conducteur ionique d'un même couple (exemple :  $\text{Cu}^{2+}_{(aq)}/\text{Cu}_{(s)}$ ) et mesurer la différence entre le potentiel de ce couple et celui d'une électrode de référence dans les conditions de l'expérimentation (température et pression) (Eliaz & Gileadi, 2019; Glasstone, 2011). Dans le cas où une espèce chimique n'aurait pas de forme de conducteur électronique, cette mesure se fait par lecture du potentiel avec l'ajout d'une électrode inerte (exemple : Platine) dans un électrolyte contenant les deux formes ioniques. On a par exemple un potentiel  $E^0$  ( $\text{Cu}^{2+}_{(aq)}/\text{Cu}_{(s)}$ ) de +0,34 V à 25°C et 1 bar pour la formule  $\text{Cu}^{2+}_{(aq)} + 2e^- \leftrightarrow \text{Cu}_{(s)}$  (Bratsch, 1989). Cette équation correspond à une réaction de réduction avec une espèce chimique, donc le degré d'oxydation va baisser (Eliaz & Gileadi, 2019; Glasstone, 2011; Rieger, 1993). Le degré d'oxydation est une valeur arbitraire qui correspond à la charge de cet élément, ainsi dans l'exemple du couple  $\text{Cu}^{2+}_{(aq)}/\text{Cu}_{(s)}$ ,  $\text{Cu}^{2+}_{(aq)}$  à un degré d'oxydation de +II et  $\text{Cu}_{(s)}$  de 0 (Eliaz & Gileadi, 2019; Glasstone, 2011; Rieger, 1993). Une réaction de réduction est donc une réaction où des électrons sont captés par une espèce chimique. Pour avoir lieu, il faut que cette réaction soit associée à un couple qui sera pris dans une réaction de libération d'électron (Dumon, 2019; Lapinsonnière, 2013). Cette réaction s'appelle l'oxydation et on peut prendre pour exemple le couple  $\text{Fe}^{2+}_{(aq)}/\text{Fe}_{(s)}$  à un potentiel standard de -0,44 V à 25°C 1 bar (Bratsch, 1989). Dans cette réaction d'oxydation, le fer solide  $\text{Fe}_{(s)}$  perd 2 électrons pour passer à la forme ionique  $\text{Fe}^{2+}_{(aq)}$  faisant passer son degré d'oxydation de 0 à +II (Glasstone, 2011; Rieger, 1993). La réaction qui met en commun de ces deux couples d'oxydants et de réducteurs est appelé réaction d'oxydoréduction comme présenté avec l'Équation 18 (Dumon, 2019; Eliaz & Gileadi, 2019).

*Équation 18 : équation d'une réaction d'oxydoréduction*



### 1.1.3. Force électromotrice et spontanéité des réactions

L'utilisation de deux couples redox va donc entraîner une différence de potentiel standard entre les électrodes au niveau desquels ces couples sont présents. Cette différence se calcule selon l'Équation 19 et correspond à ce qu'on appelle force électromotrice (fém) (Dumon, 2019; Eliaz & Gileadi, 2019; Glasstone, 2011).

*Équation 19 : Calcul de la différence de potentiel standard*

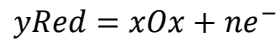
$$\Delta E^0 = E_1^0 - E_2^0$$

Une réaction d'oxydoréduction est alors thermodynamiquement possible dans le cas où cette différence  $\Delta E^0$  est supérieure à 0 (Glasstone, 2011; Rieger, 1993). C'est le cas notamment des piles qui vont générer de l'énergie électrique à partir d'énergie chimique (Lapinsonnière, 2013). Dans le cas où  $E_2^0 > E_1^0$ , la réaction n'est pas spontanément possible et nécessite un apport en énergie électrique, c'est le cas des électrolyseurs (Glasstone, 2011; Lapinsonnière, 2013; Rieger, 1993). On peut déterminer l'évolution de la force électromotrice qui régit ces systèmes à l'aide de l'équation de Nernst présenté dans l'Équation 20. L'équation de Nernst donne la relation entre le potentiel standard et le potentiel redox expérimental en fonction des concentrations des espèces d'un même couple redox, de la température et de la pression (Rieger, 1993). Ainsi, les activités des espèces chimiques présentes, que l'on peut convertir en concentration dans le cas où celles-ci sont assez faibles, sont directement liées à la force électromotrice et donc à la réalisation de la réaction d'oxydoréduction (Rieger, 1993).

Cette force électromotrice représente la tension maximale pouvant être obtenue dans une pile à une certaine concentration de ces espèces chimiques. Dans les électrolyseurs, elle représente la tension minimale nécessaire pour permettre les réactions de conversion d'énergie électrique en énergie chimique (Rieger, 1993).

Équation 20: équation de Nernst

$$E = E^0 - \frac{RT}{nF} \ln \left( \frac{a_{red}^y}{a_{ox}^x} \right)$$



$$\Delta E = E_1 - E_2$$

Soit pour des couples dans des conditions équivalentes :

$$\Delta E = E_1^0 - E_2^0 - \frac{RT}{nF} \ln \left( \frac{a_{red_1}^y \times a_{ox_2}^x}{a_{ox_1}^x \times a_{red_2}^y} \right) = \Delta E^0 - \frac{RT}{nF} \ln \left( \frac{[red_1] \times [ox_2]}{[ox_1] \times [red_2]} \right)$$

Avec :

$E$  = potentiel redox réel

$E^0$  = Potentiel standard

$R$  = Constante des gaz parfait (8,314 J/mol/K)

$T$  = Température en Kelvin

$n$  = Nombre d'électrons échangés

$F$  = Constante de Faraday (96485 C/mol)

#### 1.1.4. Electrocatalyse chimique

Dans les systèmes électrochimiques, il est parfois nécessaire d'ajouter des catalyseurs pour accélérer ou faciliter la réaction en plus de l'utilisation des électrodes solides (Lapinsonnière, 2013). Ces catalyseurs (électrocatalyseurs) sont utilisés dans les réactions où la différence de potentiel ne permet pas à la réaction d'avoir lieu dans les conditions expérimentales. L'électrode solide a également un rôle de catalyseurs dans ces réactions. Pour permettre une réaction d'oxydoréduction, ces catalyseurs permettent de faire varier le potentiel (ou l'énergie d'activation) auquel a lieu une réaction d'oxydation ou une réaction de réduction (Lapinsonnière, 2013). Ces catalyseurs peuvent être de différents types. Il y a les catalyseurs dits hétérogènes, comme les électrodes à l'état solide, utilisés pour faire réagir des espèces en solutions. Les catalyseurs homogènes qui sont dans la même phase que les espèces chimiques à faire réagir, soit en solution aqueuse. Les catalyseurs souvent utilisés en électrochimie sont des catalyseurs métalliques comme le platine (Lapinsonnière, 2013). Cependant, les coûts importants de ce type de catalyseurs à entrainer le développement de catalyseurs chimique (Lapinsonnière, 2013). Ces catalyseurs sont alors caractérisés selon



plusieurs points, à savoir leur sélectivité pour la réaction voulue, leur stabilité et leur activité. Dans le cas de la réduction de  $N_2$  en  $NH_3$ , la sélectivité d'une grande partie des catalyseurs est faible du fait de la réaction « parasite » de formation d' $H_2$  (Huang et al., 2023). Leur stabilité dépend des éléments utilisés et des effets physico-chimiques pouvant désactiver ces catalyseurs. On aura par exemple une saturation possible des sites actifs des catalyseurs par des espèces chimiques parasites. Finalement, leur activité correspond à la vitesse de réaction catalysée en leur présence. Enfin, en plus des catalyseurs chimiques et métalliques, il est devenu fréquent de retrouver des catalyses enzymatiques permettant de faciliter les réactions redox voulues mais avec le défaut d'être très spécifique pour les substrats à utiliser.

## 1.2. Les systèmes de bioélectrochimie microbiens pour la fixation biologique de $N_2$

### 1.2.1. Bioanode et fixation de $N_2$

Dans les systèmes bioélectrochimiques microbiens, les réactions d'oxydation et/ou de réduction sont catalysées par des micro-organismes capables d'échanger des électrons avec un conducteur électronique. On peut distinguer différents systèmes tels que la pile à combustible microbienne (MFC), qui repose sur une différence de potentiel positive entre les réactions de réduction et d'oxydation aux électrodes. La réaction d'oxydation dans la MFC est catalysée par les bactéries à l'anode et cette oxydation de la matière organique a un potentiel plus bas que la réduction de  $O_2$  à la cathode. Cette différence de potentiel positive permet aux électrons de se déplacer spontanément de l'anode vers la cathode (Moscoviz et al., 2019; Rabaey et al., 2003; Santoro et al., 2017). Les électrons alors fournis par une oxydation à l'anode et utilisés dans une réduction à la cathode permettent la production de courant électrique. Les MFC peuvent alors être utilisées pour oxyder la matière organique présente dans les eaux usées avec une récupération d'énergie. *Geobacter spp.* est un bon exemple de bactérie utilisée comme catalyseur bactérien anodique dans les MFC. Cette bactérie peut échanger des électrons avec une anode lorsqu'elle est alimentée en acétate comme source de carbone. Cette capacité permet d'utiliser la MFC comme biocapteur dans le traitement des eaux usées, la présence de différentes molécules telles que les métaux lourds peut être suivie par la modification du courant délivré par la MFC (Chung et al., 2016). Les bactéries électroactives (EAB) catalysent la production d'électrons dans la chambre anodique. Des EAB peuvent être ajoutées dans la chambre cathodique pour utiliser les électrons de la cathode mais on retrouvera généralement des cathodes abiotiques sur lesquels auront lieu des réactions de réduction comme celle d' $O_2$  énoncée précédemment.

Dans un système électrochimique, les catalyseurs sont des molécules qui peuvent interagir avec l'électrode dans des réactions d'oxydoréduction. Une limite de ce système est

l'épuisement de ces molécules au fil du temps. Dans les systèmes bioélectrochimiques microbiens, les catalyseurs sont des bactéries capables de se régénérer. Cependant, l'une des limites des systèmes bioélectrochimiques microbiens est la faible densité de courant obtenue. Les substrats utilisés dans ce type de système sont consommés avec une cinétique correspondant à une cinétique enzymatique. Lorsque le courant est trop élevé, les catalyseurs microbiens ne peuvent pas fournir de composés oxydés ou réduits à une vitesse suffisante pour que l'électrode maintienne la densité de courant (Lapinsonnière, 2013).

Pour la fixation biologique de  $N_2$ , ces systèmes présentent plusieurs avantages. L'utilisation d'une anode en conditions anaérobies permet l'utilisation de l'électrode comme accepteur final d'électron à la place d' $O_2$ . Ce qui permet le fonctionnement de la chaîne respiratoire tout en évitant les interférences causées par la présence d' $O_2$ . L'apport de matière organique qui est fait pour servir de substrat aux bactéries est également une source d'énergie (ATP et pouvoir réducteur) pour la fixation biologique de  $N_2$ .

### 1.2.2. Biocathode et fixation de $N_2$

Les réactions catalysées dans les systèmes bioélectrochimiques sont des réactions d'oxydoréduction. Ce type de réaction est basé sur un état d'équilibre entre les réactifs et les produits. Cet équilibre est symbolisé par une différence de potentiel qui indique si notre réaction d'oxydoréduction est spontanée dans des conditions spécifiques ou si elle nécessite un apport d'énergie. Dans les MFC, les réactions doivent être spontanées pour permettre la génération de courant et le courant est lié à la différence de potentiel positive entre l'anode et la cathode.

En plus de la pile microbienne, un autre système bioélectrochimique peut être utilisé pour transformer l'électricité en  $H_2$ . Ce type de système, appelé cellule d'électrolyse microbienne, où la différence de potentiel entre les électrodes est négative, les réactions redox sont thermodynamiquement non spontanées et un apport d'énergie est nécessaire. Ce type de système nécessite alors une alimentation en énergie pour démarrer les réactions en appliquant une différence de potentiel dans le système. La cellule d'électrolyse microbienne peut être utilisée pour la production d' $H_2$  avec une oxydation de la source de carbone organique (glucose, acétate, etc.) dans la bioanode, les électrons alors produits seront utilisés dans la chambre cathodique dans des réactions de réduction des protons en  $H_2$ . Ce système nécessite moins d'énergie que la production classique d' $H_2$  abiotique et peut produire un courant après un certain temps avec une faible différence de potentiel appliquée au système. La MEC nécessite presque 10 fois moins d'énergie que le processus d'électrolyse de l'eau pour une production égale. *Geobacter spp.* et *Clostridium spp.* sont les bactéries les plus utilisées

dans ce type de système. Elles sont utilisées comme biofilm anodique et comme oxydant de la matière organique. Comme dans les MFC, elles peuvent échanger des électrons avec l'anode, puis un courant électrique peut être produit avec le transfert d'électrons de la chambre anodique à la chambre cathodique. Un potentiel appliqué est également nécessaire pour la réaction de réduction dans la chambre cathodique où  $H_2$  est produit. Ce potentiel doit être très faible (moins de 1,23 V) pour éviter des réactions indésirables telles que l'hydrolyse de l'eau. La MEC peut également utiliser une biocathode avec des bactéries dites électrotrophes en tant que catalyseur de réactions de synthèse. Ces bactéries électrotrophes peuvent alors être utilisées pour la production d' $H_2$  ou pour l'électrosynthèse microbienne de molécule d'intérêt avec l'exemple de l'acétate. Ce système biocathodique peut être couplé une bioanode où la matière organique est oxydée ou une anode abiotique avec de l'oxydation de l'eau. Les systèmes avec biocathode peuvent également être utilisés pour la réduction et la production d'autres molécules d'intérêt comme le méthane, le peroxyde d'hydrogène ou d'autres. L'utilisation de micro-organismes dans la synthèse de différents composés d'intérêt n'est pas une nouvelle technologie, mais couplée à un processus électrochimique, une réaction d'oxydoréduction catalysée par des micro-organismes devrait être améliorée ; c'est l'intérêt de l'électrosynthèse microbienne (MES). La réduction du  $CO_2$  en composé d'intérêt à base de carbone est de ce fait étudiée en MES. Ce concept est basé sur la réaction de réduction permise dans la biocathode. Une MEC avec un phénomène de MES peut être utilisée pour la production de méthane, d'acétate, de formiate ou d' $H_2$  à partir d'eaux usées.(Jourdin et al., 2015; J. Li et al., 2020; S. A. Patil et al., 2011). Ce procédé peut être couplé à un panneau solaire en raison d'une faible demande en énergie. Les réactions d'électrosynthèse microbienne sont également étudiées pour permettre la conversion de l'électricité en structures chimiques stockables, comme la production de méthane à partir de  $CO_2$  et d'électricité. Le méthane ainsi produit peut-être stocké et brûlé pour libérer de l'énergie utilisable.(F. Zhou et al., 2017). Les communautés de méthanogènes sont alimentées en électrons pour augmenter le taux de production de méthane. Le  $CH_4$  et le  $H_2$  sont deux sources d'énergie différentes, qui peuvent être utilisées pour stocker de l'énergie en la convertissant en ces deux molécules qui peuvent être brûlées pour libérer à nouveau leur énergie (Jourdin et al., 2015; F. Zhou et al., 2017). Ces deux sources sont intéressantes en raison de leur pouvoir de conversion en énergie. Mais alors que la consommation d'hydrogène produit de l'eau, le méthane est converti en  $CO_2$ .

L'électrosynthèse microbienne correspond à la réaction catalysée par les EAB dans la chambre cathodique avec la synthèse de molécule d'intérêt en utilisant les électrons apportés à la cathode. Dans l'électrosynthèse microbienne, la différence de potentiel entre les deux électrodes est négative, les réactions ne sont pas spontanées et un apport d'énergie est

nécessaire pour permettre les réactions. Un potentiel appliqué permet la réaction avec un apport d'énergie dans le système pour favoriser la réaction de réduction cathodique.

Pour la fixation biologique de  $N_2$ , ce type de système apporte plusieurs avantages. Le premier va être sur la protection à  $O_2$  en aérobie. En effet, l'application d'un potentiel bas à la cathode va rendre favorable la réduction d' $O_2$  comme le montre l'échelle des potentiels en Figure 1-9. Tous les couples dont le potentiel est plus élevé que le potentiel appliqué à la cathode seront thermodynamiquement possibles. Ainsi, les accepteurs d'électrons comme  $O_2$  sont réduits. Pour  $O_2$ , deux réductions sont possibles pour passer d'abord à la production d' $H_2O_2$  avec deux électrons. Puis avec l'apport de deux autres électrons, le peroxyde d'hydrogène est réduit en eau  $H_2O$ . Ces réactions vont donc permettre la formation de zone d'anaérobie autour de la cathode et former un gradient comme ce que l'on peut retrouver dans les nodules des plantes, mais avec une stratégie différente. Ainsi, les accepteurs d'électrons de ce type de système sont par exemple les sulfates ou les protons. En anaérobie, la cathode n'aura pas besoin d'apporter cette protection et les électrons qui y sont apportés, si le potentiel appliqué est assez bas, vont servir à la formation d' $H_2$ . Ce  $H_2$  est alors utilisable par les bactéries chimolithotrophes comme donneur d'électron et comme source d'énergie. Dans le cas où les bactéries présentes seraient électrotrophes, elles vont pouvoir se servir de la cathode directement comme donneuse d'électron et d'énergie pour la fixation de  $N_2$  ou pour celle du  $CO_2$  par exemple.

## 2. DEVELOPPEMENT ET PROTOCOLE DE LA METHODE D'ANALYSE DE LA REDUCTION DE L'ACETYLENE (ARA)

### 2.1. Principe

Les nitrogénases telles que présentées dans le chapitre 1-Chapitre 1 - 1.2 sont capables de réaliser plusieurs réactions en plus de la réduction de  $N_2$ . On retrouve la réduction du proton pour la formation d' $H_2$  mais aussi la réduction de l'acétylène ( $C_2H_2$ ) en éthylène ( $C_2H_4$ ) ou par exemple la réduction de l'acide cyanhydrique (HCN) en formaldéhyde ( $CH_2O$ ) ou méthane ( $CH_4$ ) et  $NH_3$  (Seefeldt et al., 2013). On note également qu'il a été montré des capacités de fixation de CO et  $CO_2$  par des nitrogénases pour former du  $CH_4$  par exemple (Seefeldt et al., 2013). Ces réactions, comme pour la fixation de  $N_2$ , vont demander un apport d'énergie avec notamment la réduction de  $C_2H_2$  en  $C_2H_4$  avec deux électrons et deux protons (Soper et al., 2021). Cette réaction présente donc une différence avec la fixation biologique de  $N_2$  de 4:1 mole de  $C_2H_2$  réduite par mole d'azote réduite d'après les nombres d'électron (Équation 1). Or, d'après les observations, des ratios très variables peuvent être obtenus pour différente niche et c'est finalement le ratio de 3:1 qui est retenu (Soper et al., 2021). Cette réaction est

cependant spécifique de la présence de fixation biologique de N<sub>2</sub> (Bergersen, 1970). C'est pourquoi cette méthode a été choisie pour mettre en évidence le phénomène de fixation de N<sub>2</sub>. En absence d'autre mesure, celle-ci est utilisée comme indicateur pour la vitesse de réduction de C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>. Cette réduction est bien synonyme de fixation de N<sub>2</sub> mais le rapport 3:1 (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) de conversion est encore discuté (Soper et al., 2021). En présence d'autres mesures des quantités et vitesses de fixation de N<sub>2</sub> (d'après l'estimation de la biomasse et/ou NH<sub>4</sub><sup>+</sup> et/ou azote dans les masses sèches du milieu), l'estimation de l'azote fixé d'après la méthode ARA est comparée et discutée par rapport aux autres observations.

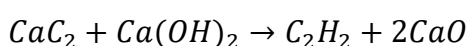
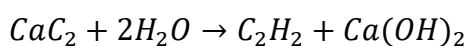
## 2.2. Procédure

Les étapes de préparation de gaz, injection dans les différentes cultures et prélèvements sont présentés ici.

### 2.2.1. Préparation du gaz (acétylène C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>)

Cette étape peut être ignorée dans le cas d'utilisation d'éthylène pur reçu en bouteille de gaz. Dans le cas où ce gaz ne serait pas disponible, il est possible d'utiliser du carbure de calcium (CaC<sub>2</sub>). En effet, le mélange de CaC<sub>2</sub> dans l'eau va permettre la réaction de formation de l'acétylène comme le présente l'Équation 21.

*Équation 21 : Réaction de production d'acétylène (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>) à partir de carbure de calcium (CaC<sub>2</sub>).*



Cette réaction est exothermique. Le C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> étant très inflammable, sa préparation se fait sous hôte aspirante avec port des équipements de protection individuelle (gants, blouse, lunettes). Il faut 7,7 grammes de CaC<sub>2</sub> pour la production de 1L d'acétylène C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>. Pour la mesure de la fixation de N<sub>2</sub>, une concentration de 10% v/v d'acétylène dans l'espace de tête est recommandé. Il faut alors calculer le volume à produire en fonction des espaces de têtes des réacteurs utilisés. Par exemple, dans le cas des cultures de souches pures, avec un espace de tête d'environ 70-80 ml par réacteur, il faut prévoir 7-8 ml par culture soit pour 8 bouteilles. On a donc à préparer environ 0,5g de CaC<sub>2</sub> au minimum (un supplément de 20% du volume est conseillé pour éviter des manques possibles et chasser l'air lors de la préparation soit ici un rajout de 0,1g).

Pour la réaction, une bouteille Schott de 1L est utilisée avec un bouchon percé. La sortie sur le bouchon est alors reliée à une vanne permettant la sortie de gaz sous la hotte ou dans une poche en plastique Tedlar de 1 à 5L en fonction des besoins. On ajoute alors 0,5L d'eau osmosée à la bouteille avant ajout de 0,2g de  $\text{CaC}_2$  pour chasser l'air. On laisse alors la sortie sur l'évacuation sous la hotte pendant 10 min avant ajout de la quantité de  $\text{CaC}_2$  nécessaire pour notre volume d'acétylène. On change alors la sortie de la bouteille vers la poche de gaz jusqu'à fin de la réaction. Après ça, le sac est fermé et sa composition est évaluée au Clarus CPG480 pour confirmer la production de  $\text{C}_2\text{H}_2$  et une quantité d'air suffisamment faible dans le sac. La bouteille est ensuite laissée ouverte sous la hotte aspirante pour laisser l'air prendre la place de l'acétylène restant. Le  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  et  $\text{CaO}$  dans l'eau sont évacués avec les déchets chimiques liquides.

### *2.2.2. Injection d'acétylène dans les cultures*

10% des gaz de chaque culture sont à remplacer par de l'acétylène à l'aide d'une seringue de taille adaptée. Le volume est calculé en fonction de la composition de gaz du sac de gaz. Pour les bouteilles de culture de souche pure par exemple, pour un sac à 100% d'acétylène, un volume de 7-8 mL est retiré de chaque bouteille à tester et est remplacé par le même volume d'acétylène. Dans le cas d'une composition de 90% d'acétylène et 10% d'air, le volume à retirer est de 8,9 mL et à remplacer par ce même volume pour conserver la concentration en acétylène finale de 10%. L'apport en acétylène est confirmé par CPG 480.

### *2.2.3. Mesure de l'éthylène*

Une fois le  $\text{C}_2\text{H}_2$  ajouté aux espaces de tête des cultures, une première mesure des espaces de têtes est réalisée. Cette première mesure sert de point initial de la méthode. Après ça, des prélèvements sont effectués après 4-5h si possible puis toutes les 24h-72h. Les quantités d'éthylène mesurées sont alors comparés à la dernière mesure sans éthylène quantifiable ou la précédente mesure si de l'éthylène était déjà observé.

### *2.2.4. Calibration de la CPG480 pour la lecture de l'acétylène*

Pour assurer la calibration de la lecture de ce gaz, un sac a été préparé avec plusieurs vidanges du sac par pompe à vide entre deux productions de  $\text{C}_2\text{H}_2$  en bouteille. Trois vidanges ont été nécessaires pour éliminer toute trace de  $\text{N}_2$  et  $\text{O}_2$  du sac. Après ça, le gaz a été utilisé dans des injections à plusieurs volumes pour calibrer la réponse de la CPG en fonction de la quantité d'acétylène présent. Pour la calibration de la mesure du produit de réduction de l'acétylène, à savoir l'éthylène ( $\text{C}_2\text{H}_4$ ), une bouteille d'éthylène  $\text{C}_2\text{H}_4$  pure de 1L de Linde Gas a été utilisée

pour des injections de gaz à plusieurs quantités. Il s'avère que sur les colonnes utilisées, la séparation de  $C_2H_4$  et de  $CO_2$  n'est pas complète. Un gradient de température (40°C à 55°C) a été utilisé pour améliorer la séparation avant calibration. Le gradient n'étant pas suffisant, un piège à  $CO_2$  à base de soude a été nécessaire pour éliminer les dernières traces de  $CO_2$ . Des mélanges fait main à faible concentration en  $CO_2$  et acétylène par rapport à de l'air (1/1/98) ont été utilisés pour valider la séparation de  $CO_2$  et acétylène en petite quantité.

#### 2.2.5. Piège à soude

Pour éliminer le  $CO_2$ , des pièges à  $CO_2$  à base de soude (NaOH) 6M-8M ont été utilisés. Pour être utilisé, une première seringue de 3mL était utilisée pour le prélèvement de 2,5mL de gaz. Cette seringue a ensuite été connectée à une seringue de 5mL remplie avec 2-3 mL de NaOH. La connexion entre les deux seringues doit être le plus hermétique possible. On injecte alors le gaz de la première seringue au travers de la soude de la seconde seringue comme le présente la Figure 0-1. Après avoir fait passer tout le gaz à travers la solution de soude, on retourne les deux seringues pour venir prélever uniquement le gaz avec la première seringue pour répéter l'opération trois fois. Après un dernier passage dans la solution de soude, le gaz est récupéré à l'aide des seringues adaptées pour les injections sur CPG (250 $\mu$ L SGE Syringe, 250F-LL-GT) avant injection sur la CPG480. La quantité de  $CO_2$  est mesurée par injection sans piège à soude, les quantités de  $C_2H_4$  retrouvée étant suffisamment faible pour ne pas avoir d'impact sur les concentrations de  $CO_2$  (moins de 1% de  $C_2H_4$  contre près de 50 à 80% de  $CO_2$ ). La quantité réelle de  $C_2H_4$  est alors calculée en retirant la pression partielle de  $CO_2$  à la pression mesurée dans l'espace de tête des réacteurs dans la loi des gaz parfait présentée dans la partie sur le Bilan matière. Enfin, la quantité de  $C_2H_4$  en phase aqueuse est calculé selon la loi de Henry.

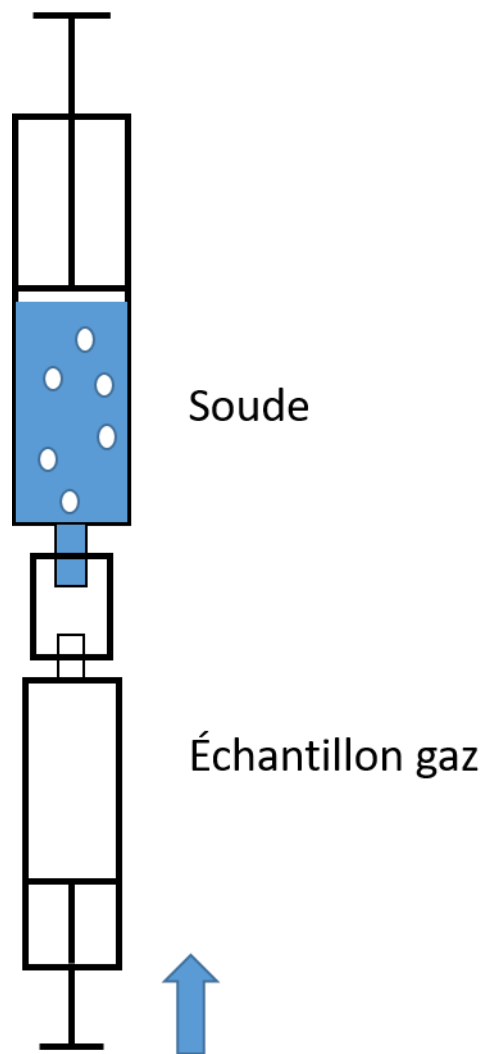


Figure 0-1 : Montage du piège à soude utilisé avec en bas la seringue contenant l'échantillon de gaz qui est vidé pour faire buller son gaz dans le NaOH de la seringue supérieure. Une fois tout le gaz passé, le système est retourné pour récupérer uniquement du gaz dans la première seringue avant de reproduire la première étape. Si le système est bien hermétique, le volume de gaz retrouvé dans la deuxième seringue doit diminuer par rapport à celui de la première seringue.

### 3. INHIBITION DES NITROGÉNASES

#### 3.1. Inhibition des nitrogénases par l'azote assimilable

L'azote assimilable est un élément inhibiteur de l'activité des nitrogénases. En présence d'azote, la concentration en glutamine intracellulaire augmente, en tant qu'intermédiaire dans l'assimilation de l'azote (W. Zhang et al., 2023). La glutamine active le système de gestion de la concentration en azote en activant une protéine GlnD. Cette activation va permettre une activité d'acylation de-uridine qui va retirer des groupements uridine mono-phosphate (UMP) présent sur les monomères d'une protéine GlnK comme le présente la Figure 0-2 (W. Zhang et al., 2023). La protéine GlnK sans UMP se fixe ensuite à la protéine NifL pour permettre sa liaison avec la



protéine NifA. Ces deux protéines sont les produits de la transcription de l'opéron *nifLA* (W. Zhang et al., 2023). La protéine NifL a un rôle d'inactivation de l'activité de la protéine NifA qui a le rôle de promoteur de la transcription des autres gènes *nif* (*nifHDK* pour l'opéron des gènes structuraux, commun aux trois nitrogénases) (W. Zhang et al., 2023). Cette inactivation se fait en bloquant l'interaction de NifA avec l'ADN (W. Zhang et al., 2023). NifA ne peut alors plus se fixer comme promoteur de la transcription des différents gènes *nif*.

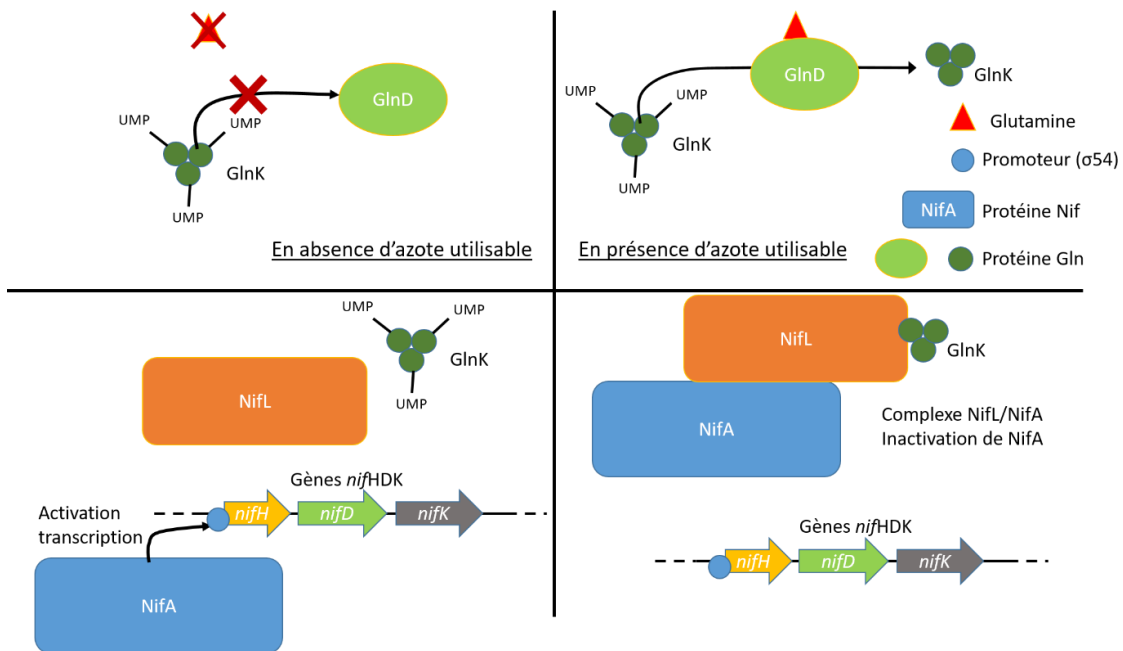


Figure 0-2 : Système de régulation NifLA de la transcription des gènes *nif* en réponse à la présence d'azote utilisable et système de gestion de la concentration en azote utilisable GlnDK (W. Zhang et al., 2023). En présence d'azote, la glutamine intracellulaire augmente. Sa fixation avec la protéine GlnD active l'activité d'acylation de-uridine et clive les uridine monophosphate (UMP) des monomères de protéine GlnK. La protéine GlnK sans UMP se fixe sur la protéine nifL. Cette fixation active la fixation de la protéine NifL à la protéine NifA. La protéine NifA a pour rôle l'activation de la transcription par liaison avec le promoteur  $\sigma_{54}$  des gènes *nif*. Le complexe nifL/NifA ne peut plus se fixer sur le promoteur, il n'y a donc pas d'activation de la transcription.

D'autres bactéries comme *Azospirillum brasilense* montrent un mécanisme différent avec la synthèse d'une protéine PII en présence d'azote utilisable (Colnaghi et al., 1997). La liaison entre NifA et cette protéine PII entrainerait un changement de conformation, inactivant NifA (Colnaghi et al., 1997). Une inhibition de la transcription de NifA a également été observée (Colnaghi et al., 1997). Cette inhibition se fait par inactivation de la protéine promotrice de la transcription de *nifA*, NtrC-PO<sub>4</sub> qui est présente uniquement dans des conditions de faible présence d'azote (Colnaghi et al., 1997). Dans certains cas, une double inhibition par

l'inactivation de NifA et l'inhibition de son expression peut avoir lieu pour certains organismes (Colnaghi et al., 1997).

### 3.2. Inhibition des nitrogénases par O<sub>2</sub>

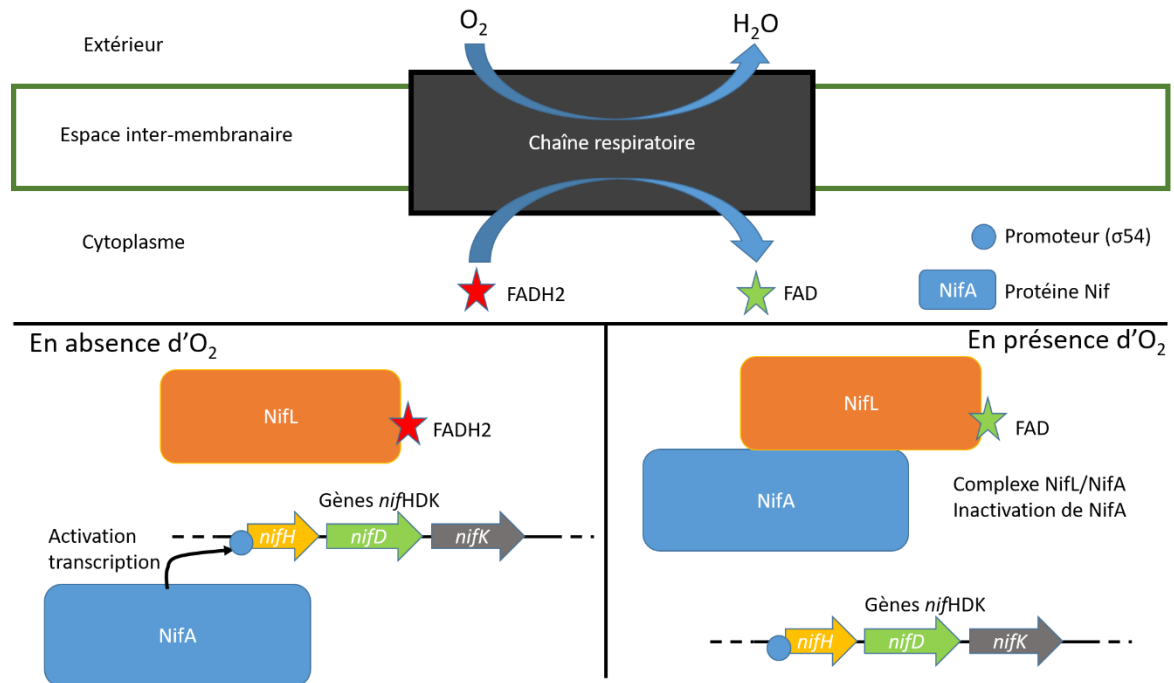


Figure 0-3 : Schéma de la régulation de la transcription des gènes *nif* par le système *nifLA* en réponse à la présence d'O<sub>2</sub> (W. Zhang et al., 2023). En présence d'O<sub>2</sub>, la chaîne respiratoire oxyde la coenzyme redox pour apporter du pouvoir réducteur pour la réduction d'O<sub>2</sub>. La coenzyme FAD/FADH<sub>2</sub> se fixe à la protéine NifL et active son rôle de blocage de NifA uniquement quand le complexe NifL/FAD est oxydé (FAD/FADH<sub>2</sub> sous forme FAD). La présence d'O<sub>2</sub> entraîne l'arrêt de la transcription des gènes *nif*.

L'O<sub>2</sub> a la possibilité d'endommager les nitrogénases, notamment les noyaux métalliques par son pouvoir d'oxydant. En présence d'une trop forte concentration en O<sub>2</sub>, l'inactivation de la nitrogénase peut se faire par un changement de conformation induit par une protéine intracellulaire. C'est notamment le cas de certains *Azotobacter* et la protéine FeSII (Schlesier et al., 2016). Ce changement de conformation possède un rôle de protection des nitrogénases aux dommages causés par l'oxydation par O<sub>2</sub>. D'autres bactéries pouvant fixer N<sub>2</sub> en présence d'O<sub>2</sub> comme *Azospirillum* utilisent la chaîne respiratoire qui entre en compétition avec la nitrogénase pour les électrons disponibles (Hartmann & Burris, 1987). Cela entraîne une inhibition de l'activité de fixation de N<sub>2</sub> et une protection contre l'O<sub>2</sub> (Hartmann & Burris, 1987). Pour les bactéries anaérobies strictes, l'O<sub>2</sub> présente cet effet inactivateur des nitrogénases et est délétère pour d'autres réactions comme la respiration anaérobie. Des réponses similaires à celle des bactéries aérobies vont avoir lieu pour protéger les nitrogénases.

En plus de la protection mise en place pour protéger la nitrogénase, un arrêt de sa synthèse peut avoir lieu avec le système NifAL comme vu pour les inhibitions face à l'azote. Cette inactivation est causée par l'oxydation de FADH<sub>2</sub> à la chaîne respiratoire en réponse à la présence d'O<sub>2</sub> comme le présente la Figure 0-3 (W. Zhang et al., 2023). Le FAD se fixe à la protéine NifL, ou directement à NifA en fonction des bactéries. L'état oxydé du complexe NifL/NifA empêche la liaison avec l'ADN (W. Zhang et al., 2023). La transcription des gènes *nif* est donc inhibé tant que la concentration en O<sub>2</sub> est trop importante.

## 4. FIGURES SUPPLÉMENTAIRES

### 4.1. Courbe densité/potentiel

Les courbes densité/potentiel ont été obtenus par mesure de voltammétrie cyclique. Pour les travaux sur l'anode, la gamme de potentiel balayée était de -0,26 V vs SHE (-0,5 V vs SCE) à 0,64 V vs SHE (0.4 vs SCE). Pour les cathodes, la gamme de potentiel balayée était de -0,76 V vs SHE à 1,24 V vs SHE (-1 à 1 V vs SCE). Dans tous les cas, la vitesse de balayage était de 1 mV/s. Pour chaque voltammétrie, le balayage a été répété deux fois. La courbe intensité-potentiel obtenue était considérée comme correcte au deuxième balayage.

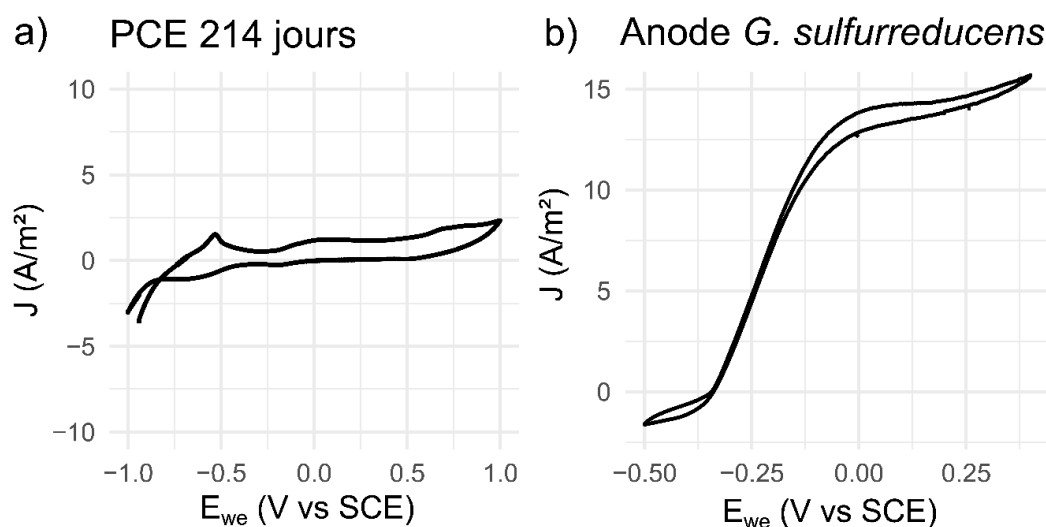


Figure 0-4 : Courbes densité potentiel mesurées a) à 214 jours d'enrichissement pour les cultures PCE et b) après 15 jours de cultures de *G. sulfurreducens* en bioanode. Un scan rate de 1mV/s

### 4.2. Contamination des cultures de souches pures

Les cultures de bactéries en souches pures ont montré des contaminations. Ces résultats sont issus du séquençage d'échantillon issu de culture en milieu riche inoculé par des tubes de cryo-banque préparés après réception des souches des différentes banques (DSMZ et institut

Pasteur). Les contaminations ont pu survenir avant réception des souches comme le laisse supposer la forte dominance d'un *Staphylococcus* dans les bouteilles de culture de *μX. autotrophicus*. Ces contaminations ont également pu survenir lors de la préparation des cryo-banques ou pendant les repiquages avec utilisation d'un milieu riche. On peut supposer que ces contaminations sont survenues dans les cultures séquencées, ce qui rendrait inutilisable le dernier batch avec H<sub>2</sub> comme source d'énergie, mais en absence de plus de séquençage, il nous est impossible de conclure sur la validité des autres cultures et la présence de nos bactéries.

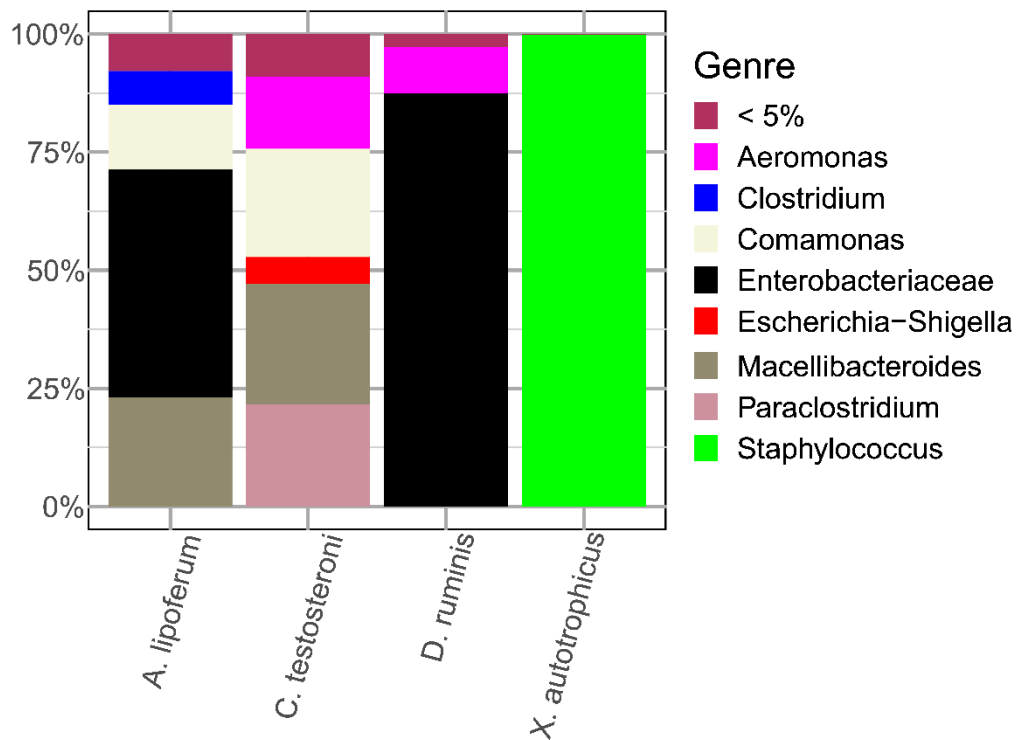


Figure 0-5 : Abondance relative des différents genres bactériens retrouvés dans nos cultures de souches pures après repiquages des cryo-banques dans du milieu riche et une culture de 4 jours.