



République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi Bordj Bou Arréridj  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de  
la Terre et de l'Univers  
Département des Sciences Biologiques  
Laboratoire Caractérisation et Valorisation des Ressources Naturelles



Thèse

En vue de l'obtention du Diplôme de Doctorat  
Domaine S.N.V.  
Filière : Sciences Biologiques  
Spécialité : Biochimie

INTITULE

Valorisation énergétique des déchets et sous-produits de l'industrie  
agroalimentaire pour la production du biohydrogène

Présentée par : ABADA Bachira

Soutenu le 07/12/2021 Devant le Jury :

Président	BENTABET Abdelouahab	Professeur	UNIV-BBA
Directeur de thèse	BOUMERFEG Sabah	Professeur	UNIV-BBA
Co-directeur de thèse	ETIENNE Mathieu	MCA	LCPME-CNRS
Examineur	ROUAG Nouredine	Professeur	UNIV-Sétif 1
Examineur	SAFFIDINE Karima	MCA	UNIV-Sétif 1
Examineur	BENDIF Hamdi	MCA	UNIV-M'sila
Examineur	ALIAT Toufik	MCA	UNIV-BBA

Année Universitaire : 2020-2021

## Dédicaces

A mes très chers parents qui ont toujours été là pour moi, et qui m'ont donné un magnifique modèle de labeur et de persévérance. Ma très chère Maman, tu m'as toujours soutenu et aidé à prendre les décisions les plus importantes dans ma vie. Tu m'as transmis ton amour pour les études et le savoir et inculqué les valeurs morales et les clés de la réussite. Oh ! Maman je ne te remercierai jamais assez, je t'aime Maman.

Mon très cher Papa, je t'offre cette belle réussite de la ville où tu as vu le jour, la terre de mes ancêtres. J'y suis arrivée grâce à tes encouragements, tu m'as toujours poussé de l'avant et cru en moi ! Tu as toujours été mon modèle dans la rigueur et le sérieux, vénéré la connaissance et la science, et j'ai hérité ça de toi.

Merci mes chers Parents

A mes chers frères et sœurs, Seloua, Souad, Amel, Amine et Hamza qui m'ont toujours soutenue et écouté dans les moments difficiles.

A Mon cher Mari, Mohamed qui m'a toujours aidé, supporté dans les sauts d'humeur et le stress de la thèse. Merci pour tout.

A mes adorables enfants, à qui je demande pardon pour mes moments d'absences au cours de la réalisation de cette thèse, ce n'est que partie remise.

## **Remerciements**

Ma reconnaissance et mes remerciements sont adressés à Mme le Professeur Sabah Boumerfeg, ma directrice de thèse, qui était toujours présente et préoccupée de l'avancement des travaux, mais aussi du bien être moral de son étudiante.

Je remercie également Dr Ahmed Haddad du CRTI, de m'avoir ouvert la porte de son laboratoire et effectué mes premières manipulations en électrochimie. Merci Mr Haddad.

Je tiens à remercier sincèrement mon co-encadreur Dr ETIENNE Mathieu de m'avoir guidé et pour sa disponibilité tout au long de ce travail, ainsi que ses conseils et ses orientations.

J'adresse mes remerciements les plus sincères à l'ensemble des membres de jury qui m'ont fait l'honneur de bien vouloir évaluer et juger ce travail.

Je tiens à remercier vivement et pas assez Melle Faiza Bali, pour toute l'aide précieuse qu'elle m'en a fait profiter.

Un grand merci également à toute l'équipe pédagogique de l'université de Bordj Bou Arreridj et les intervenants professionnels responsables de ma formation.

## Résumé

L'utilisation des biocathodes dans les systèmes bioélectrochimiques (BES) pour éliminer les nitrates et les nitrites des eaux usées est devenue un domaine de recherche important. Notre objectif est d'étudier la capacité de certaines bactéries à éliminer les polluants grâce à un système électrochimique. A travers cette étude, nous tentons à expliquer un mécanisme de transfert de charge direct entre la bactérie et la cathode. À cette fin, nous avons choisi cinq espèces bactériennes, *Shewanella oneidensis* (MR1), *Thiobacillus denitrificans*, *Pseudomonas fluorescens*, et *Escherichia Coli*, incorporées comme catalyseurs dans des biofilms. Ces biofilms ont été employés dans un screening bactérien pour détecter le transfert extra cellulaire direct des électrons, ce qui a permis par la suite d'appliquer dans la réduction des nitrates et les nitrites dans le système bioélectrochimique (BES). Le screening bactérien a démontré la non capacité de *Escherichia Coli* et *Pseudomonas fluorescens* à échanger les électrons directement avec la cathode et donc utilisées comme témoin. Cependant *Shewanella oneidensis* et *Thiobacillus denitrificans* ont montré une activité électrochimique par le biais de la voltammétrie cyclique et l'ampérométrie aux potentiels de -0,35 V et -0,7 V vs Ag/Ag Cl respectivement, au cours de la réduction des nitrates et nitrites par MR1, et à différentes concentrations de nitrate ; 0 mM ; 10 mM ; 20 mM ; 40 mM ; 60 mM et 80 mM, sous contrôle de température fixée à 30 C°. Les résultats obtenus démontrent une augmentation de 30 J /Aμ cm<sup>2</sup> est obtenue à chaque 20 mM de nitrite rajoutée, ce qui correspond à 50 J /Aμ cm<sup>2</sup> et 80 J /Aμ cm<sup>2</sup> avec MR-1. La densité du courant a atteint -145 J/μA cm<sup>2</sup>, ce qui est 10 fois plus de plus grande, Le pic est observé au voisinage de -0.46 V, dans le cas de *T. denitrificans*, Chez MR1 une augmentation est enregistrée avec un pic de -150 J/μA cm<sup>2</sup> au voisinage de -0,45 V. Une influence de la concentration bactérienne avec MR1 a donné en présence du NO<sub>3</sub> Une augmentation de 0.15 et 0.02 J /μA cm<sup>2</sup> est enregistrée respectivement à partir d'une DO de 0.4 et 0.6. Cependant, elle disparaît à une DO de 0.2. Nous avons également établi un modèle de transfert de charge et de matière à partir des données d'impédance. Les résultats obtenus avec la variation de concentrations bactériennes, nous permettent d'aller vers la possibilité de faire un modèle de biocapteur bactérien. Les travaux sur l'électrolyseur inoculé par les boues sédimentaires des eaux saumâtres d'Ouargla, ont été testés pour leur rendement en biohydrogène, suite à un couplage entre fermentation et bioélectrochimie.

**Mots-clés:** Biodénitrification , Système Bioélectrochimique, Voltammétrie cyclique, Biofilms, Cellule électrochimique microbienne, Nitrate reductase.

## Abstract

The use of biocathodes in bioelectrochemical systems (BES) to remove nitrates and nitrites from wastewater has become an important area of research. Our goal is to study the ability of certain bacteria to eliminate pollutants using an electrochemical system. Through this study, we try to explain a direct charge transfer mechanism between the bacteria and the cathode. To this end we have chosen five bacterial species, *Shewanella oneidensis*, *Thiobacillus denitrificans*, *Pseudomonas fluorescens*, and *Escherichia Coli*, incorporated as catalysts in artificial biofilms designed by us in the laboratory during the work of the thesis. These biofilms were used in a bacterial screening to decelerate the direct extracellular transfer of electrons, which subsequently made it possible to apply in the reduction of nitrates and nitrites in the bioelectrochemical system (BES). Bacterial screening demonstrated the inability of *Escherichia Coli* and *Pseudomonas fluorescens* to exchange electrons directly with the cathode and used as a control. However, *Shewanella oneidensis* and *Thiobacillus denitrificans* showed electrochemical activity through cyclic voltammetry and amperometry a potential of -0.35 V and -0.7 V vs Ag / Ag Cl respectively, during the reduction of nitrates and nitrites by MR1, and at different concentrations of nitrate; 0 mM; 10 mM; 20 mM; 40 mM; 60 mM and 80 mM, under temperature control fixed at 30 C°. The results obtained show an increase of 30 J /Aμ cm<sup>2</sup> is obtained with each 20 Mm of nitrite added, which corresponds to 50 J /Aμ cm<sup>2</sup> and 80 J /Aμ cm<sup>2</sup> with MR-1. The current density reached -145 J/μA cm<sup>2</sup>, which is 10 times greater, the peak is observed in the round of -0.46 V, in the case of *T. denitrificans*, In MR1 an increase is recorded with a peak of -150 J/μA cm<sup>2</sup> in the round of -0.45 V. An influence of the bacterial concentration with MR1 gave in the presence of NO<sub>3</sub> an increase of 0.15 and 0.02 J J/μA cm<sup>2</sup> is recorded respectively from an OD of 0.4 and 0.6. However, it disappears at an OD of 0.2. We also established a charge transfer model from the impedance data. The results obtained with the variation of bacterial concentrations, we allow to go towards the possibility of making a model of bacterial sensor and nitrate sensor. The work on the electrolyzer inoculated with sedimentary sludge from the brackish waters of Ouargla, has been tested for its biohydrogen yield, following a coupling between fermentation and bioelectrochemistry.

**Keywords:** Bionitrification, Bioelectrochemical system, cyclic voltametry, Microbial electrochemical cell, Nitrate reductase; Biofilm.

## الملخص

أصبح استخدام الكاثودات الحيوية في الأنظمة الكهروكيميائية الحيوية (BES) لإزالة النترات والنترت من مياه الصرف مجالاً مهماً للبحث. هدفنا دراسة قدرة بعض البكتيريا على التخلص من الملوثات باستخدام نظام كهروكيميائي. من خلال هذه الدراسة، نحاول شرح آلية نقل الشحنة المباشرة بين البكتيريا والكاثود لتحقيق هذه الغاية، اخترنا خمسة أنواع من البكتيريا، *Escherichia Coli*، والتي تم دمجها كمحفزات في الأغشية الحيوية الاصطناعية التي صممناها في المختبر أثناء عمل الأطروحة. تم استخدام هذه الكائنات الحيوية في الفحص البكتيري لإبطاء النقل المباشر خارج الخلية للإلكترونات، مما جعل من الممكن لاحقاً تطبيقه في تقليل النترات والنترت في النظام الكهروكيميائي الحيوي. أظهر الفحص البكتيري عدم قدرة *Escherichia Coli* و *Pseudomonas fluorescens* على تبادل الإلكترونات مباشرة مع الكاثود واستخدامها كعنصر تحكم. ومع ذلك، أظهر *Shewanella oneidensis* و *Thiobacillus denitrificans* نشاطاً كهروكيميائياً من خلال قياس الجهد الدوري وقياس التيار بقوة 0.35 فولت و 0.7 فولت مقابل  $Ag / Ag Cl$  على التوالي، أثناء تقليل النترات والنترت بواسطة MR1، وبتراكيزات مختلفة من النترات؛ 0 مم 10 ملم 20 ملم 40 ملم 60 ملم و 80 ملم، تحت درجة حرارة ثابتة (30 درجة مئوية). أظهرت النتائج المتحصل عليها زيادة  $30 J / A\mu$  سم 2 مع إضافة كل 20 ملم من النترت، والذي يتوافق مع  $50 J / A\mu$  سم 2 و  $80 J / A\mu$  سم 2 مع MR-1 وصلت الكثافة الحالية إلى  $145 J / A$  سم 2، وهي أكبر بـ 10 مرات، لوحظت الذروة في جولة 0.46 فولت، في حالة *T. denitrificans*، في MR1 تم تسجيل زيادة مع ذروة  $150 J / \mu A$  سم 2 في جولة 0.45 فولت. أعطى تأثير التركيز البكتيري مع MR1 في وجود  $NO_3$  زيادة قدرها 0.15 و  $0.02 JJ / A$  سم 2 على التوالي من OD 0.4 و 0.6. ومع ذلك، فإنه يخفت عند OD 0.2. أنشأنا أيضاً نموذج نقل التغيير من بيانات الممانعة. النتائج التي تم الحصول عليها مع تباين التراكيزات البكتيرية، تسمح بالتوجه نحو إمكانية صنع نموذج لمستشعر البكتيريا ومستشعر النترات. تم اختبار العمل على المحلل الكهربائي الملقح بالحماة الرسوبية من المياه قليلة الملوحة في ورقلة، من أجل إنتاج الهيدروجين الحيوي، بعد اقتران بين التخمير والكيمياء الكهربائية الحيوية.

## Liste des abréviations

BES: Bio Electrochemical Systems

CNT : Nanotube(s) de carbone

DLS : La diffusion dynamique de la lumière (en anglais, dynamic light scattering ou DLS)

EPS : Substances polymériques extracellulaires

E vs Ag/ AgCl V:

E= potential, vs= Vitesse de balayage, Ag/Agcl= electrode de reference

FTIR : Analyse Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier.

IAA : Industries Agro-alimentaires

J/  $\mu\text{Acm}^{-2}$  : Densité du courant électrique

LPS : Lipopolysaccharides

MFC : Microbial fuel cell

MWCNT : Multi-Wall Carbon NanoTubes

n A : Nanoampère

PEI : Polyéthylèneimine

PI : Iodure de propidium

TSA : Trypticase soja agar

TSB : Trypticase soja bouillon

$\mu\text{A}$  : Microampère

## Liste des figures

<b>Figure 1 :</b> Schéma des étapes successives de la formation d'un biofilm sur une surface, microimages du biofilm	11
<b>Figure 2:</b> Différents biofilms Biofilms	12
<b>Figure 3:</b> Mécanismes de transfert d'électrons aux électrodes.	15
<b>Figure 4:</b> Mécanisme de transferts extracellulaires d'électrons dans les biofilms électroactifs	16
<b>Figure 5:</b> Voies des Mtr de <i>Shewanella oneidensis</i> MR-1.	19
<b>Figure 6:</b> Mécanismes de transferts extracellulaires d'électrons par contact direct chez <i>Geobacter sulfurreducens</i> PCA.	20
<b>Figure 7:</b> Représentation des différentes sous-unités de dénitrification	23
<b>Figure 8:</b> La connection des cellules bactériennes	24
<b>Figure 9:</b> Deux modèles d'appendices conducteurs	26
<b>Figure 10:</b> Différentes chaînes respiratoires possibles chez <i>E. coli</i> (Call &, Logan. 2007).	27
<b>Figure 11:</b> Trois concepts d'utilisation de biofilms électroactifs en système bioélectrochimique (BES)	28
<b>Figure 12:</b> Représentation schématique d'une réaction anodique	29
<b>Figure 13 :</b> Représentation schématique d'une PCM	30
<b>Figure 14:</b> Différentes géométries de CEMs :	33
<b>Figure 15:</b> Schema représentant la fermentation sombre en batch	37
<b>Figure 16 :</b> Schema représentatif du couplage fermentation sombre-électrolyse microbienne pour la production du biohydrogène.	39
<b>Figure 17:</b> Préparation de la suspension bactérienne de <i>Thiobacillus denitrificans</i>	44
<b>Figure 18:</b> Schéma représentatif du protocole d'assemblage du biocomposite bactérien.	45
<b>Figure 19:</b> Microscope électronique à balayage, JSM-IT 500 HR.	46
<b>Figure 20:</b> Photo de la cellule électrochimique expérimentale fabriquée au laboratoire utilisée avec le Bukypaper comme une électrode de travail.	47
<b>Figure 21:</b> Photo de la cellule électrochimique conventionnelle.	48
<b>Figure 22:</b> L'électrode de travail « Bukypaper » en CNT et la fibre de carbone à droite de la photo.	49
<b>Figure 23:</b> L'électrode de travail : feutre de carbone.	49
<b>Figure 24:</b> Contre électrode faite de grille d'acier inoxydable d'une surface de 3,5cm <sup>2</sup> .	50
<b>Figure 25:</b> Montage de la cellule électrochimique expérimentale.	51
<b>Figure 26:</b> La cellule électrochimique conventionnelle à double parois.	52
<b>Figure 27:</b> Electrolyseur microbien à une seule chambre sous flux continu d'azote.	59
<b>Figure 28 :</b> Electrolyseur microbien à une seule chambre sous boîte à gants.	60
<b>Figure 29 :</b> Micrographie au MEB de l'assemblage protamine et les MWCNT.	62
<b>Figure 30:</b> Micrographies du biocomposite en carbone feutré.	64
<b>Figure 31:</b> Micrographies électroniques à balayage du feutre graphite modifié	65
<b>Figure 32:</b> (A) Distribution globale dans un volume déterminé par DLS	66
<b>Figure 33:</b> Images SEM du composite	67
<b>Figure 34:</b> Profil des vitesses de balayage (scan rate) appliqué sur biocomposite	69
<b>Figure 35:</b> Chronoamperométrie de <i>T. denitrificans</i> , <i>S. oneidensis</i> , <i>E. coli</i> et <i>P. fluorescens</i> .	71
<b>Figure 36:</b> Screening électrochimique des espèces bactériennes.	73
<b>Figure 37:</b> Evolution du signal cathodique du composite	74

<b>Figure 40:</b> Réponse voltampérométrique cyclique	78
<b>Figure 41:</b> Réponse de la Chronoamperométrie appliquée sur un biocomposite	79
<b>Figure 42:</b> Effet de la concentration de MR1 dans le biocomposite sur la densité du courant	80
IV.4 La courbe de calibration	80
<b>Figure 43:</b> Courbe de calibration de la détection du $\text{NO}_3^-$ par le composite de <i>Shewanella oneidensis</i> MR1.	82
<b>Figure 44 :</b> Courbe de calibration de la détection de $\text{NO}_3^-$ par le composite <i>T. denitrificans</i> .	82
<b>Figure 45:</b> Graphiques de Nyquist pour le composite	84
<b>Figure 46 :</b> Début de l'acquisition des données de l'électrolyseur microbien pilote 500mL.	85

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1 :</b> Illustration de certaines espèces bactériennes en fonction du donneur et l'accepteur et de la densité du courant enregistré.	32
<b>Tableau 2 :</b> Les déchets générés par les différentes activités industrielles.....	34
<b>Tableau 3 :</b> Composition chimique des milieux de culture.	42
<b>Tableau 4 :</b> Les caractéristiques physicochimiques des boues saumâtres de Ouargla, définies par le laboratoire	58

## Sommaire

Liste des abréviations	7
Liste des figures	8
Liste des tableaux	10
Sommaire	11
Chapitre I	6
L'État de L'Art	6
I. Electrolyse Microbienne	7
I.1. Définition	7
I.2. Concept de la biopile et de l'électrolyseur microbien	8
I.3. Les biofilms	9
I.3.1. Formation des biofilms	10
I.3.1.1. Attachement réversible des bactéries	11
I.3.1.2. Adhésion irréversible et production d'EPS	12
I.3.1.3. Formation des micro-colonies	12
I.3.1.4. Maturation du biofilm et mise en place d'une structure tridimensionnelle	12
I.3.1.5. Détachement du biofilm	13
I.3.2. Biofilms électroactifs	13
I.4. Mécanismes de transferts extracellulaires d'électrons (EET) dans les biofilms	14
I.4.1. Le transfert d'électron chez les micro-organismes électroactifs	17
I.4.1.1. Le Transfert d'électron chez <i>S. oneidensis</i>	17
I.4.1.2. EET par interaction directe chez <i>Geobacter sulfurreducens</i>	19
I.4.1.3. Le EET chez <i>Thiobacillus denitrificans</i>	22
I.4.2. Transferts d'électrons à travers des appendices conducteurs et les navettes	24
I.4.2.1. Les nanowires	24
I.4.2.2. Transferts d'électrons médiés par des navettes autoproduites	26
I.5. Les transferts extracellulaires indirects d'électrons	27
I.5.1. Le EET chez <i>Escherichia coli</i>	27
I.6. Mécanismes de transfert d'électrons entre les micro-organismes électro actifs et la surface d'électrode	29
I.6.1. Oxydation à l'anode d'un produit du métabolisme bactérien	29
I.6.2. Transfert via des protéines membranaires	30
I.7. Bioremédiation	31
I.8. Architecture des cellules électrochimiques microbiennes CEM	33

II- la production du Biohydrogène à partir des déchets de l'industrie agroalimentaire	34
II.1. Déchets organiques des industries agroalimentaires	34
II-2. Production du biohydrogène, H <sub>2</sub> par couplage : fermentation sombre et l'électrolyse bactérienne	38
Chapitre II	40
Matériels et Méthodes	40
Elaboration d'un protocole pour former un bio composite mimant les biofilms électroactifs.	41
1. Espèces chimiques et biologiques	41
1.1. Souches bactériennes	41
1.2. Milieux de cultures	41
1.3. Produits chimiques	42
2. Préparation du matériel bactérien	43
I.3. Etude structurale du biocomposite par microscopie électronique à balayage MEB	46
1.4. Mécanismes d'assemblage des constituants du biocomposite	46
I.5. Etude de Configuration des cellules électrochimiques et L'Electrode de Travail	47
I.5.1. Choix de la cellule et des électrodes	47
II. Etude du transfert extracellulaire directe des électrons à la cathode sous l'effet de l'âge de la bactérie et de la température.	53
II.1. La bio électro catalyse à la cathode	53
II.1.1. Chronoampérométrie	53
II.1.2. La voltammétrie cyclique (CV)	53
II.1.3. L'électroscopie d'impédance	54
II.2. Screening micro-électrochimique	54
II.3. Influence des facteurs de l'âge et la température sur la réponse cathodique	55
II.3.1. Effet de l'âge de la bactérie	55
II.3.2. Effet de température	55
II.4. Utilisation de la Protamine dans le transfert d'électrons dans les biocomposites électroactifs	55
III. Réduction bio-électrochimique des nitrates et des nitrites chez <i>Shewanella oneidensis</i> et <i>Thiobacillus denitrificans</i>	56
III.1. Effet de la concentration du nitrate sur la densité du courant	56
III.2. Effet de la concentration bactérienne sur la densité du courant	56
III.3. Calibration	57
IV. Production du Biohydrogène	57
IV.1. Conception de l'électrolyseur microbien à l'échelle laboratoire	57

IV.1.1. Electrolyseur à une seule chambre de 500 ml	58
Chapitre III	61
Résultats et Discussions	61
I. Mécanismes d'assemblage des constituants du biocomposite	62
II. Le screening micro-électrochimique	68
II.1. Effet de la vitesse de balayage sur la détection du signal catalytique : le scan rate	68
II.2. Chronoampérométrie	69
II.3. Voltammétrie cyclique	71
III. Influence des facteurs âge et température sur la réponse cathodique	73
III.1. Influences de l'âge de la bactérie sur la réponse cathodique	73
III.2. Influence de la température sur la réponse cathodique	75
IV.1. Effet de la concentration du substrat nitrate sur la densité du courant avec <i>Thiobacillus denitrificans</i>	76
IV.2. Effet de la concentration du substrat nitrate et nitrite sur la densité du courant avec <i>Shewanella oneidensis MR1</i>	78
IV.3. Effet de la concentration bactérienne sur la densité du courant	79
IV.4. Courbe de calibration de la détection du NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> par le composite de <i>Shewanella oneidensis MR1</i> et <i>T. denitrificans</i>	82
IV.5. Mesures par spectroscopie d'impédance électrochimique	83
V. L'électrolyseur pilote 500mL et production du Biohydrogène.	84
Conclusion	86
Perspectives	88
Références bibliographiques	89
Références	90

# **Introduction**

### Introduction

Le devenir de la planète est compromis par l'activité entropique croissante. La consommation drastique des ressources naturelles comme l'eau et les énergies fossiles représente une grande menace pour le climat et l'environnement. En effet, le secteur énergétique mondial passera par un mix varié de ressources énergétiques qui permettront de pallier non seulement à une demande en énergie croissante mais aussi à la préservation des stocks disponibles en énergies fossiles, de l'environnement et du climat.

Il est devenu indispensable de privilégier des solutions durables et renouvelables afin de préserver au mieux l'environnement, la pérennité des espèces et la disponibilité de l'eau pour les générations futures. La production d'énergie dite « propre » et l'assainissement du milieu naturel présentent des enjeux majeurs tant environnementaux que socio-économiques.

Parmi les filiales durables, nous citons la filiale bioénergétique et la bioremédiation qui sont potentiellement utilisables étant donné qu'elles permettent la réduction des émissions de gaz à effet de serre et la dépollution des milieux naturels comme les cours d'eau et les sols. Les combustibles fossiles sont remplacés par les biogaz comme le méthane ou l'hydrogène. Ce dernier est particulièrement intéressant en raison de son abondance dans la nature et sa combustion ne génère que de la vapeur d'eau sans rejet de gaz à effet de serre.

La bioremédiation est l'une des techniques les plus prometteuses dans la lutte contre la pollution provoquée par l'industrie et l'agriculture intensive. Les polluants les plus répandus dans l'environnement issus de cette activité, sont le nitrate, nitrite et phosphate comptent parmi

Actuellement, les procédés électrochimiques suscitent un grand intérêt car ils permettent la production d'énergie sous forme d'électricité ou/et de gaz d'hydrogène, ainsi que la dépollution des milieux chargés en polluants organiques ou minéraux. Ces derniers étant issus de la biomasse naturellement existante des déchets organiques de l'industrie agroalimentaire ou des traitements chimiques appliqués dans l'agriculture ; finissent dans les cours d'eaux. La technologie déployée dans ces traitements est de type MFC qui permet le traitement des milieux pollués par le biais de microorganismes électroactifs dotés d'une capacité de transfert extracellulaire d'électrons. Ces microorganismes proviennent soit des gisements de biomasse brute, ou des boues et sédiments salins.

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

L'objectif de la présente étude est de réaliser un état de l'art détaillé des filières en cours de développement pour la conversion des polluants en énergie propre et leur élimination du milieu naturel et d'évaluer leur potentiel d'émergence.

A la croisée entre l'électrochimie et les bioprocédés, les travaux menés dans le cadre de la présente thèse portent sur la conception d'une cellule d'électrolyse microbienne. Ce procédé permet l'oxydation des molécules organiques issues de la biomasse (acide lactique, glucose, galactose...) au niveau de l'anode, et cela dans le cadre du couplage des deux procédés, les microorganismes en fermentation et en électrolyse microbienne pourraient être affectés par certaines conditions opératoires imposées par chacun des systèmes (fermentation et MEC). Les paramètres abiotiques pouvant affecter le biofilm électroactif. Nous avons aussi réalisé la réduction des polluants comme le nitrate, le nitrite et le fumarate et bien d'autres molécules polluantes à la cathode (W. Fu, et al, **2021**). La formation de dihydrogène par réduction du sous-produit à la cathode est escomptée dans les deux processus. L'oxydation et la réduction des molécules organiques à l'anode et à la cathode sont rendues possibles par l'utilisation d'une électrode où les échanges de matières et d'électrons par l'intermédiaire d'un biofilm électroactif recouvrent la surface de l'électrode, appelée ainsi « la Bioanode » et « la Biocathode ». Notre mémoire est structuré en cinq chapitres.

Le chapitre I décrit dans l'état d'art qui comporte toutes les définitions et les procédés développés dans le domaine des biomatériaux et de la bioélectrochimie.

Dans le chapitre II sont décrits le matériel et les méthodes analytiques portant la conception d'une bio électrode capable d'oxyder et de réduire efficacement les polluants par les bactéries et en particulier *Shewanella oneidensis* et *Thiobacillus denitrificans*, ainsi que la compréhension des mécanismes électrochimiques mis en jeu via l'application de la voltammétrie cyclique, chronoampérométrie et spectrométrie d'impédance électrochimique sur bio-électrode.

Les résultats sont rapportés dans le chapitre III et qui ont fait l'objet de deux publications internationales dans des revues spécialisées de haut niveau : la première est intitulée « Electrochemical Investigation of *Thiobacillus Denitrificans* in a Bacterial Composite» B Abada, S Boumerfeg, A Haddad, M Etienne. Journal of The Electrochemical Society 167 (13) », 135502, impact factor 4.172; et la seconde «Electrochemical Process to Remove Nitrate and Nitrite by Means of a Biocomposite Synthesized with *Shewanella oneidensis* and Used as Bacterial Sensor». Biotechnology Advanced, impact factor 10.75.

Cela nous a permis d'élaborer un dispositif en patch ainsi que la conception et la mise en marche des premiers essais d'une cellule d'électrolyse microbienne à l'échelle de laboratoire. Le prototype a été conçu et mis en conditions opératoires choisies sur la base des études menées dans les volets II. III et IV.

L'objectif de cette partie est d'évaluer le potentiel de la cellule d'électrolyse microbienne conçue pour une exploitation à plus grande échelle, qui devrait s'accompagner de l'évaluation des paramètres importants pour le design d'un pilote préindustriel. Ceci pour la production du biohydrogène.

# **Chapitre I**

## **L'État de L'Art**

## I. Electrolyse Microbienne

### I.1. Définition

L'électrolyse microbienne est un procédé qui permet à des bactéries « branchées » à l'anode de dégrader la matière organique pour produire de l'hydrogène à la cathode grâce à une activation électrique, connue aussi sous le nom de Bioélectrochimie, est une science qui a vu un intérêt la fin des années 1970. Un ensemble de scientifiques chercheurs anglosaxons ont commencé des travaux d'électrochimie avec un support vivant d'où le nom de bioélectrochimie. Pour un chimiste, le terme « bioélectrochimie » sous-entend une sous-discipline de l'électrochimie et de son application à l'objet biologique. Cette approche est l'une des définitions donnée par les sociétés savantes comme la BES (BioElectrochemical Society) qui est fondée en 1979, se décrit comme une association scientifique internationale visant à promouvoir, (Potter et al, 1911) « the understanding and cooperation among scientists interested in the *application of electrochemical concepts and techniques to the fundamental or applied study of living systems* ». Dans la même direction, en 1998, Maurice Comtat, l'un des fondateurs de l'équivalent français de la BES, le GFB (Groupe Français de Bioélectrochimie) donne une définition décrivant la bioélectrochimie comme « la discipline dont l'objet est l'application des concepts, théories et méthodes de l'électrochimie à l'étude des molécules biologiques ou de leurs modèles et des systèmes biologiques organisés. (Potter et al., 1911). Afin de mieux percevoir ce que le terme de bioélectrochimie implique, il est donc nécessaire de restuer brièvement l'électrochimie.

## I.2. Concept de la biopile et de l'électrolyseur microbien

Les phénomènes électrochimiques sont étudiés à partir de deux configurations expérimentales « limites ». La première est celle qui correspond à l'association de deux compartiments contenant chacun une électrode et un couple oxydant/réducteur. La fermeture du circuit conduit à la circulation d'un courant résultant des réactions spontanées (oxydation ou réduction) ayant lieu dans chaque compartiment. C'est la configuration bien connue de type « pile » qui consiste à transformer l'énergie chimique d'une réaction d'oxydoréduction en énergie électrique : en empêchant le contact entre les protagonistes, ceux-ci échangent les électrons indirectement par le circuit extérieur. On remarquera que l'expérimentateur est « passif » dans cette configuration : il n'influe en rien sur le système qu'il laisse naturellement évoluer.

### I.3. Les biofilms

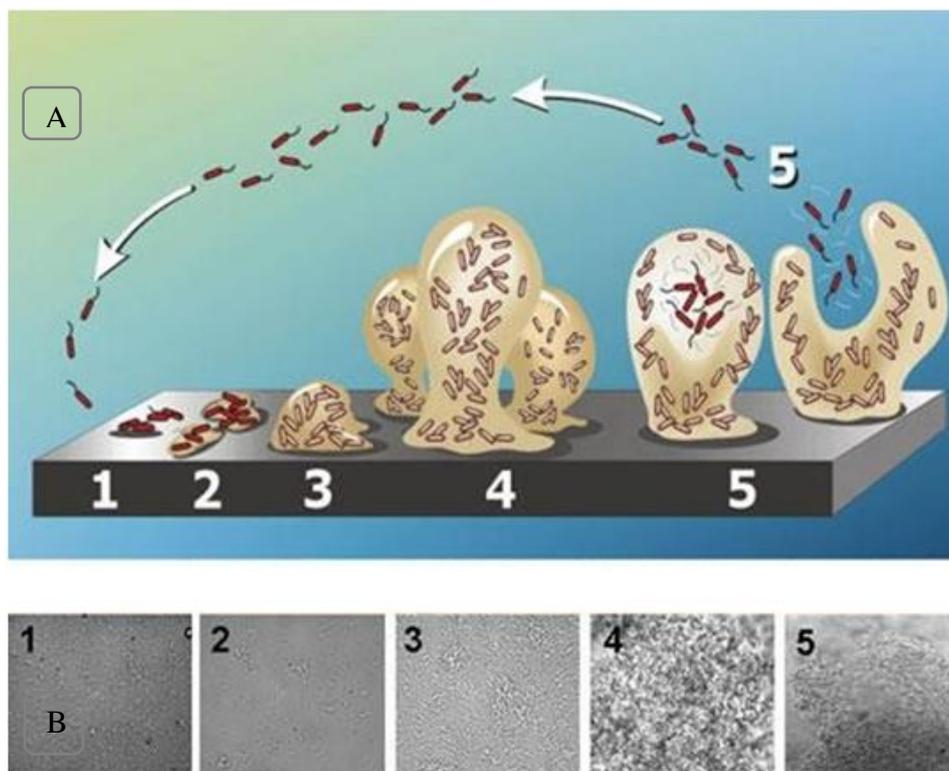
Le biofilm est une communauté de microorganismes (bactéries, champignons, algues, protozoaires, etc.) fixée à des surfaces ou interfaces, sous la forme d'agrégats cellulaires et englobé dans la sécrétion d'une matrice adhésive et protectrice. Cette dernière est un complexe de substances polymériques extracellulaires appelées classiquement EPS. Elles sont composées essentiellement de polysaccharides macromoléculaires, protéines et lipides, ainsi que des acides nucléiques. (Bond et al, 2002). Les biofilms procurent aux micro-organismes certain nombre d'avantages. Ils les protègent principalement des perturbations extérieures et leur assurent une résistance aux antimicrobiens et aux stress environnementaux. C'est cette conformation qui prodigue aux bactéries une certaine ubiquité et une prédominance dans le monde microbien. (Schröder et al, 2011).

Les communautés microbiennes attachées à des surfaces ont été observées bien avant d'être étudiées en détail. En 1684, Anthony Van Leeuwenhoek remarque une importante accumulation de micro-organismes sur sa propre plaque dentaire. Ce n'est qu'en 1943 que Zobell décrit, dans la première étude publiée sur les biofilms, les caractéristiques fondamentales de colonies attachées à un support. (Gorby et al., 2006). En 1978, Costerton propose la théorie des biofilms sur la base de l'observation de l'ultrastructure de la plaque dentaire et de communautés microbiennes sessiles dans les torrents de montagne. Plus tard il fut précisé que 99% des bactéries se développaient en biofilms sur des surfaces très variées telles que les métaux, les plastiques, les tissus humains et végétaux, les surfaces minérales telles que les pierres et le béton. Les types de biofilms sont aussi variés que les microbes qui les constituent. Par exemple, les biofilms formés sur des pierres submergées dans un drainage acide minier sont très différents de ceux qui se forment au contact de l'air à la surface des dents. Au cours de la formation des biofilms, les bactéries présentent des caractéristiques physiologiques différentes de celles présentées sous forme planctonique

(bactéries libres en suspension). Elles sont notamment capables de mettre en place un système de communication chimique, le « quorum sensing » (ou perception du quota), qui leur permet de coordonner leur comportement en fonction de leur nombre. (Reguera et al., 2005).

### **I.3.1. Formation des biofilms**

Les biofilms peuvent être constitués d'une ou plusieurs espèces de bactéries et se développer sur des interfaces solides ou liquides variées, que l'on rencontre par exemple dans l'environnement (fond de rivières, cailloux, racines, etc.) et dans les organismes vivants (tube digestifs, plaque dentaire, plaies). Au sein du biofilm naturel, chaque micro-organisme est soumis aux micro-conditions de son habitat. Les échanges entre bactéries, les migrations de populations et les facteurs externes affectent l'ordre et la structure de l'édifice. Ces derniers exercent une pression de sélection qui façonne l'architecture du biofilm et peut favoriser la formation d'une structure dense et résistante aux attaques externes. La formation d'un biofilm microbien mature sur une surface solide comporte plusieurs étapes (figure 1).



**Figure 1** : Schéma des étapes successives de la formation d'un biofilm sur une surface, microimages du biofilm

*A-(1) Attachement initial des cellules sur la surface, (2) Adhésion irréversible et production d'EPS, (3) Formation des micro-colonies, (4) Maturation du biofilm et mise en place de la structure tridimensionnelle du biofilm, (5) Détachement du biofilm (d'après Stoodley et al., 2002. B- Les photos (1-5) présentent les 5 étapes de la formation d'un biofilm de Pseudomonas aeruginosa sur une surface en verre. (d'après Stoodley et al. 2002)*

### **I.3.1.1. Attachement réversible des bactéries**

La formation du biofilm commence par l'adhésion sur la surface, des bactéries pionnières disséminées dans le milieu liquide. Ces micro-organismes proviennent le plus souvent, de l'érosion ou de la dissémination de biofilms voisins (figure 2). L'approche des bactéries vers la surface dépend des propriétés d'écoulement du fluide, des propriétés physico-chimiques de surface. (Kim, et al, 2002), ainsi que de déplacement des bactéries grâce à différents appendices bactériens tels que les flagelles et cils. (Malvankar et al, (2014). L'adhésion des bactéries à la surface se fait grâce à une force d'adhésion faible et réversible qui met en jeu des liaisons de Van Der Waals et des forces électrostatiques. A ce

stade, les bactéries peuvent parfois se détacher de la surface et revenir à l'état planctonique.



**Figure 2:** Différents biofilms *Biofilms*

(A) *Shewanella oneidensis* sur une surface en verre (Thormann et al. 2004) ; (B) *Pseudomonas aeruginosa* à l'interface air/liquide (Bartlett et al. 2011) et un floc de boue activée (C) (Weissbrodt et al. 2013)

### I.3.1.2. Adhésion irréversible et production d'EPS

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

### I.3.1.3. Formation des micro-colonies

Après leur adhésion irréversible à une surface, les bactéries se multiplient et forment des colonies qui recouvrent toute ou une partie de la surface du matériau. Certaines espèces qui sont incapables d'adhérer à la surface, peuvent également s'ancrer dans la matrice ou sur des bactéries déjà attachées.

### I.3.1.4. Maturation du biofilm et mise en place d'une structure tridimensionnelle

Une croissance exponentielle des bactéries conduit à un épaississement du biofilm jusqu'à la formation d'une structure tridimensionnelle hétérogène. (Pirbadian, et al, 2014) ; (Steidl et al., 2016). Les canaux qui se forment au sein de cette structure permettent la circulation des nutriments, de l'oxygène et le transport de produits issus du métabolisme

des micro-organismes qui composent le biofilm, (Yates et al., 2016). Lorsque le biofilm est mature, son épaisseur se stabilise et les phénomènes de son arrachement viennent compenser sa croissance.

### **I.3.1.5. Détachement du biofilm**

Le détachement des cellules bactériennes du biofilm est une étape essentielle du cycle de vie d'une espèce bactérienne. Il permet d'assurer son renouvellement cellulaire et la dispersion des microorganismes pour coloniser d'autres surfaces lorsque les conditions environnementales deviennent défavorables.

### **I.3.2. Biofilms électroactifs**

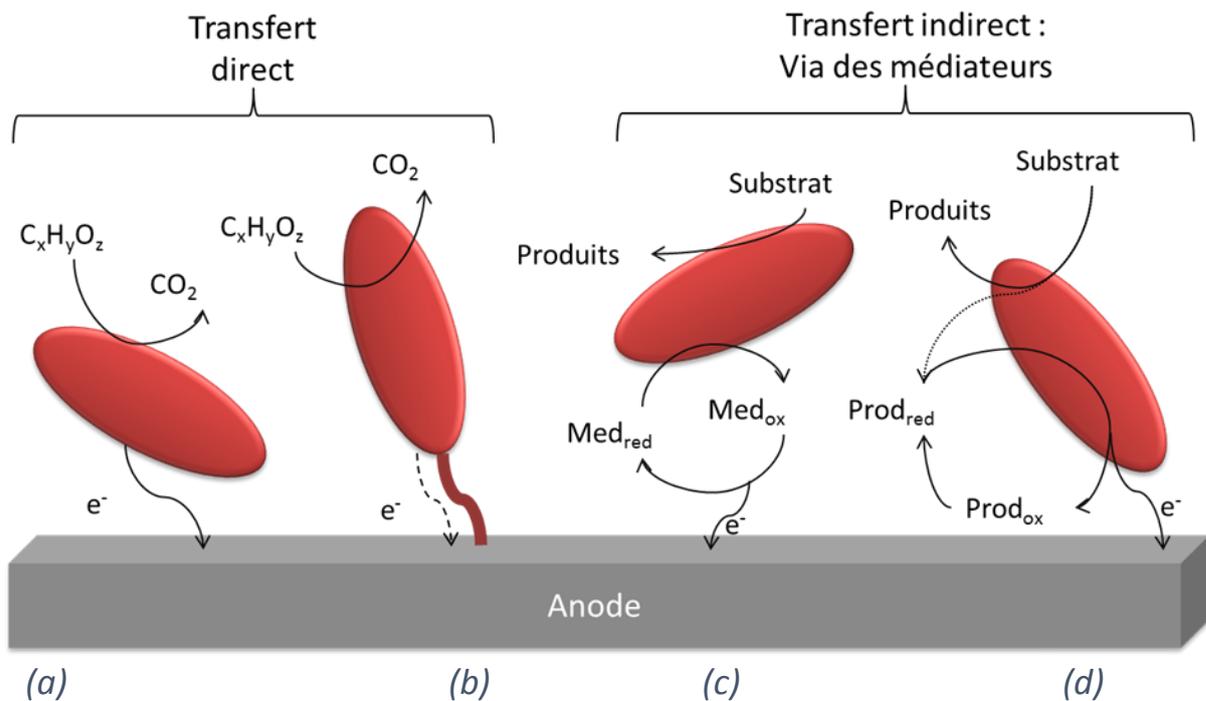
Les micro-organismes sont capables de convertir de la matière organique en électricité dans un système appelé pile à combustible microbienne (Lampa-Pastirk et al, 2016); (El-Naggaret al., 2010). Grâce à ce mode de transfert d'électrons d'une bactérie électroactive à l'électrode, des systèmes bioélectrochimiques moins coûteux, moins polluants et plus durables ont pu désormais être développés. L'électroactivité d'un biofilm est évaluée par la densité du courant et correspond au courant transféré à l'électrode par unité de surface de celle-ci.

Un biofilm électroactif est composé de bactéries capables de réaliser des réactions de transferts extracellulaires d'électrons (EET). Ces bactéries sont capables d'échanger des électrons entre elles, avec des navettes à électron présentes dans la matrice d'EPS, mais aussi avec des accepteurs ou des donneurs d'électrons solides comme les électrodes sur lesquelles un biofilm peut être attaché. Aujourd'hui, les principales applications des biofilms électroactifs sont les piles à combustibles microbiennes, l'électrocatalyse et l'électrosynthèse microbiennes. Par exemple, dans une pile à combustible microbienne, l'énergie est générée par le catabolisme de nutriments au cours duquel les électrons générés sont transférés de la bactérie à l'anode. (Yates et al., 2015); (Wang et al., 2015). A l'opposé, l'énergie est

consommée lors du transfert d'électrons de la cathode à la bactérie qui produit des composés énergétiques comme l'éthanol ou le dihydrogène. Il s'agit alors de systèmes d'électrosynthèse microbienne (Logan et al., 2012); ( Lovley et al., 2013). Par ailleurs, ces systèmes peuvent aussi aider à la bioremédiation de molécules azotées ou du sulfate avec les systèmes d'électrocatalyse microbienne. (Abrevaya et al, 2015); (Pfeffer et al., 2012). Dans tous les cas, les transferts d'électrons ont lieu de manière simultanée à l'électrode opposée du système électrochimique (l'anode ou la cathode) en impliquant une réaction biotique ou abiotique. La compréhension des mécanismes de transfert d'électrons et leur identification, sont donc essentielles pour améliorer l'efficacité de l'EET dans les biofilms électroactifs naturels ou artificiels. Dans les paragraphes qui vont suivre, nous allons tout d'abord détailler les mécanismes de transfert extracellulaire d'électrons identifiés chez les deux modèles bactériens les plus étudiés dans ce domaine de l'électromicrobiologie.

#### **I.4. Mécanismes de transferts extracellulaires d'électrons (EET) dans les biofilms**

L'échange d'électron entre les microorganismes et les surfaces d'électrodes se fait aux limites des membranes cellulaires bactériennes. C'est-à-dire que la bactérie cède ou accepte un électron des minéraux solides pouvant être utilisés comme donneurs ou accepteurs d'électrons dans l'environnement, par le biais d'une machinerie enzymatique logée dans la membrane cellulaire. Cette opération nécessite dans la majorité des cas, l'intervention d'un médiateur qui assure le transfert de l'électron entre les deux limites (figure 3). Ceci est appelé transfert indirecte extracellulaire d'électron. Ces médiateurs sont généralement des colorants et des espèces chimiques toxiques, et les bactéries les plus utilisées sont *E. coli* et *Pseudomonas*. Cependant, il est essentiel de signaler que le mode indirect est aussi présent dans la nature, mais il est assuré par un des médiateurs excrétés par la bactérie elle-même ou bien des molécules naturelles présentes dans le biofilm.



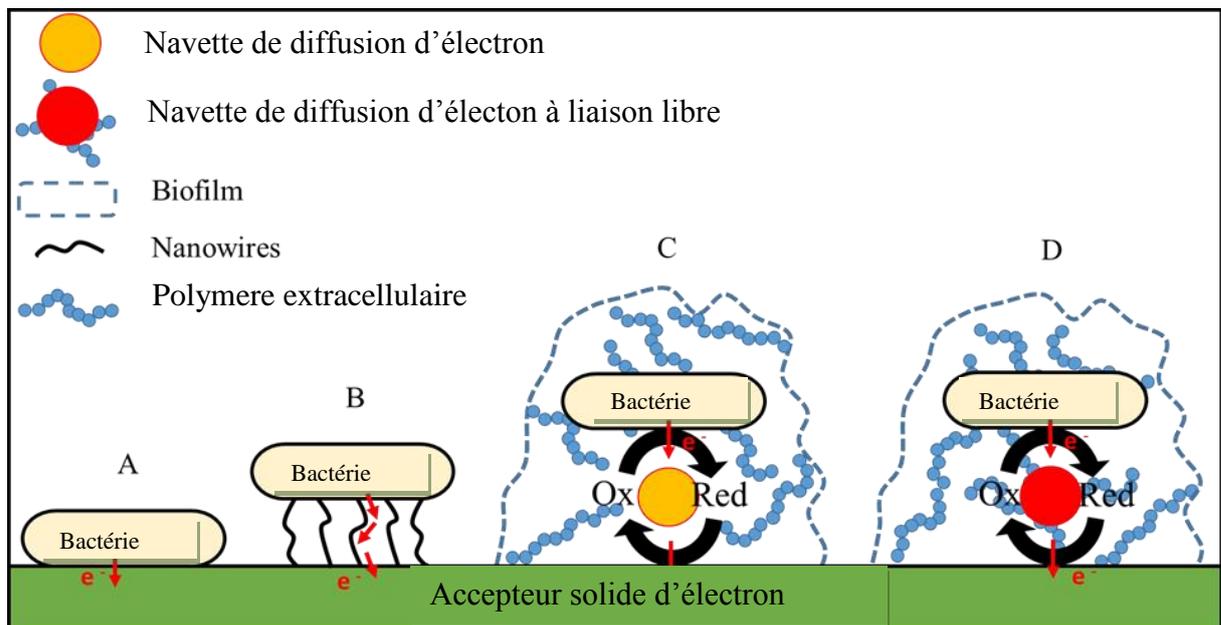
**Figure 3: Mécanismes de transfert d'électrons aux électrodes.**

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

D'autres espèces plus rares sont capables d'effectuer un transfert par une voie directe entre donneur ou accepteur d'électrons et les protéines membranaires, sans faire appel à une molécule intermédiaire ou par des formes cytologiques propres à certaines espèces.

*Shewanella* et *Geobacter* sont deux genres bactériens connus pour être électroactifs et en particulier les espèces *Shewanella oneidensis* et *Geobacter sulfurreducens* qui ont été intensivement étudiées comme modèle dans ce domaine. Ces deux espèces sont des bactéries Gram négatives appartenant respectivement à la sous-division (ou classe) des

gamma-protéobactéries et delta-protéobactéries. Au cours de leur évolution, ces bactéries électroactives ont développé plusieurs mécanismes pour transférer les électrons à un substrat solide extracellulaire. Ces mécanismes sont généralement classés soit en tant que EET direct ou indirect. Dans le cas de l'EET direct, les transferts d'électrons sont permis soit par interaction directe (Figure 4A). (Malvankar et al., 2014), soit à travers des appendices conducteurs appelés nanowires (Figure 4B). (Rosenbaum et al., 2014). Il est intéressant de noter que les bactéries sont ainsi capables par contact direct entre elles de transférer les électrons sur plusieurs millimètres dans la nature. (Krieg et al., 2014). En ce qui concerne l'EET indirect, les transferts d'électrons sont assurés par des navettes à électrons autoproduites ou non par la bactérie, en diffusion libre dans le biofilm (Figure 4C) ou faiblement liées aux EPS (Figure 4D). (Wu et al., 2015). Les médiateurs peuvent être des cytochromes excrétés par la bactérie ou des minéraux conducteurs présents dans l'environnement.



**Figure 4:** Mécanisme de transferts extracellulaires d'électrons dans les biofilms électroactifs (A) *Transfert direct entre la surface de la cellule et l'électrode*, (B) *transfert direct avec l'électrode à travers des appendices conducteurs et les nanowires*, (C) *transfert indirect à travers des navettes à électrons diffusant dans le biofilm* et (D) *transfert indirect à travers des navettes à électrons faiblement liées aux EPS*. (Wu et al., 2015).

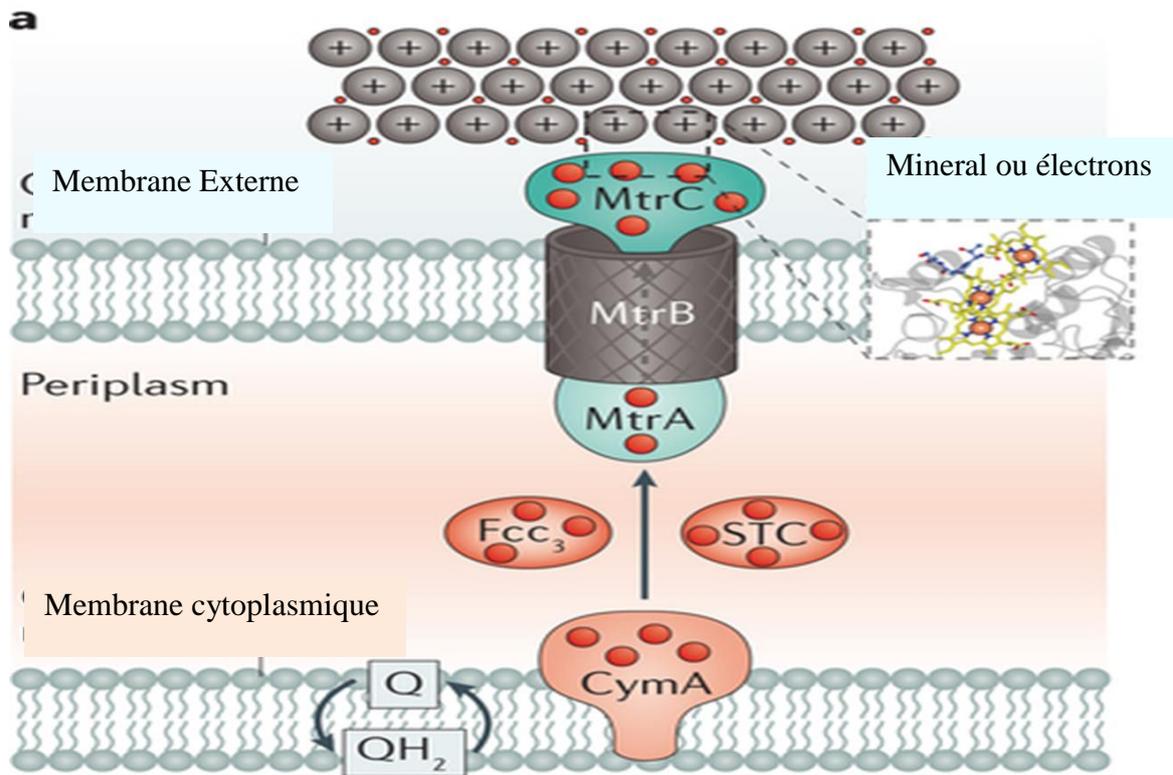
## I.4.1. Le transfert d'électron chez les micro-organismes électroactifs

### I.4.1.1. Le Transfert d'électron chez *S. oneidensis*

L'espèce bactérienne la plus étudiée est *Shewanella oneidensis* connue sous le nom de **MR1**. Cette protéobactérie a été isolée pour la première fois à partir du lac Oneida dans l'état de New York en 1988, d'où son nom. Il s'agit d'une bactérie anaérobie facultative capable de réduire aussi bien les ions et métaux lourds toxiques, que l'oxygène. Elle a également la capacité de réduire le manganèse, qui est une de ces caractéristiques. *Shewanella oneidensis* est particulièrement étudiée comme un microorganisme qui effectue une réduction dissimulatrice des métaux lourds avec un métabolisme anaérobie dans les milieux contaminés par le fer, le plomb et l'uranium. Des travaux de recherches laissent penser qu'elle pourrait réduire les ions de mercure  $\text{Hg}^{\text{II}}$  en mercure élémentaire  $\text{Hg}^0$  et les ions d'argent  $\text{Ag}^{\text{I}}$  en argent élémentaire<sup>3</sup>  $\text{Ag}^0$ . Elle est aussi connue pour la réduction des chromates ( $\text{CrO}_4^{2-}$ ). La respiration cellulaire de ces bactéries ne se limite cependant pas aux métaux lourds et peut également utiliser des sulfates ( $\text{SO}_4^{2-}$ ), des nitrates et nitrites ( $\text{NO}_3^-$  et  $\text{NO}_2^-$ ). Ce que nous allons démontrer dans les travaux de cette thèse.

De nombreuses études menées sur l'architecture et la composition moléculaire de la membrane cellulaire de *S. oneidensis*, permettant le transfert des électrons, ont révélé l'existence de quatre types majeurs de cytochromes. Ces derniers ont été identifiés comme participant à la voie *Mtr* « Métal réductase », enzyme réductrice de métaux (figure5) et conduisant à la réduction des métaux dans la nature. CymA, un cytochrome de type *c* à 4 hèmes de 21 kDa, est ancré dans la membrane interne et est caractérisé électrochimiquement par une gamme de potentiel comprise entre -350 mV et 0 vs SHE. (Peng et al., 2010). Lors d'une réaction de transfert d'électrons de la bactérie vers l'anode, CymA capte les électrons des ménaquinones et les transfère à MtrA, qui est un autre cytochrome de type *c* à 10 hèmes de 32 kDa avec une échelle de potentielle comprise entre -400 mV et -100 vs SHE. (Picot et al., 2011). Le MtrA se loge dans l'espace périplasmique et partiellement

dans la membrane externe. Ce qui a amené certains auteurs à proposer que CymA et MtrA n'interagissent pas directement et que deux cytochromes périplasmiques FccA et STC entrent dans le processus, avec des fonctions redondantes, servant ainsi comme intermédiaires dans les transferts d'électrons entre CymA et MtrA. (Patil et al., 2012); (Luckarift et al., 2010). Néanmoins, leurs implications restent toujours sujettes à débat à l'heure actuelle. MtrA, une fois réduit par CymA, un complexe va se former c'est le MtrABC avec MtrC et l'aide de MtrB, ce qui représente une porine de la membrane externe. MtrA est ainsi capable de transférer les électrons à MtrC et OmcA, deux cytochromes de type *c* à 10 hèmes localisés sur la face extracellulaire de la membrane externe. Les échelles de potentiel d'OmcA et MtrC sont respectivement de -400 mV à +100 et de -320 mV à -20 mV *vs* SHE. (Ghach et al., 2013). OmcA et MtrC interagissent ensemble et vont être capables de transférer les électrons à l'accepteur final dans le milieu extracellulaire. (Yong et al, 2014). Cependant, OmcA n'est pas nécessaire à la réalisation des transferts d'électrons vers l'accepteur final d'électrons. (Jiang et al, 2014). Ce cheminement des électrons à travers la membrane de *S. oneidensis* est proposé comme réversible. (Chen et al, 2015). Peut donc à la fois fonctionner à l'anode (où la bactérie transmet des électrons) comme à la cathode (où la bactérie reçoit des électrons).



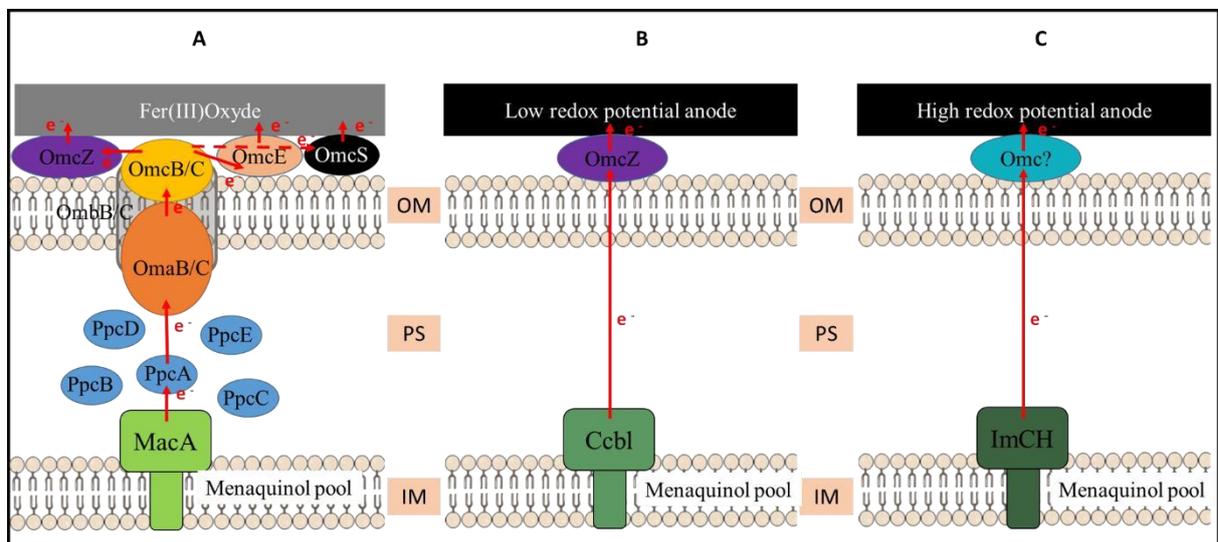
**Figure 5:** Voies des Mtr de *Shewanella oneidensis* MR-1.

OM: membrane externe, IM: membrane interne (ou membrane cytoplasmique), PS: espace périplasmique. (Chen et al, 2014).

#### I.4.1.2. EET par interaction directe chez *Geobacter sulfurreducens*

*G. sulfurreducens* possède des cytochromes ayant un rôle dans l'EET et qui sont différents de ceux chez *S. oneidensis*. Ils interagissent par voie directe mais les mécanismes moléculaires impliqués sont à ce jour, encore en cours d'investigation. L'étude accomplie sur une souche mutée pour les cytochromes OmcS, OmcE, OmcZ ou OmcB qui sont localisés sur la membrane externe. Ils sont probablement impliqués dans l'EET chez le *G. sulfurreducens* et avec l'anode. Cependant, ce mutant ne montre qu'une perte partielle de sa capacité à réaliser des transferts d'électrons (Willner et al., 1995). Ce qui permet de suggérer qu'il existe une grande diversité de cytochromes analogues avec une redondance d'effets dans le transfert d'électrons chez *G. sulfurreducens*. Il a été proposé un modèle pour l'EET par contact direct chez *G. sulfurreducens* et qui est décrit par rapport à sa capacité à réduire les oxydes de fer. Dans ce modèle, il est considéré que le cytochrome de type *c* MacA

localisé sur la membrane interne de la bactérie interagit avec les ménaquinones. (Dronov et al., 2008), et transfère ensuite les électrons aux cytochromes de la famille des PpcA/B/C/D/E localisés dans le périplasma. (Scotti et al., 2015). Cet ensemble de cytochromes interagirait alors avec le complexe formé par le cytochrome périplasmique OmaB/C, les porines putatives de la membrane externe OmbB/C et les cytochromes OmcB/C de la membrane externe. (Kang et al, 2008). Les OmcB/C ne seraient pas les derniers donneurs d'électrons à l'accepteur solide extracellulaire ; ils transfèreraient ces électrons à d'autres cytochromes comme OmcE, OmcZ de la membrane externe. (Deng et al. , 2009), ou encore comme le cytochrome OmcS qui est associé aux *nanowires*. (Okada et al, 2012), avant de les céder au solide considéré comme accepteur final (Figure 6A).



**Figure 6:** Mécanismes de transferts extracellulaires d'électrons par contact direct chez *Geobacter sulfurreducens* PCA.

(A) Le cytochrome de la membrane interne MacA échange des électrons avec les ménaquinones et les cytochromes périplasmique de la famille des Ppc. (B) Le cytochrome de la membrane interne CbcL transfère les électrons des ménaquinones aux protéines redox périplasmiques, en C le un cytochrome nommé ImcH. (Okada et al., 2012).

Ce mécanisme illustré par la figure 6A, décrivant la capacité de *G. sulfurreducens* à réduire les oxydes de fer, est controversé. En effet, OmcE ne participe pas aux réactions de transfert d'électrons à l'anode et quand OmcS est muté, les transferts d'électrons ne sont que peu impactés. (Patila et al., 2013). En conséquence, ce modèle n'est pas applicable dans des réactions de transfert d'électrons avec une électrode et dans les systèmes artificiels. Un

second modèle, qui reste incomplet, a été proposé récemment comme une alternative dans lequel les acteurs impliqués dans l'EET par transfert direct dépendraient du potentiel redox de l'électrode. A faible potentiel redox (Figure 6B). En dessous de -100 mV vs SHE, CbcL, un cytochrome localisé sur la membrane interne, recevrait les électrons des ménaquinones. (Dague et al., 2006).

Si les acteurs au niveau périplasmique ne sont pas encore déterminés, le cytochrome OmcZ est montré comme le donneur terminal d'électrons au niveau de la membrane externe. (Bishop et al, 2009). OmcB ne serait pas impliqué dans ce modèle de transfert d'électrons et sa mutation n'affecte pas la capacité de la bactérie à transférer les électrons. (Narayan, 2005). A haut potentiel redox, au-dessus de -100 mV vs. SHE (Figure 6), un cytochrome nommé ImcH, localisé sur la membrane interne, recevrait les électrons des ménaquinones. (Manna et al, 2005). Quant aux autres acteurs impliqués au niveau membranaire dans les transferts d'électrons dans cette configuration, aucune autre donnée n'est disponible actuellement (Figure 6C). (Shvedova et al, 2005).

Il est important de noter que les voies de transfert d'électrons exposées précédemment pour *Geobacter* ne s'appliquent qu'en réaction anodique et ne sont pas confirmées à la cathode. Contrairement à *S. oneidensis* dont la voie de transfert d'électrons est décrite comme réversible dans la littérature. Les acteurs des transferts extracellulaires directs d'électrons à la cathode et à l'anode, sont significativement différents chez *Geobacter*. Ceci a été démontré, chez le mutant *knock-out*<sup>1</sup> pour les gènes codant les cytochromes impliqués dans l'EET à l'anode, et reste toujours capable de réaliser l'EET avec la cathode. (Xu et al., 2016). Actuellement, le seul cytochrome proposé comme acteur de l'EET à la cathode chez *G. sulfurreducens* est le cytochrome PccH. (Xu et al., 2016). Cependant, une étude récente chez une autre espèce de *Geobacter* a montré qu'elle est capable de réaliser des transferts d'électrons avec la cathode alors qu'elle ne possède aucun gène homologue codant pour la

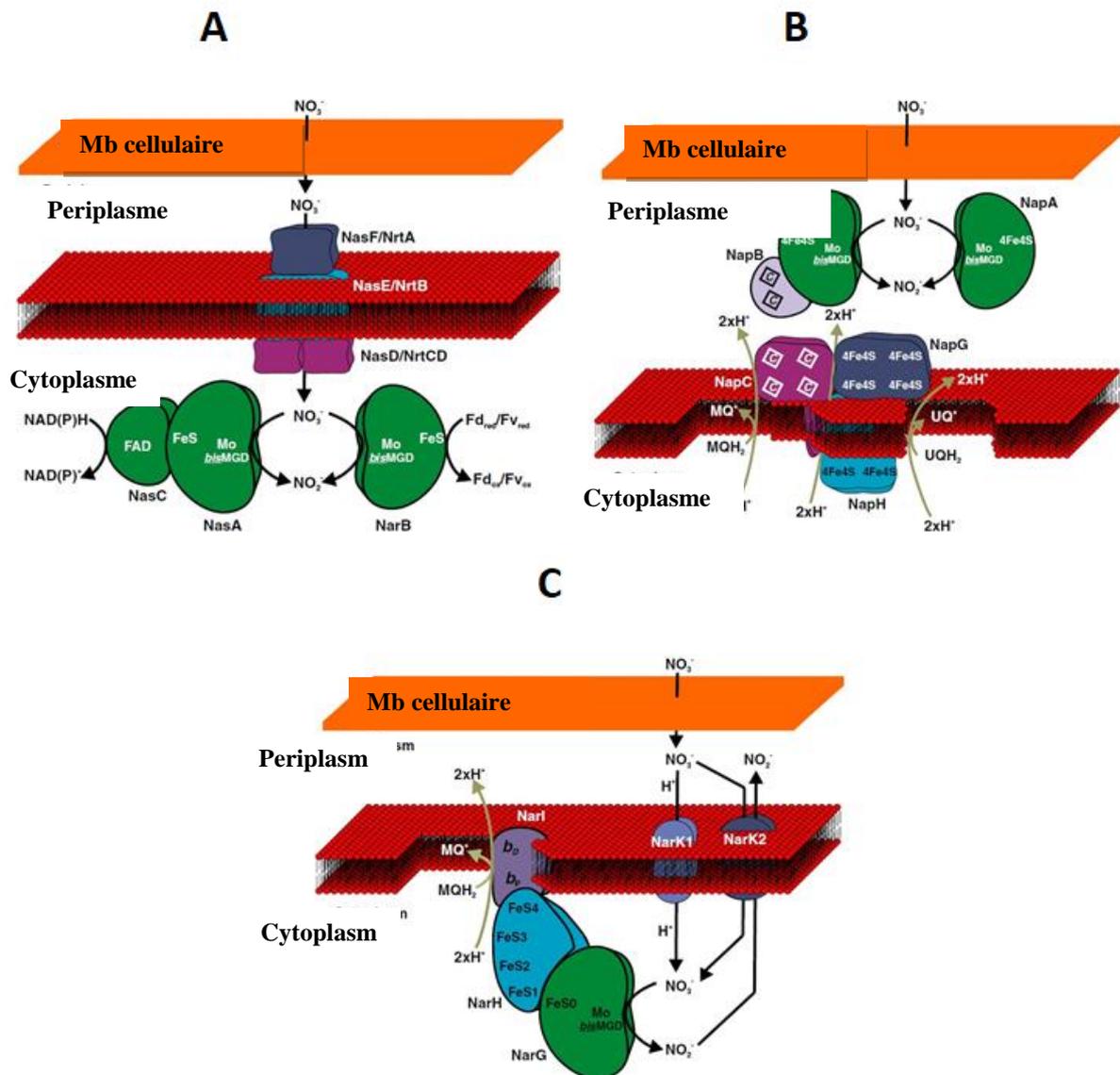
---

protéine PccH. (Gregory et al., 2004). Il y a consensus pour dire qu'il existe une grande variété de cytochromes analogues présents chez *Geobacterspp.* et impliqués dans l'EET à l'anode comme à la cathode.

#### **I.4.1.3. Le EET chez *Thiobacillus denitrificans***

*Thiobacillus denitrificans* est considéré comme l'un des premiers microorganismes non filamenteux et chimio-litho-autotrophe. Cette espèce bactérienne se développe sur des surfaces inorganiques et a un potentiel de dissolution des sulfures de fer. Le soufre est utilisé comme source d'énergie. (Pinck et al., 2017), et ces micro-organismes tirent leur énergie de la réduction de composés soufrés réduits dans des conditions anaérobies comme dans le cas des ferro-oxidants. Cependant, l'oxydation peut également se produire dans des conditions dénitrifiantes. Les bactéries se développent sur des substrats de soufre inorganique en utilisant composés d'azote différents ( $\text{NO}_3$ ,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{N}_2\text{O}$ ) comme oxydants respiratoires terminaux. (Zumft et al., 2008). Ils ont été étudiés dans les eaux souterraines, car ces milieux peuvent contenir du nitrate  $\text{NO}_3$  comme polluants. (Rinaldo et al., 2007); (Bishop et al., 2009); (Guengerich et al., 2005); (Abrevaya, 2011). Le processus de réduction microbienne conduit alors à la formation de sulfates. (Xing et al. 2010); (Eileen & all. 2017). Dans des conditions anaérobies, la présence de sulfure de fer comme le  $\text{FeS}$  ou la pyrite  $\text{FeS}_2$ , offre une alternative pour le  $\text{NO}_3$ . (Wang et al., 2019); (Peter et al., 2013); (Kracht et al., 1980). Ils peuvent être oxydés par le processus dépendant du nitrate (Fenchel et al., 2012). En outre, *T. denitrificans* peut également utiliser des composés inorganiques tels que les thiosulfates, dans des conditions aérobies. (Monachona et al., 2019), Cette espèce bactérienne se développe à un pH neutre compris entre 6,8 et 7,4 (Beatrix et al., 2019); (Siciliano, 2005), et à une température se situant entre 28 et 35°C, avec une température optimale de 30°C. La figure 7, décrit le mécanisme moléculaire de dénitrification chez les espèces

dénitrifiantes selon l'emplacement de la machinerie enzymatique et le mode d'utilisation des nitrates et nitrite, c'est-à-dire assimilatrice ou dissimilatrice. *T. denitrificans* correspond à la classe des dissimilatrices et donc en faveur du model B et C.



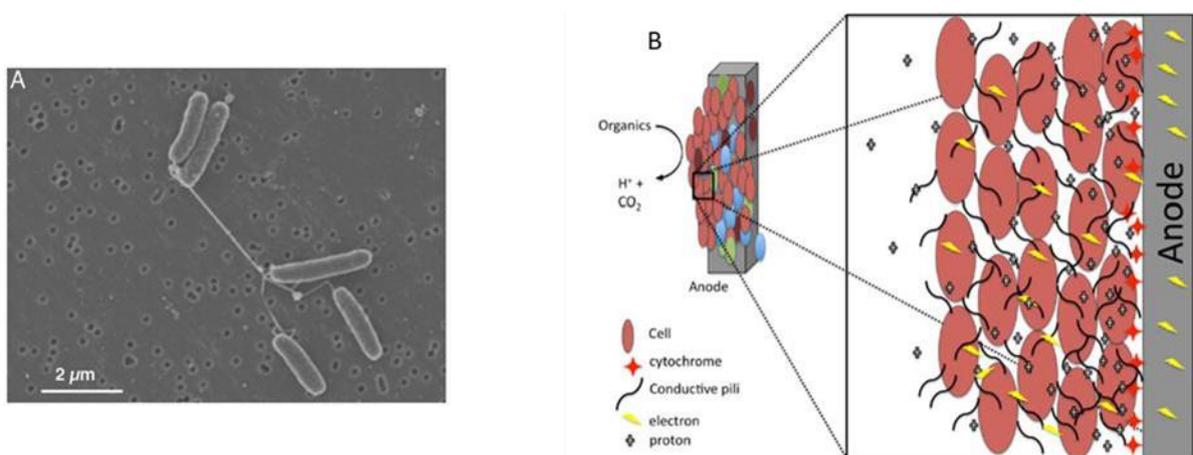
**Figure 7:** Représentation des différentes sous-unités de dénitrification

(A) la nitratre réductase assimilative, (B) la nitratre réductase périplasmique et (C) la nitratre réductase membranaire. Modifié de Gonzalez et al. (2006).

## I.4.2. Transferts d'électrons à travers des appendices conducteurs et les navettes

### I.4.2.1. Les nanowires

Les *nanowires* se sont des appendices bactériens conducteurs et ont été tous d'abord décrits chez deux bactéries différentes : *G. sulfurreducens*. (Zhao et al., 2019) et *S. oneidensis* (Harnisch et al., 2012). Les *nanowires* sont habituellement classés en tant que mécanisme direct d'EET. La nature de ces appendices conducteurs dépend du modèle bactérien où ils ont été observés.

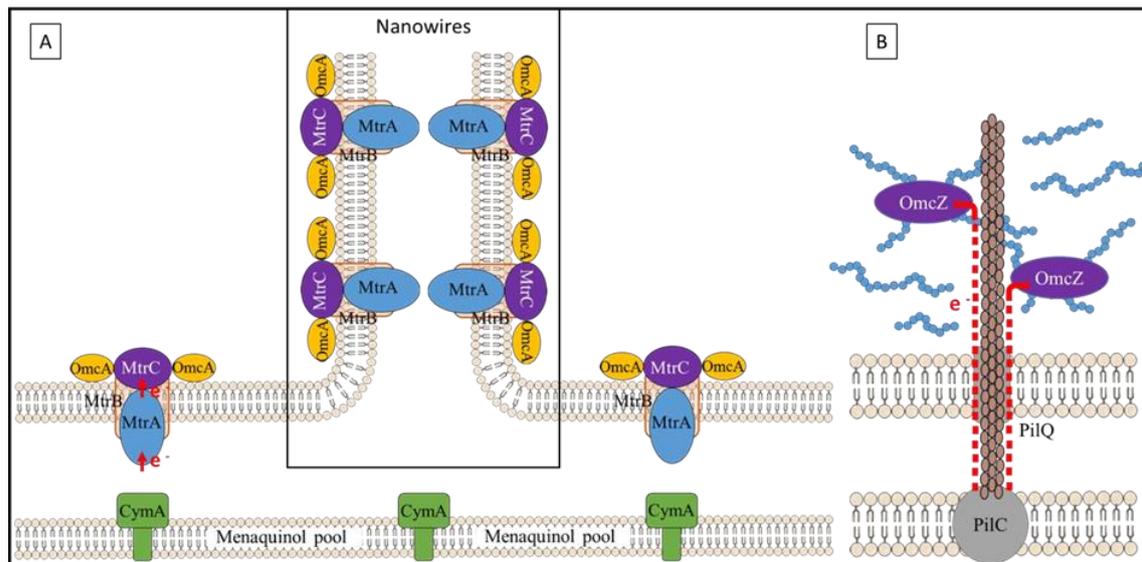


**Figure 8:** La connexion des cellules bactériennes

(A) Pili connectant des cellules bactériennes de *Shewanella oneidensis* entre elles (MEB) (Gorby et al., 2006); (B) Représentation schématique des transferts d'électrons chez *Geobacter sulfurreducens* (Franks & Nevin, 2010)

Chez *S. oneidensis*, les nanowires ont été caractérisés en immunofluorescence et sont décrits comme des extensions périplasmiques de la membrane externe (Figure 8A). (Gorby et al., 2006). Sur ces extensions membranaires, il est supposé que les cytochromes nécessaires aux transferts d'électrons soient présents, i.e. le complexe MtrABC avec OmcA. Ce modèle de nanowire est assez bien documenté, son analyse a été complétée par des techniques de biologie moléculaire. (Franks & Nevin, 2010). Chez *G. sulfurreducens*, un autre modèle de nanowire est décrit et impliquerait un pili de type IV conducteur. Sa conductivité serait de type métallique et résulterait d'interactions de type  $\pi$ - $\pi$  stacking entre les résidus des acides

aminés aromatiques constituant le pili (figure 8B). (Franks & Nevin, 2010). Ce modèle est controversé, car les mutants knock-out pour ces pilis qui ont été utilisés pour démontrer leur rôle dans l'EET, étaient aussi défectifs pour des cytochromes impliqués dans l'EET. De plus, le cytochrome membranaire OmcS a été trouvé associé à ces pilis conducteurs. (Shvedova, 2005). Néanmoins, une récente étude a montré que le transport d'électrons dans ces biofilms était thermiquement dépendant, ce qui concorde avec un transport d'électrons impliquant des cytochromes. (Xu *et al.*, 2016). D'autres nouvelles recherches ont montré que le cytochrome OmcS est localisé à la surface de la cellule et n'est pas associé aux nanowires et que le pili de *G. sulfurreducens* est effectivement conducteur (Zhao *et al.*, 2019). Le travail de Feliciano *et al.* ont démontré que la conductivité du pili est assurée par des interactions entre les chaînes latérales des acides aminés constituant le pili, alors que la conductivité de type métallique précédemment citée est seulement transitoire et se trouve dans le biofilm. (Fricke *et al.*, 2008). Un modèle réconciliant ces analyses contradictoires a alors été proposé, où nous retrouvons le transport d'électrons impliquant des nanowires conducteurs en coopération avec les cytochromes présents sur les membranes externes bactériennes et piégés dans la matrice d'EPS. (Rosenbaum *et al.*, 2011). Ce qui permet des réactions de transfert d'électrons efficaces au sein des biofilms épais. Dans la figure 9, explique les deux modèles d'appendices conducteurs : (A) Extensions périplasmiques de la membrane externe chez *Shewanella oneidensis*. Le complexe formé par le cytochrome périplasmique MtrA avec la porine MtrB et les deux cytochromes de la membrane externe MtrC et OmcA est présent sur ces extensions ; (B) Pili de type IV conducteurs chez *Geobacter sulfurreducens*. Les électrons seraient transférés le long des chaînes latérales des acides aminés par saut d'électrons. Les électrons seraient ensuite transférés à des cytochromes faiblement liés aux EPS, comme OmcZ. (Doherty *et al.*, 1996).



**Figure 9:** Deux modèles d'appendices conducteurs

(A) Extensions périplasmiques de la membrane externe chez *Shewanella oneidensis*. (B) Pili de type IV conducteurs chez *Geobacter sulfurreducens*. (Doherty et al., 1996).

#### I.4.2.2. Transferts d'électrons médiés par des navettes autoproduites

Les propriétés redox les plus connues des EPS résulteraient des cytochromes de la membrane externe, secrétés dans le milieu extracellulaire. Dans le cas de *S. oneidensis*, les propriétés redox de la matrice d'EPS viennent en réalité des cytochromes de la membrane externe MtrC et OmcA excrétés par la cellule et piégés dans la matrice d'EPS, (Kato et al., 2012); (Bertrand et al., 2007). De manière semblable, des études génomiques montrent la présence du cytochrome OmcZ dans la matrice d'EPS des biofilms formés par *G. sulfurreducens* (Straub et al., 1996). Ces cytochromes excrétés sont considérés comme jouant le rôle de navettes à électrons dans les EPS et participant aux EET indirects dans le biofilm.

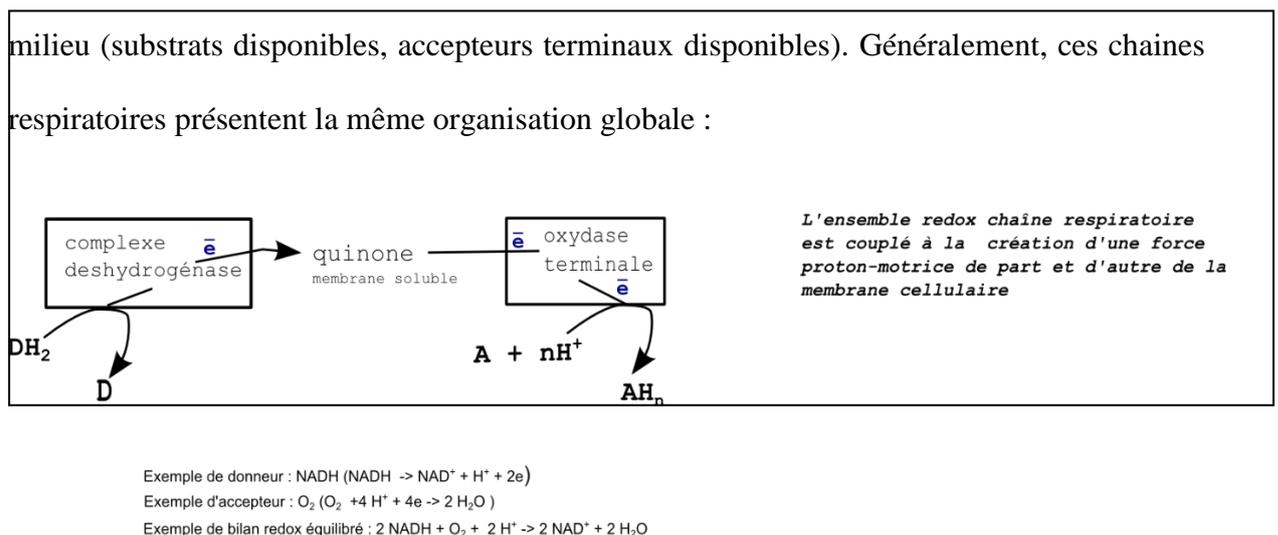
Les transferts extracellulaires d'électrons ont aussi été décrits comme fortement dépendant de la présence de médiateurs autoproduits par la bactérie chez *S. oneidensis*. Ces médiateurs seraient des dérivés des quinones : les flavines mononucléotides et les riboflavines, H. Omid, (213). Cependant, des études récentes ont démontré que les flavines et riboflavines étaient plutôt des cofacteurs associés aux cytochromes de la membrane externe MtrC et

OmcA, que des avettes à électrons, (Cole, 1978). Pour mieux comprendre le rôle de ces molécules et connaître leurs impacts sur l'EET, nous avons préféré supprimer ces facteurs de notre suspension bactérienne par un lavage intensive. Un comportement similaire est aussi observé chez *G. sulfurreducens*, (Goddard et al., 2008). Ces molécules auraient donc une faible activité en tant que navette à électrons et agiraient plus en tant que cofacteurs associés aux cytochromes bactériens sur la membrane externe, mais aussi avec ceux excrétés et faiblement liés aux EPS.

## I.5. Les transferts extracellulaires indirects d'électrons

### 1.5.1. Le EET chez *Escherichia coli*

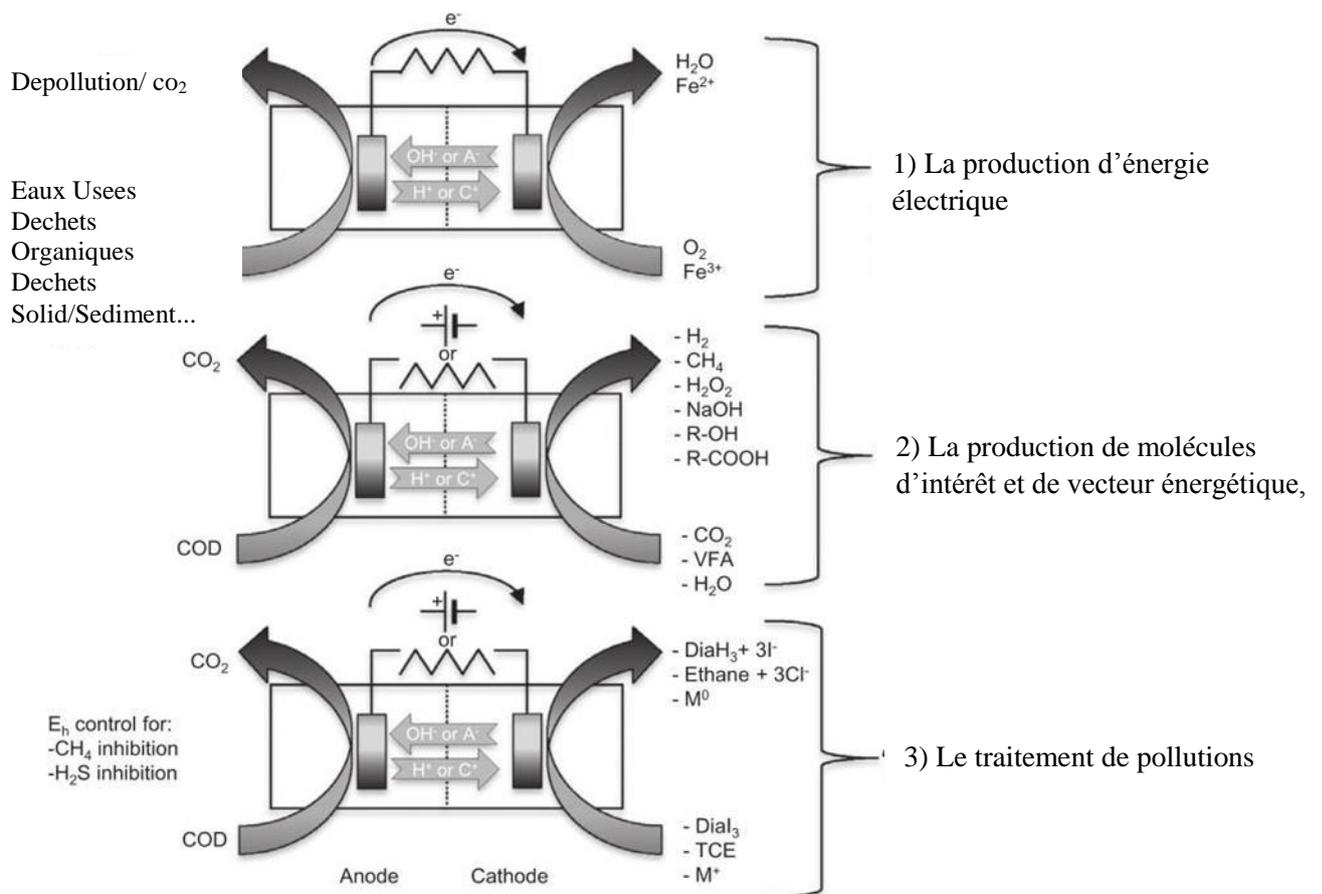
Chez *E. coli*, on trouve différentes chaînes respiratoires possibles qui ne sont pas présentes chez toutes les souches et leur induction ou répression dépend des conditions de milieu (substrats disponibles, accepteurs terminaux disponibles). Généralement, ces chaînes respiratoires présentent la même organisation globale :



**Figure 10:** Différentes chaînes respiratoires possibles chez *E coli* (Call &, Logan. 2007).

Dans le schéma ci-dessus,  $\text{DH}_2$  désigne le substrat donneur d'électron à un complexe membranaire deshydrogénase (par exemple les très classiques substrats NADH ou le succinate ...).  $\text{SH}_2$  donne 2 électrons et est ainsi oxydé en S (NAD<sup>+</sup> ou fumarate pour reprendre respectivement les 2 exemples de substrats cités juste avant...). A désigne l'accepteur terminal des électrons qui peut être le dioxygène ou  $\text{NO}_3^-$  ou encore le moins

conventionnel DMSO. *E. coli* est face à de nombreuses possibilités. Le schéma ci-dessous présente les principales possibilités.



**Figure 11:** Trois concepts d'utilisation de biofilms électroactifs en système bioélectrochimique (BES)

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

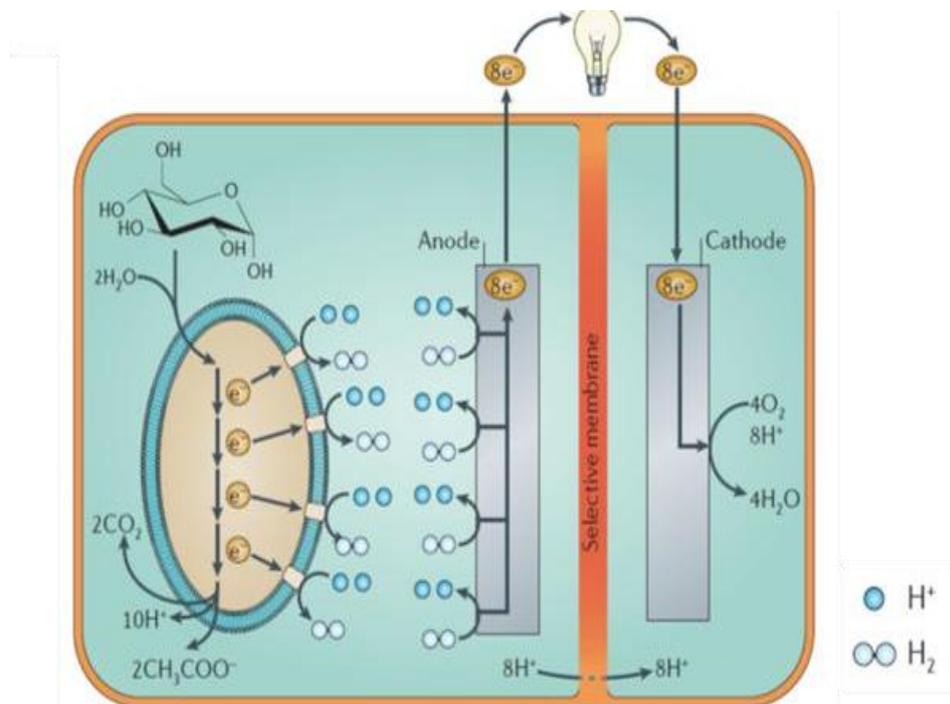
Pour le cas échéant, que nous étudions, la réduction des nitrates et du fumarate nous intéresse le plus. Donc nous sollicitons des conditions d'anaérobie. Cependant, *E. coli* possède une nitrate réductase Red NarA et Red NarZ qui sont de type membranaire, et possède aussi une Red Narp qui est périplasmique comme celle existante chez *S. oneidensis* et *T. denitrificans*, mais n'a pas les mêmes propriétés de transfert directe d'électrons que ces deux dernières. Cette différence réside dans l'absence du cytochrome c, existant chez les

bactéries électrochimiques. Cette caractéristique a été choisie pour élucider le EET chez *S. oneidensis* et *T. denitrificans*, (Call &, Logan. 2007).

## I.6. Mécanismes de transfert d'électrons entre les micro-organismes électro actifs et la surface d'électrode

### I.6.1. Oxydation à l'anode d'un produit du métabolisme bactérien

Lors de la formation d'un biofilm sur la surface d'une électrode, les bactéries excrètent des métabolites se retrouvant dans l'espace extra-cellulaire au contact de la surface de l'électrode. Les premières études mettaient en avant la production de courant par l'oxydation d'un produit du métabolisme microbien. En effet, certains microorganismes produisent des composés qui fournissent des électrons lorsqu'ils sont oxydés à l'anode. Ces composés sont des produits de fermentation tels que l'hydrogène comme le montre la Figure 12. A partir de là, la notion de bioanode a commencé à se faire connaître.

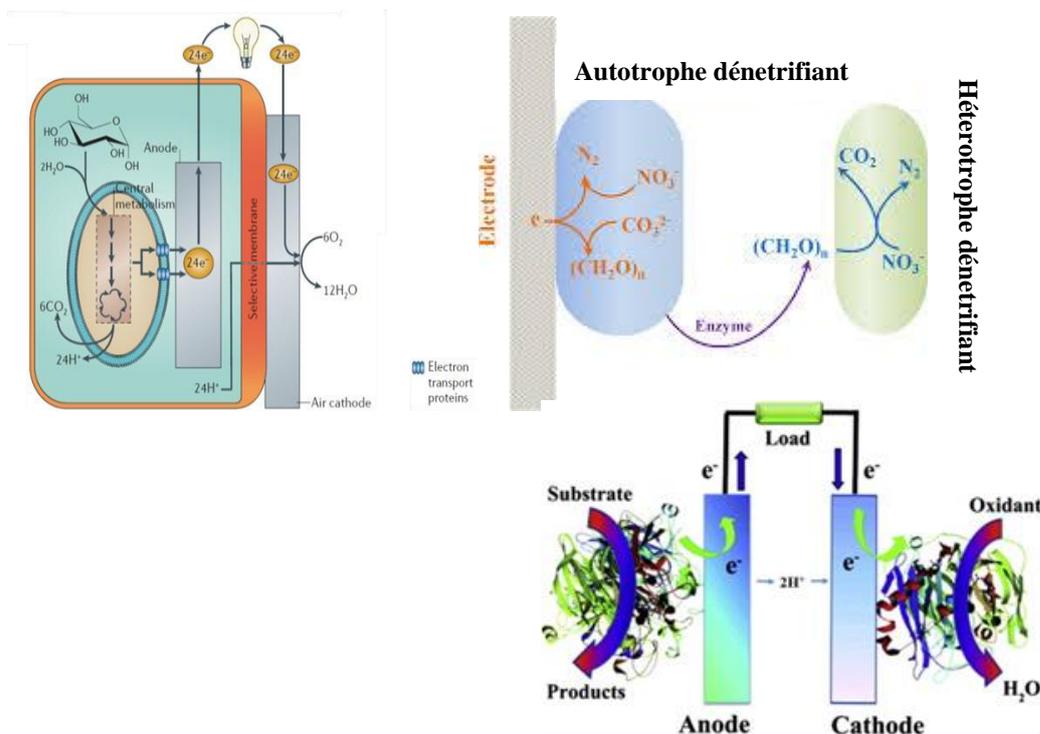


**Figure 12:** Représentation schématique d'une réaction anodique

Le transfert d'électron est réalisé par un produit du métabolisme cellulaire (ici, l'hydrogène) (Lovely et al., 2006).

### I.6.2. Transfert via des protéines membranaires

Dans les biofilms électroactifs, un autre cas de réaction d'échange d'électrons, s'effectue cette fois ci directement de la cellule à l'électrode via l'intermédiaire de certaines de ces protéines membranaires (Figure 13). Les protéines les plus souvent mises en cause lors des échanges électroniques, sont les cytochromes contenant des groupements constitués d'un noyau porphyrine comportant du fer. Les cytochromes font partie de la chaîne respiratoire bactérienne et il en existe plusieurs classes. Comme ça été cité précédemment, deux composants de la voie respiratoire Mtr, les cytochromes MtrC et les protéines OmcA, forment un complexe de protéines sur la membrane externe de *Shewanella oneidensis*. Celui-ci est impliqué dans la réduction directe des minerais, d'anodes et de flavines. (Lovley et al 2006).



**Figure 13 :** Représentation schématique d'une PCM

Dont le transfert d'électrons est directement assuré par une protéine membranaire. (Lovley et al 2006).

## I.7. Bioremédiation

Les eaux usées industrielles ou domestiques contiennent des composés azotés et parfois des éléments-traces métalliques (Choi et al., 2020). Les biocathodes peuvent être utilisées pour aider leur élimination. L'azote est éliminé habituellement par des procédés biologiques tels que la nitrification (oxydation de l'ammonium en nitrate) et la dénitrification (réduction du nitrate en N<sub>2</sub>) (Li et al., 2020). La dénitrification est réalisable par voie bio-électrochimique (Li, 2020). Le taux de réduction du nitrate en diazote gazeux était de 98 % avec un courant appliqué de 200 mA. La réaction ayant lieu à la cathode en feutre de graphite était :



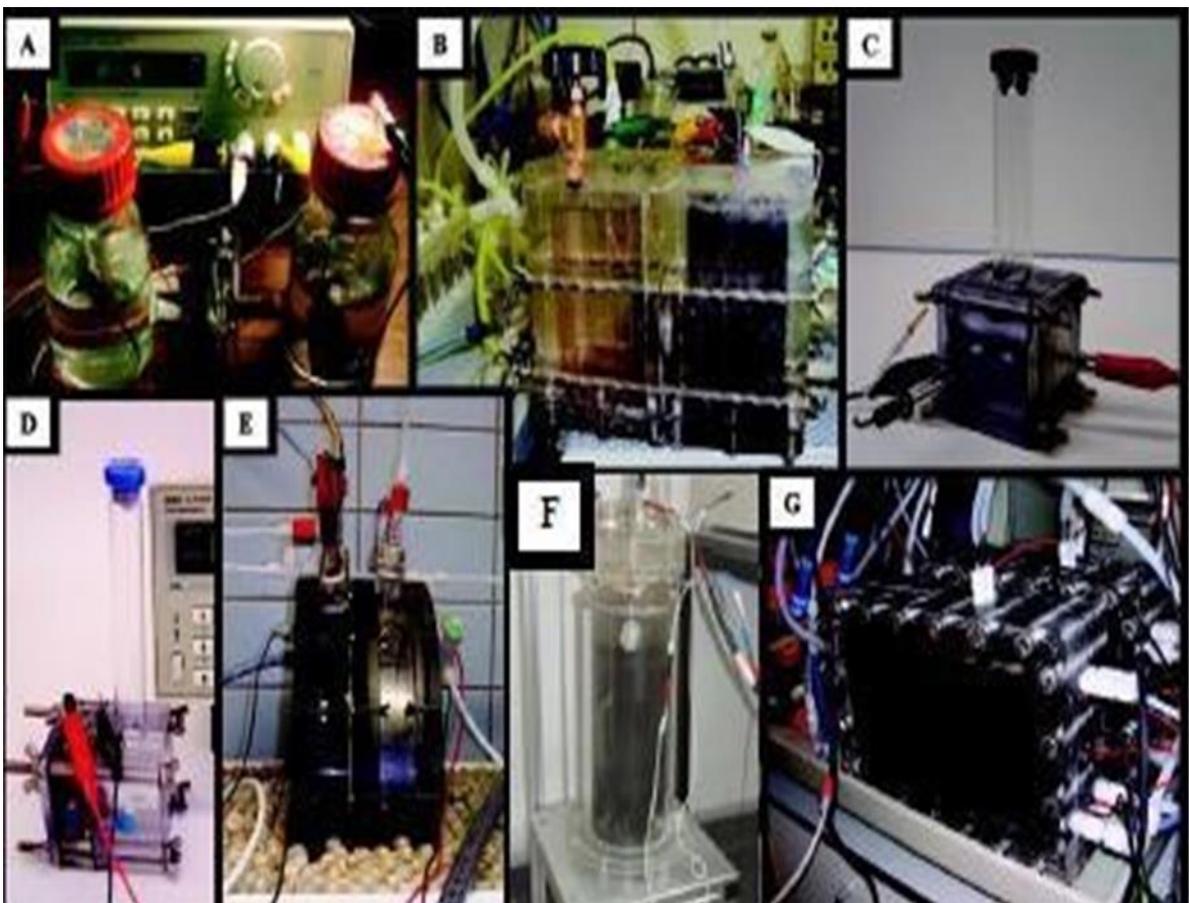
Ces biocathodes montrent une réduction efficace des nitrates tout en générant un courant électrique (Chen et al., 2021). Les éléments traces métalliques sous forme ionique que peuvent contenir les eaux usées, ne sont pas biodégradables. Ils peuvent toutefois être éliminés en servant d'accepteurs d'électrons. En effet, une fois réduits ces composés sont précipités et peuvent ainsi être éliminés. Il existe des bactéries capables de réduire le chromium (Cr-VI) plus efficacement qu'une cathode abiotique. (Katsounaros et al., 2021).

**Tableau 1** : Illustration de certaines espèces bactériennes en fonction du donneur et l'accepteur et de la densité du courant enregistré Langevelde et al., (2021).

Accepteur d'e <sup>-</sup>	Inoculum	Densité de courant (puissance) <sup>a</sup> et/ou potentiel imposé <sup>b</sup>	Références
O <sub>2</sub>	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	690 mA.m <sup>-2</sup>	Rabaey et al., 2008
	<i>Sphingobacterium multivorum</i>	300-650 mA.m <sup>-2</sup>	
	<i>Winogradskyella poriferorum</i>	1 mA.m <sup>-2</sup> ; + 0 V	Erable et al., 2010
	<i>Acinetobacter johsonii</i>	0,4 mA.m <sup>-2</sup> ; + 0 V	
	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	140 mA.m <sup>-2</sup> , - 0,20 V	Freguia et al., 2010
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	- 0,21 à + 0,05 V <sup>a,b</sup>	Cournet et al., 2010
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	- 0,21 à + 0,06 V <sup>a,b</sup>	
	<i>Brevundimonas diminuta</i>	- 0,09 à + 0,11 V <sup>a,b</sup>	
	<i>Burkholderiacepacia</i>	- 0,12 à + 0,10 V <sup>a,b</sup>	
	<i>Branhamellacatarrhalis</i>	- 0,20 à + 0,06 V <sup>a,b</sup>	
	<i>Enterobacter cloacae</i>	- 0,24 à + 0,05 V <sup>a,b</sup>	
	<i>Escherichia coli</i>	- 0,25 à + 0,03 V <sup>a,b</sup>	
	<i>Shigella flexneri</i>	- 0,27 à + 0,03 V <sup>a,b</sup>	
	<i>Acinetobacter sp.</i>	- 0,17 à + 0,08 V <sup>a,b</sup>	
	<i>Kingella kingae</i>	- 0,25 à + 0,02 V <sup>a,b</sup>	
	<i>Kingella denitrificans</i>	- 0,25 à + 0,03 V <sup>a,b</sup>	
	<i>Micrococcus luteus</i>	- 0,22 à + 0,05 V <sup>a,b</sup>	
	<i>Bacillus subtilis</i>	- 0,25 à + 0,06 V <sup>a,b</sup>	
	<i>Staphylococcus carnosus</i>	- 0,28 à + 0,02 V <sup>a,b</sup>	
	<i>Lactococcus lactis</i>	80 mA.m <sup>-2</sup> ; + 0 V	Présente étude
U(VI)	<i>Geobacter sulfurreducens</i>	- 0,3 V <sup>a</sup>	Gregory et Lovley, 2005
C <sub>2</sub> Cl <sub>4</sub>	<i>Geobacter lovleyi</i>	160 mA.m <sup>-2</sup> , - 0,5 V	Strycharz et al., 2008
Fumarate	<i>Geobacter sulfurreducens</i>	20,5 A.m <sup>-2</sup> , - 0,40 V	Dumas et al., 2008a
	<i>Geobacter lovleyi</i>	160 mA.m <sup>-2</sup> , - 0,30 V	Strycharz et al., 2008
CO <sub>2</sub>	<i>Methanobacterium palustre</i>	140 A.m <sup>-3</sup> , - 0,50 V	Cheng et al., 2009

## 1.8. Architecture des cellules électrochimiques microbiennes CEM

Il existe une panoplie de modèles architecturaux de cellules électrochimiques microbiennes (Figure 14). Selon le but escompté, les scientifiques ont mis au point de différentes formes et structures. Néanmoins, nous constatons deux modes fondamentaux liés à la nature des réactions métaboliques visées : les cellules à deux chambres et les cellules à une chambre. La forme est en fonction de l'étude hydrodynamique du milieu et ce que nous appelons le dimensionnement.



**Figure 14:** Différentes géométries de CEMs :

*A. Cellule en H, B.-D. Cellule cubique avec séparateur (B. et D.) et sans séparateur (C.), E. Cellule circulaire, F. Cylindrique, G. Parallélépipédique (Logan et al. 2008)*

## **II- la production du Biohydrogène à partir des déchets de l'industrie agroalimentaire**

Dans le contexte énergétique mondial actuel, une transition énergétique est obligatoire pour espérer atténuer la crise environnementale à venir. L'hydrogène, vecteur d'énergie décarbonée au rendement énergétique parmi les plus élevés, est considéré comme incontournable pour l'avenir dans la mesure où sa production sera la plus "propre" possible. La voie de production biologique d'H<sub>2</sub> (BioHydrogène ou BioH<sub>2</sub>) par fermentation obscure (sans lumière) à haute température et en milieu salé, représenterait une technologie génératrice d'énergie et pleinement respectueuse de l'environnement. De surcroît, ce type de bioprocédé cumulerait un triple avantage (IRD/ BIOTCH H<sub>2</sub>. 2021) :

- Produire de l'H<sub>2</sub>,
- Dégrader une pollution ou des résidus organiques non valorisés (déchets verts),
- Préserver l'eau douce en utilisant de l'eau de mer.

### **II.1. Déchets organiques des industries agroalimentaires**

Chaque année des quantités considérables des déchets organiques sont rejetées dans l'état par les industries agro-alimentaires. Ces déchets présentent un effet néfaste pour l'environnement, par contre ces derniers peuvent être valorisés et utiliser dans des différents domaines.

Les déchets organiques des Industries Agro-alimentaires (IAA) désignent l'ensemble des déchets générés par les industries agro-alimentaires de transformation et de conditionnement de produits alimentaires animaux ou végétaux Tableau 2.

Ils présentent une variabilité saisonnière marquée ainsi qu'une grande diversité : pulpes de betteraves, lactosérum, marcs de raisin, vinasses, déchets de légumes en conserverie, déchets de la viande, sang, os, les mélasses.. Ils comprennent :

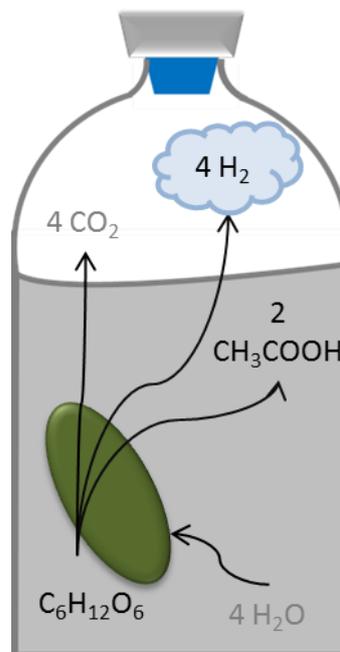
- Des produits animaux issus de la viande, du poisson et du lait
- Des produits végétaux issus de la transformation des fruits, légumes, céréales et oléagineux
- Des déchets de matières premières végétales ou animales,
- Des chutes de produits élaborés ou des produits déclassés (pâtes, fromages...)
- Des boues issues du traitement des effluents

Les déchets des industries agro-alimentaires sont dans leur grande majorité des déchets organiques. Cependant, les industries agro-alimentaires sont également génératrices de déchets d'emballages et de déchets minéraux comme les cendres et sous-produits de traitement à la chaux. (Damien et al., 2013).

*Tableau 2 : Les déchets générés par les différentes activités industrielles*

Activité	Type de déchet généré
<b>Industrie de la viande</b> abattage de bovins, ovins, caprins et porcins et filière charcuterie	Graisses, sang, os, abats, déchets de découpe, cuir, poils...
<b>Industrie du poisson</b>	Arêtes, peaux...
<b>Laiterie, fromagerie</b>	Lactosérum (principalement), eaux de lavage, boues
<b>Sucrierie, distillerie de betteraves</b>	Mélasses, pulpes humides, écumes, herbes et radicules, tares terreuses.
<b>Transformation des oléo protéagineux (céréales)</b>	Tourteaux, coques...
<b>Fruits et légumes</b>	Déchets de légumes en conserveries, fruits et légumes de retrait (déchets du circuit frais)  Le traitement des fruits et légumes génère essentiellement des effluents (eaux de process, de lavage...), des déchets végétaux (déchets de dégrillage, de parage et de découpe) ainsi que des déchets inertes (terres)
<b>Amidonneries, féculeries</b>	Eaux de féculerie, produits solides
<b>Boissons non alcoolisées (jus de fruit, eaux, sirops, boissons rafraîchissantes sans alcool)</b>	Boues, effluents

Notre étude s'est intéressée à la valorisation des déchets de l'industrie de transformation comme celle de la tomate et l'industrie laitière. Les déchets peuvent être valorisés par l'incorporation dans l'alimentation que ce soit humaine ou bien animale et aussi par la récupération des constituants intéressants sont : le lycopène, la cutine et l'huile des graines. Et pour la valorisation du lactosérum peut être effectué par la formulation des aliments à partir de celui-ci destinés soit pour l'homme ou l'animale, le lactosérum peut subir aussi des procédés physiques afin de récupérer : les fines, le gras, protéines, lactose ainsi que des procédés biotechnologiques qui permettent la conversion de lactose en composés intéressants tel que : biogaz, alcools et biomasse. Cette valorisation a pour but de limiter la pollution environnementale et maximiser les profits de ces déchets organiques. Figure 15.



**Figure 15:** Schema représentant la fermentation sombre en batch

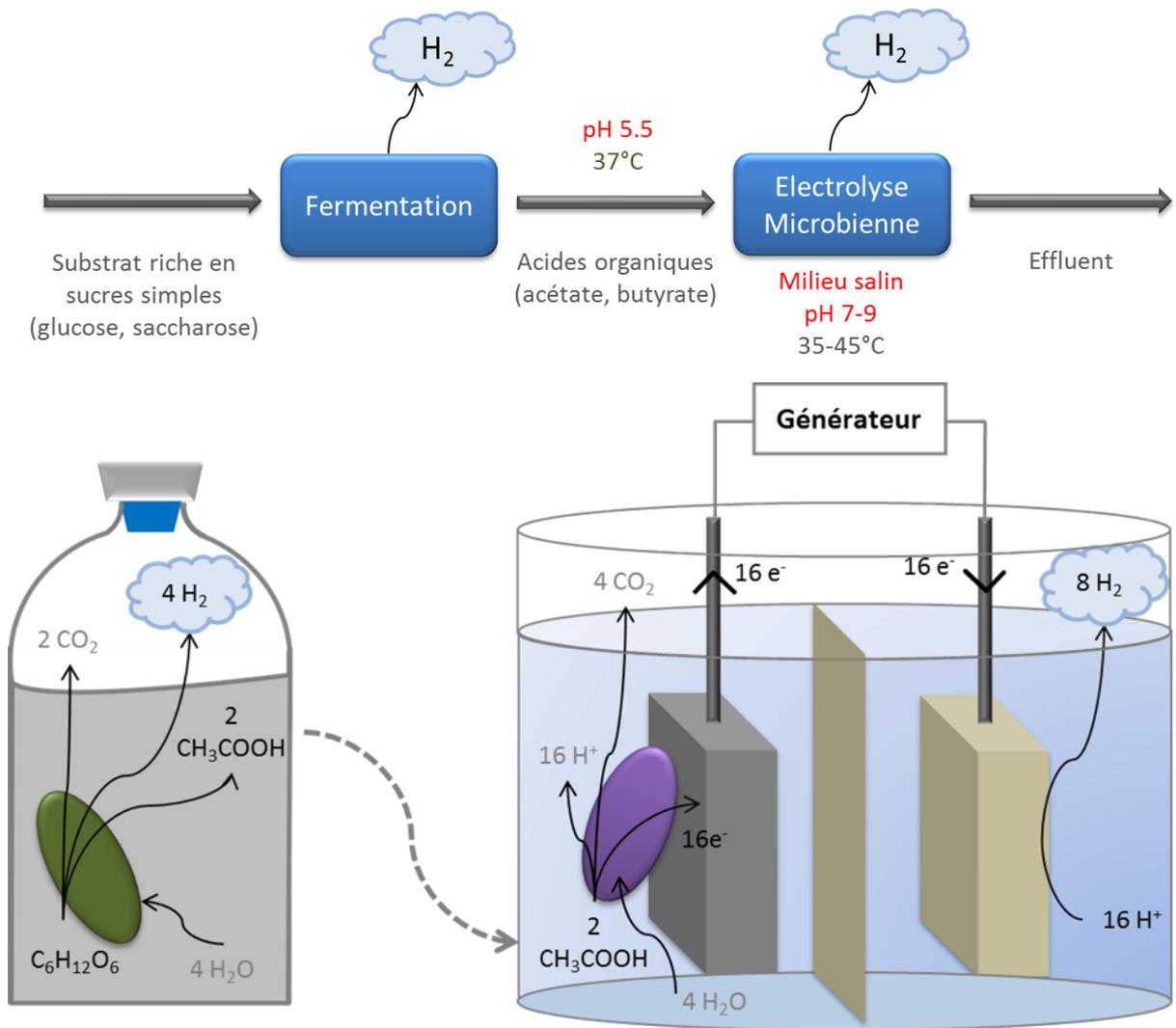
*Représentation schématique de la fermentation sombre en Batch. Le Cas de la fermentation du glucose par la voie acétate. (Pierra 2013).*

Ce type de conversion, présente un travail à objectif à long terme (sur 5-10 ans) puis de disposer d'un bioprocédé efficace – ayant un taux de recouvrement énergétique supérieur à 1

; TRE = quantité d'énergie produite/l'énergie dépensée – BeB (ISSBAT), et qui soit facile à mettre en œuvre pour produire des vecteurs énergétiques à partir de déchets agroalimentaires. Cependant, la filière BioH<sub>2</sub> ne peut être viable que si elle rentre dans un contexte économique rentable. Nous voyons bien ici qu'il est donc nécessaire d'optimiser chaque étape dans le but de proposer une valorisation/traitement de déchets agroalimentaires en vecteurs énergétiques (BioH<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, électricité) et bio-emballages. L'objectif final sera de rentabiliser économiquement le bioprocédé et d'obtenir un effluent compatible avec un rejet dans la nature.

## **II-2. Production du biohydrogène, H<sub>2</sub> par couplage : fermentation sombre et l'électrolyse bactérienne**

Dans le cadre du couplage des deux procédés, les microorganismes en fermentation et en électrolyse microbienne pourraient être affectés par certaines conditions opératoires imposées par chacun des systèmes (fermentation et MEC). Les paramètres abiotiques pouvant affecter le biofilm électroactif sont présentés dans la Figure 16. Notamment, la fermentation pour la production d'hydrogène est réalisée à pH bas environ 5.5, (Guo et al. 2010), alors que l'électrolyse microbienne est mise en œuvre à des pH plutôt neutres voir alcalins (7-9), (Patil et al. 2011). De plus, la fermentation co-produit des acides organiques avec la production d'hydrogène. La composition de l'effluent issu de la fermentation en acides peut donc avoir un impact sur la sélection microbienne et l'activité électroactive du biofilm (Kiely, Regan, et al. 2011). Ainsi, l'influence de certaines de ces conditions abiotiques sur les fonctions des consortia microbiens de la fermentation (production de biohydrogène) et du biofilm électroactif (électroactivité) sera étudiée.



**Figure 16 :** Schema représentatif du couplage fermentation sombre-électrolyse microbienne pour la production du biohydrogène.

Sur ce schéma, la conversion théorique maximale d'une molécule de glucose est présentée avec les conversions stœchiométriques maximales dans des deux procédés de fermentation (à gauche) et d'électrolyse microbienne en MEC (à droite). La fermentation est schématisée en ne considérant que la voie acétate. L'électrolyseur microbien est schématisé par une anode sur laquelle un biofilm microbien est symbolisé par une bactérie (à gauche) et une cathode (à droite) séparées par une membrane échangeuse d'ions. L'électrolyseur est alimenté par un générateur. La production d'hydrogène en fermentation (maximum  $4 \text{ mol}_{\text{H}_2} / \text{mol}_{\text{glucose}}$  avec  $2 \text{ mol}_{\text{acétate}} / \text{mol}_{\text{glucose}}$  par la voie acétate de production d'hydrogène) et en MEC (maximum  $4 \text{ mol}_{\text{H}_2} / \text{mol}_{\text{acétate}}$ ) permettrait de se rapprocher de la conversion complète du Glucose en hydrogène à  $12 \text{ mol}_{\text{H}_2} / \text{mol}_{\text{glucose}}$ . (Pierra, 2013).

# **Chapitre II**

## **Matériels et Méthodes**

## **Elaboration d'un protocole pour former un bio composite mimant les biofilms électroactifs.**

### **1. Espèces chimiques et biologiques**

#### **1.1. Souches bactériennes**

Les souches utilisées au cours de ces travaux sont *Shewanella oneidensis* MR-1, *Pseudomonas fluorescens* et *Escherichia coli*, ces trois souches appartiennent au groupe des protéobactéries.

*Shewanella oneidensis* MR-1 (ATCC 700550) est une souche anaérobie facultative, Gram négative, en forme de bacille.

*Pseudomonas fluorescens* (CIP 69.13) est une souche aérobie, gram négative, en forme de bacille et possèdent plusieurs flagelles. Ces souches proviennent de la collection américaine (ATCC, American Type Culture Collection) et de la française (CIP, Collection Institut Pasteur).

*Escherichia coli* CGE1 est une souche environnementale isolé d'un réseau d'eau et dans la collection du laboratoire (LCPME, Villers-les-Nancy, 54600). C'est une bactérie anaérobie facultative, Gram négative et en forme de bacille.

#### **1.2. Milieux de cultures**

Tous les milieux de cultures utilisés ont été stérilisés par la chaleur humide (traitement par autoclave à 121°C pendant 15 min). Le tableau 3 décrit leurs compositions, (Pink et al. 2017).

**Tableau 3** : Composition chimique des milieux de culture (Pink et al. 2017).

Trypticasesoybroth (TSB) (Sigma-Aldrich)	Le TSB contient 17 g/L de peptone de caséine, 3 g/L de peptone de soja, 5 g/L de chlorure de sodium, 2,5 g/ L d'hydrogène phosphate di potassium, 2,5 g/L de glucose pour 1 L d'eau déionisé (pH = 7,3 ± 0,2)
Tryticase soy agar (TSA) (Sigma-Aldrich)	Le TSA contient 15 g/L de peptone de caséine, 5 g/L de Peptone de soja, 5 g/L de chlorure de sodium, 15 g/ L d'agar pour 1 L d'eau déionisé (pH = 7,3 ± 0,2)
Lysogeny broth (LB) (Sigma-Aldrich)	Le LB contient 10 g/L de tryptone, 5 g/L d'extrait de levure et 5 g/ L de chlorure de sodium pour 1 L d'eau déionisé (pH = 7,0 ± 0,2)
Lysogenybroth with Agar (LA) (Sigma-Aldrich)	Le LA contient 10 g/L de tryptone, 5 g/L d'extrait de levure, 5 g/ L de chlorure de sodium et 15 g/L d'agar pour 1 L d'eau déionisé (pH = 7,0 ± 0,2)

### 1.3. Produits chimiques

Le formiate de sodium (GC > 99% ; MERCK) et le glucose sont utilisés en tant que donneurs d'électrons pour les bactéries. Le fumarate de sodium dibasic (>99% ; Sigma-Aldrich) est utilisé en tant qu'accepteur d'électrons pour les bactéries. Les électrodes utilisées sont du carbone vitreux (SIGRADUR) obtenu de HTW Hochtemperatur-WerkstoffeGmbH (Allemagne), du graphite pyrolytic (PG) obtenu de Bio-Logic SAS ou enfin du feutre de graphite (GFD 4,6 E.A.) du groupe SGL (Allemagne). Les tampons utilisés sont des tampons KCl (>99%, 1mM, Sigma-aldrich) et phosphate préparés à partir de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O (≥ 99.6 %;Prolabo) and Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O (≥ 99 %; Fluka). Toutes les solutions sont préparées à partir d'eau pure (18 MΩ cm) obtenue à l'aide d'un système de purification Purelab (Elga LabWater, Veolia Water STI, Antony, France).

## 2. Préparation du matériel bactérien

Les souches bactériennes utilisées dans ce présent travail ont été fournies par le laboratoire LCPME du CNRS de Lorraine. Les protocoles de mise en culture sont répertoriés en annexes.

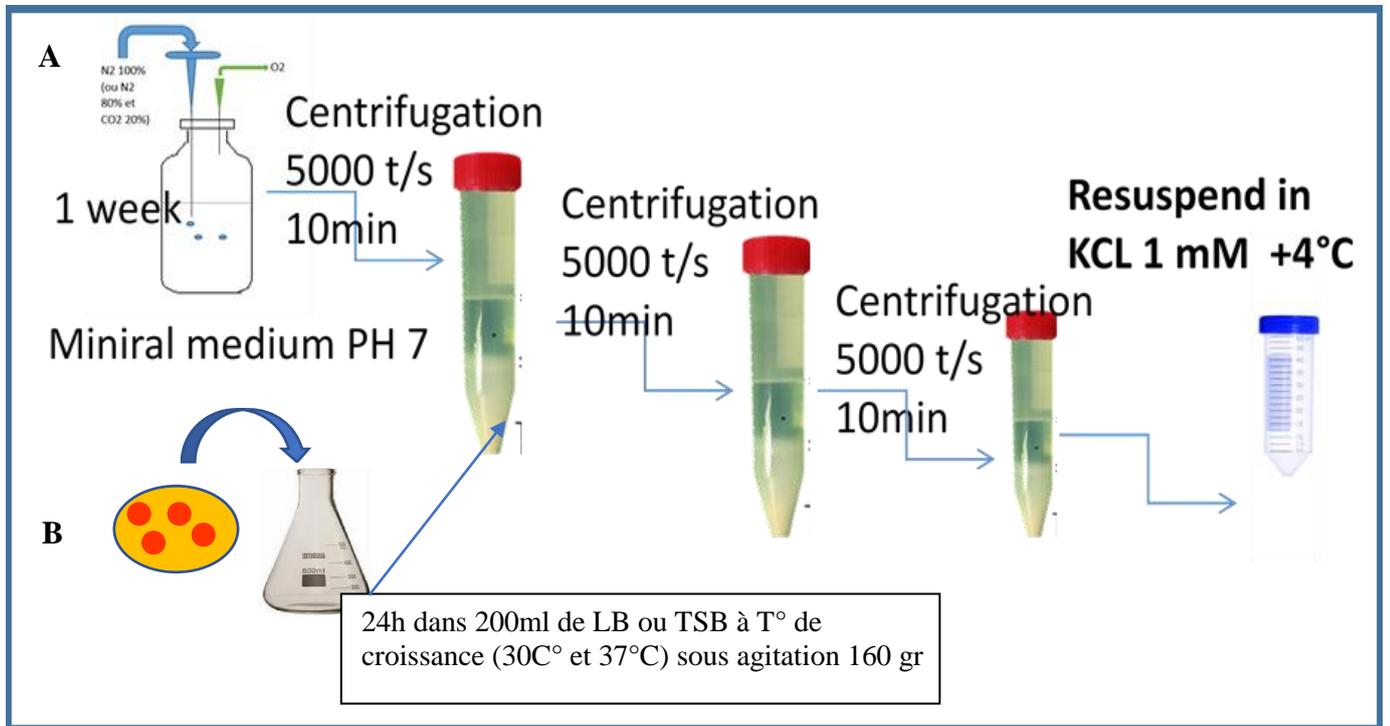
Les espèces *Shewanella oneidensis* MR-1, *E. coli* et *Pseudomonas fluorescens* ont été cultivées dans un volume de 200 ml de milieu de croissance liquide (LB ou TSB). Un milieu minéral a été utilisé pour la culture de *Thiobacillus denitrificans* et *Geobacter sulfurreducens*. Nous avons perdu cette dernière souche au cours de son repiquage pendant la période du confinement et pour des raisons sanitaire Covid-19, nous n'avons pas pu la commander.

Nous avons procédé à l'incubation de certaines cultures d'*Escherichia coli* en anaérobiose et d'autres en aérobiose, conformément à la littérature. Après incubation, une centrifugation des cultures bactériennes est réalisée trois fois pendant 10 min à 5000 gr. (Pink et al 2017). Après chaque cycle, un rinçage au KCl (1mM) est effectué afin d'éliminer toute trace de navettes ou médiateur extracellulaire comme c'est le cas des flavines chez MR1. Ensuite la suspension bactérienne est stockée dans du KCl (1 mM) à +4°C. (Pink et al 2017).

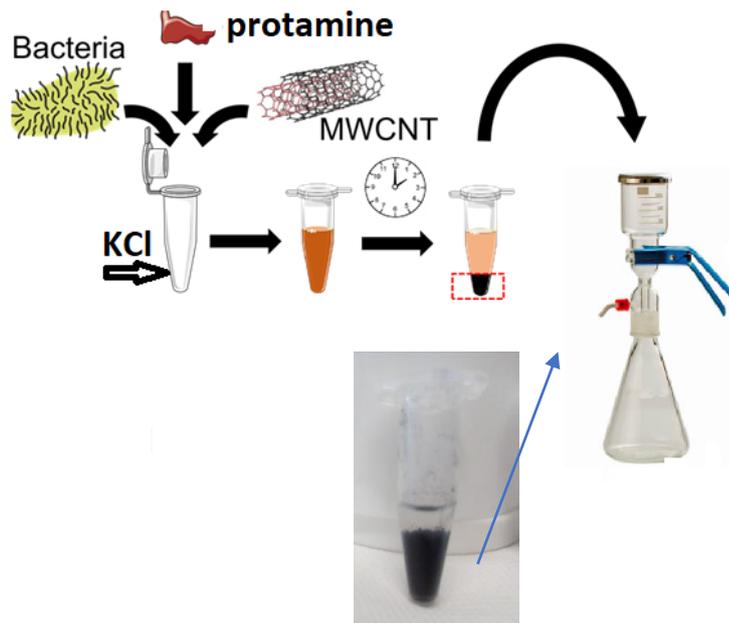
### I.1 Assemblage du biocomposite

Un assemblage pendant les 5 premiers jours de la vie de la bactérie a été réalisé sur les suspensions bactériennes, pour assurer sa viabilité et sa vivacité. Pour cela, un volume de 100µl d'une solution de protamine à 5mg/ml, 100µl de MWCNT à 5mg/ml, 100µl d'une suspension bactérienne dont la densité est ajustée à  $5 \cdot 10^9$  UFC et 200µl de KCl (1mM) sont placés dans un microtube (Eppendorf). Le mélange est laissé reposer pendant quinze minutes jusqu'à ce qu'une biphase se forme (Figures 15A, 15B, 16).

Soit sur le bukypaper ou le feutre de carbone nous déposons notre suspension sous des conditions de sous vide. Les paramètres physiques choisis ont été conclu après plusieurs essais et tâtonnement.



**Figure 17:** Préparation de la suspension bactérienne de *Thiobacillus denitrificans*  
En A, *Shewanella oneidensis*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas putrefaciens* en B.



**Figure 18:** Schéma représentatif du protocole d'assemblage du biocomposite bactérien.

Des matériaux composites formés à partir de l'auto-assemblage de cellules bactériennes *Shewanella oneidensis* MR-1, *Thiobacillus denitrificans*, *E. coli*, *Pseudomonas sp* avec des nanotubes de carbone en présence de protamine ont été proposés dans ce Chapitre II pour mimer un biofilm électroactif. L'utilisation des nanotubes de carbone (MWCNT) et la protamine étaient proposées dans cette situation pour créer une structure stable et en même temps conductrice. Cet assemblage et les structures des biocomposites ont été étudiés à l'aide de microscopie électronique à balayage. Les MWCNTs chargés positivement à pH neutre et la protamine chargée négativement a permis de proposer que l'autoassemblage du biocomposite grâce à des forces électrostatiques, étant donné que les bactéries sont chargées négativement à pH neutre.

### I.3. Etude structurale du biocomposite par microscopie électronique à balayage MEB

L'observation de différents composites utilisés a été réalisée avec un microscope électronique à balayage de type JSM- IT 500 HR à un grossissement plus grand de  $1\mu\text{m}$  (Figure 19).



**Figure 19:** Microscope électronique à balayage, JSM-IT 500 HR.

### 1.4. Mécanismes d'assemblage des constituants du biocomposite

Dans le présent travail, l'importance des forces électrostatiques dans la formation du biofilm artificiel a été évoquée plusieurs fois. Ce constat provient des différentes expériences menées avec des protéines présentant des charges différentes à pH neutre, i.e. le Multi Wall nanotube de carbone MWCNT chargée négativement, la protamine chargée positivement. Une analyse de DLS (dynamic light scattering) a été effectuée pour déterminer la distribution globale de ces éléments dans un volume déterminé d'une suspension composée soit de : MWCNT seulement ou de cellules bactériennes de la souche *S. oneidensis* MR-1 seulement, ou bien de l'ensemble de la souche *S. oneidensis* MR-1, MWCNT et de la protamine sulfate.

## I.5. Etude de Configuration des cellules électrochimiques et L'Electrode de Travail

### I.5.1. Choix de la cellule et des électrodes

Dans notre étude, deux types de cellules électrochimiques ont été utilisées : la première est une cellule conçue par l'atelier du laboratoire LCPME (figure 18) et la seconde est conventionnelle (Figure 19). Cependant, la cellule conventionnelle a été retenue pour le reste des travaux de la thèse pour faciliter les manipulations. Elle se présente sous la forme d'une chambre à double paroi avec trois électrodes : une électrode de travail formée d'un composite d'une surface de  $2.27 \text{ cm}^2$  connectée par une tige en acier inoxydable, une contre électrode sous forme de grille en acier inoxydable d'une surface de  $4 \text{ cm}^2$  connectée aussi par une tige en acier inoxydable et une électrode de références Ag/AgCl saturé (sat. KCl, SE11 Sensor technik Meinsberg, Germany). En ce qui concerne la seconde cellule, elle a été proposée pour les manipulations sous boîte à gant. Il faut signaler que nous avons fabriqué nous même tous les composants de la cellule.



**Figure 20:** Photo de la cellule électrochimique expérimentale fabriquée au laboratoire utilisé avec le Bukypaper comme une électrode de travail.



**Figure 21:** Photo de la cellule électrochimique conventionnelle.

## **I.4.2. Choix des électrodes**

### **I.4.2.1. Electrodes de travail**

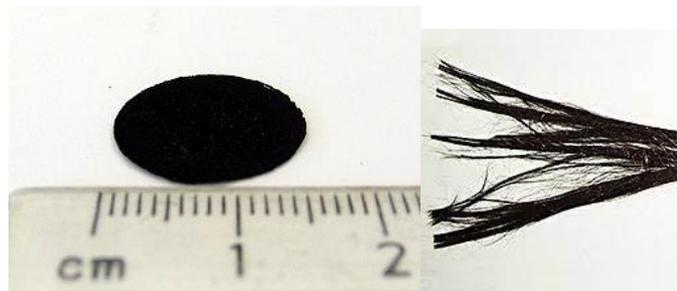
Au cours de nos investigations, nous avons utilisé le carbone en raison d'un certain nombre d'avantages tels que son coût modéré, sa bonne stabilité thermique, sa bonne conductivité électrique et aussi du fait qu'il n'est toxique pour les microorganismes, etc. Il est souvent utilisé en tant que matériau d'électrode, dans les catalyseurs microbiens. (Chauhan, 2021).

Les matériaux à base de carbone sont disponibles sous forme de plaques, tige en graphite. J. Choi, (2020), granules, carbone vitreux réticulé, (Li & Zhan, 2020), ou encore des matériaux fibreux sous forme de feutre, tissu, papier et mousse de carbone. Ils sont les plus fréquemment utilisés comme anodes (X. Li, 2021). En effet, ils sont non seulement stables dans les cultures microbiennes, peu chers, faciles à utiliser, mais possèdent en outre de grandes surfaces actives qui permettent d'obtenir de meilleurs rendements pour les piles, (Katsounaros 2021). C'est pour cette raison que les recherches actuelles se focalisent de plus en plus sur la modification chimique de la surface des électrodes afin d'augmenter la surface spécifique du matériau. Ce qui permettra d'avoir une surface d'échange plus grande d'une

part ; ainsi que de favoriser l'adhésion microbienne et améliorer le transfert électronique à l'interface biofilm/électrode, d'autre part. Dans nos essais, nous avons utilisé deux formes de carbone : feutre de carbone et papier carbone nommé Bukypaper.

### A- Bukypaper

Le *Buckypaper*, que l'on peut traduire par feuille de buckyballes (Figure 20), est une feuille mince composée d'un assemblage de nanotubes de carbone. Elles servaient originellement comme moyen pour manipuler les nanotubes connectés par une fibre de carbone.



**Figure 22:** L'électrode de travail « Buckypaper » en CNT et la fibre de carbone à droite de la photo.

### B- Feutre de carbone

C'est un disque de feutre de carbone d'une surface de  $2.27\text{cm}^2$  (figure 20), nettoyé en plusieurs passages successives à l'éthanol 80%, 60%, 40% et 20% dans un bac à ultra-son pendant 15min. En suite, il est stocké dans de l'eau distillée stérile.

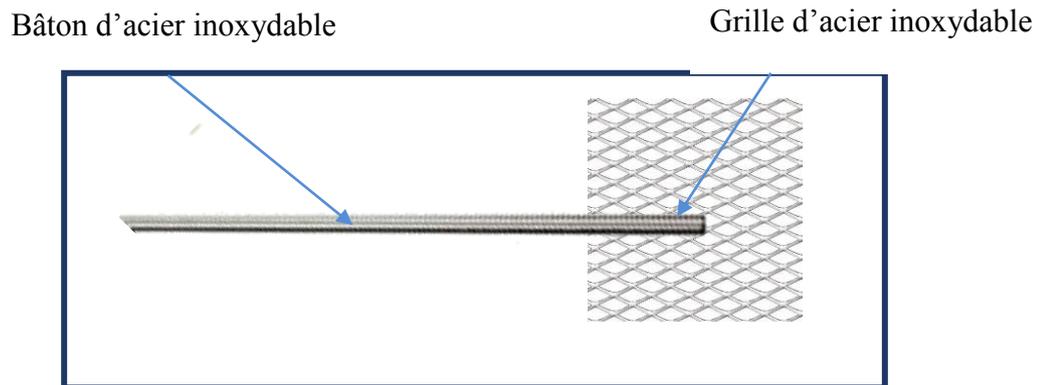


**Figure 23:** L'électrode de travail : feutre de carbone.

### I.4.2.2. La Contre électrode

#### A- La grille d'acier inoxydable

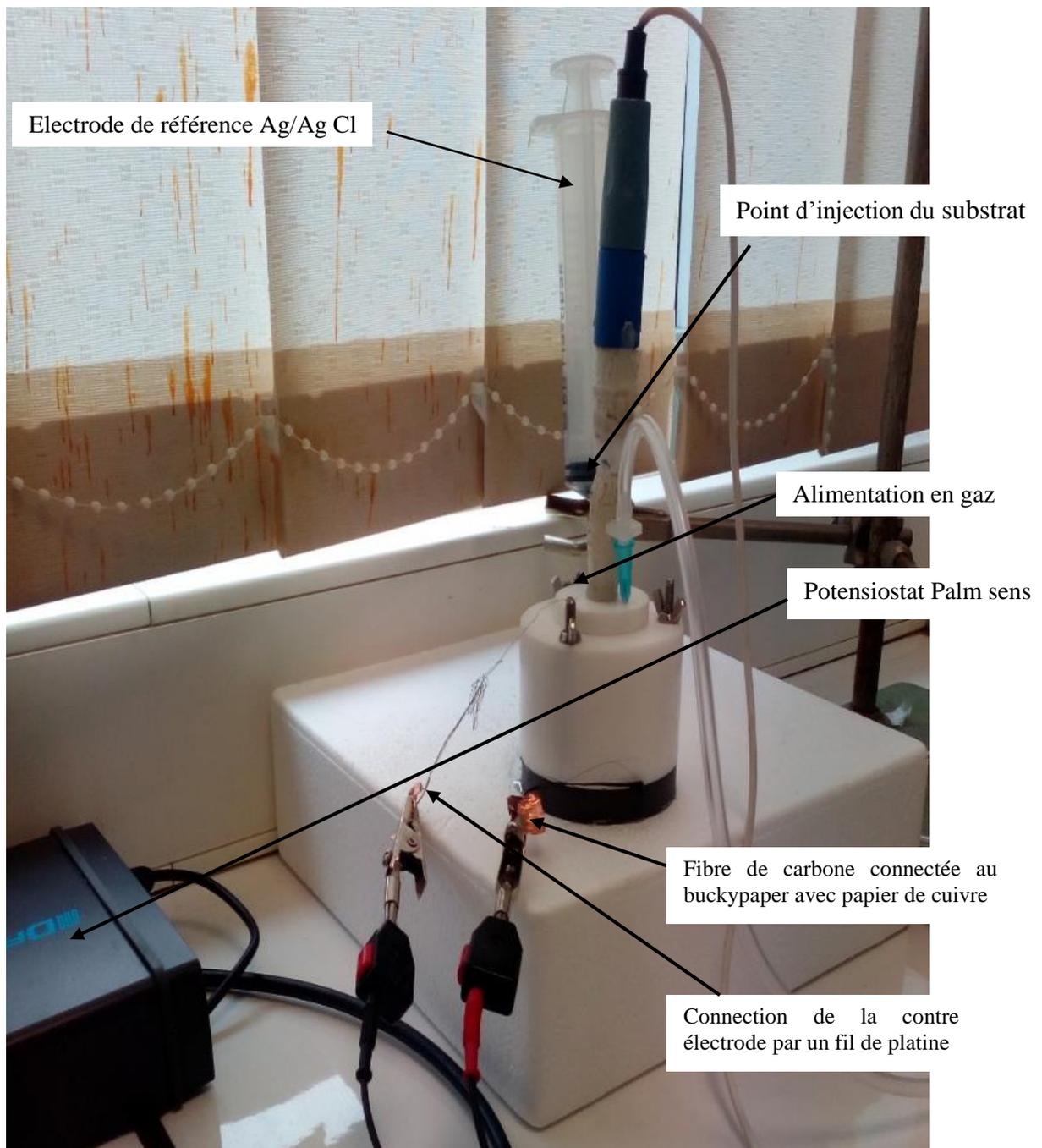
La Contre Electrode est une grille d'acier inoxydable usinée aussi à l'atelier du laboratoire LCPME (Figure 22).



**Figure 24:** Contre électrode faite de grille d'acier inoxydable d'une surface de  $3,5\text{cm}^2$ .

### I.4.3. Montage des cellules électrochimiques

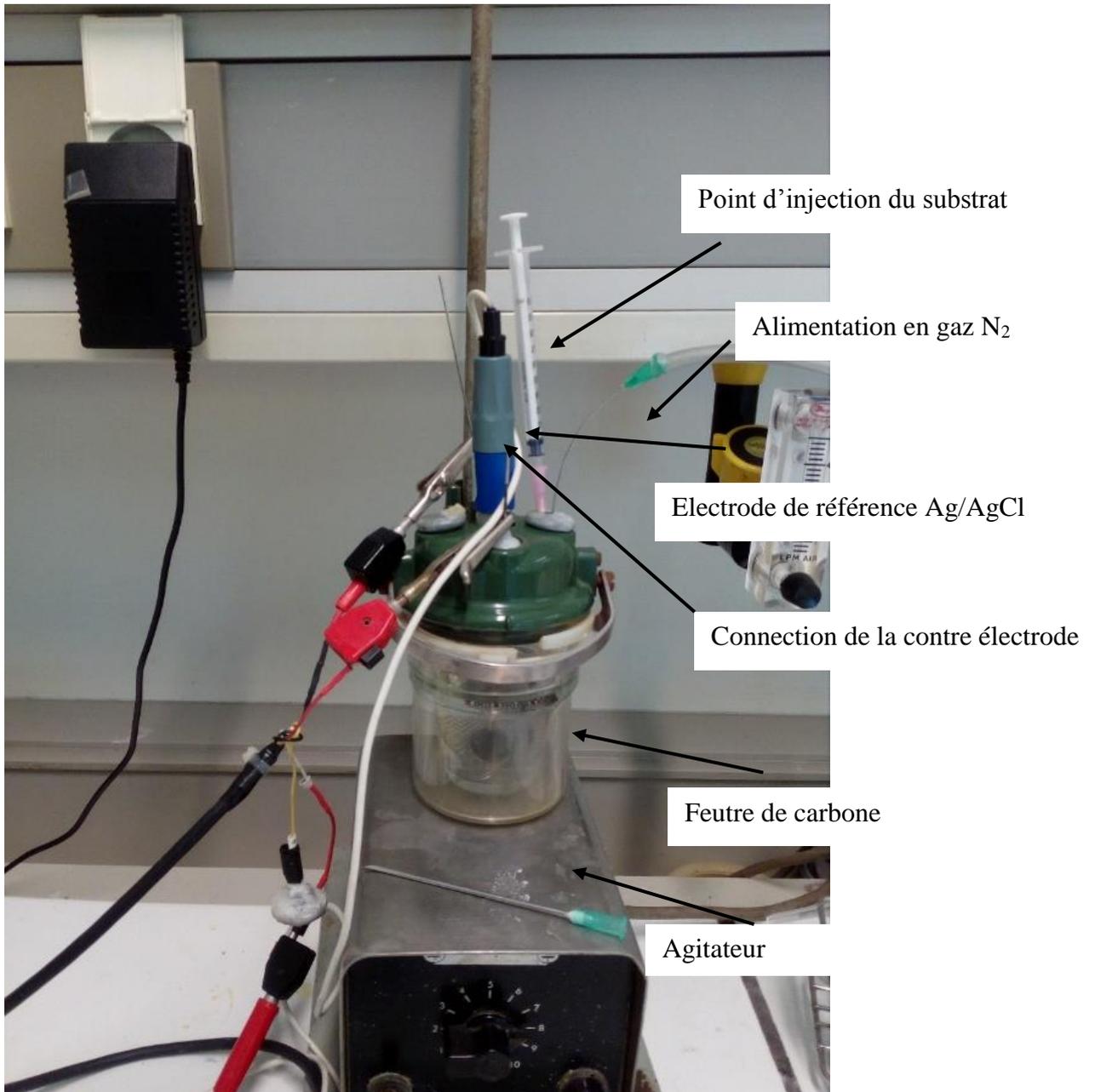
#### A- La cellule électrochimique expérimentale avec Buckypaper



**Figure 25:** Montage de la cellule électrochimique expérimentale.

## B- La cellule electrochimique conventionnelle

La cellule utilisée est une cellule conventionnelle faisant objet de référence pour la confirmation des résultats obtenue avec la cellule expérimentale (Figure 24).



**Figure 26:** La cellule electrochimique conventionnelle à double parois.

## **II. Etude du transfert extracellulaire directe des électrons à la cathode sous l'effet de l'âge de la bactérie et de la température.**

### **II.1. La bio électro catalyse à la cathode**

#### **II.1.1. Chronoampérométrie**

La chronoampérométrie est une technique de mesure électrochimique qui consiste à imposer un potentiel donné aux deux bornes de la cellule électrochimique et mesurer la densité de courant générée par cette cellule. Durant nos essais, le potentiel utilisé correspondait à -0.48 V et la concentration du nitrate ajouté était de 20mM. En ce qui concerne les mesures de la réduction du nitrite à une concentration de 20mM, le potentiel était de -0.67 V. La température est maintenue à 30°C sous un flux continue d'azote et une agitation très faible afin d'homogénéiser le milieu et assurer un maximum de contact avec le substrat. Le potentiel a été choisi suivant les résultats du screening évoqué plus loin.

#### **II.1.2. La voltammétrie cyclique (CV)**

La technique consiste à enregistrer la densité de courant généré par un système électrochimique tout en balayant le potentiel sur un intervalle donné. Les mesures de CV ont été enregistrés sur un intervalle de -0.8V à +0.4 V, une vitesse de 5mV/s et un pas de 0.001V. Ces paramètres ont été utilisés pour les mesures de la réduction des nitrates et les nitrites. La température a été maintenue à 30°C sous flux continu d'azote. Après stabilisation du courant au début du cycle de la CV, une concentration de 20mM de nitrate ou nitrite a été injectée pour la première mesure. Il est à noter que tous les potentiels dans cette communication sont fournis vs Ag/AgCl (sat. KCl; +0.197 V vs. Standard hydrogen electrode).

### II.1.3. L'électrocopie d'impédance

## II.2. Screening micro-électrochimique

L'étude du screening micro-électrochimique consiste à sélectionner les différentes souches microbiennes pour leurs capacités de transfert d'électrons de façon directe à l'électrode de travail. Ces électrons proviennent de leurs métabolismes sous l'action d'un potentiel donné et la bactérie ne pourra céder ces électrons à l'électrode de travail que lorsqu'elle possède la machinerie enzymatique membranaire adéquate pour cette connexion.

Les composites microbiens appelés également biofilms artificiels, ont été introduit dans afin de sélectionner et connaître les souches intéressantes pour l'enrichissement de l'électrolyseur pilote ultérieurement ; et connaître aussi le potentiel auquel la réduction et l'oxydation des substrats pourront avoir lieu pour obtenir des résultats concluants. Pour cela, deux montages électrochimiques décrits précédemment, ont été utilisés. Les mesures ont porté sur la voltamétrie cyclique et la Chronoampérométrie. Les mesures de CV ont été enregistrées sur un intervalle de -0.8V à +0.6 V, une vitesse de 5mV/s et un pas de 0.001V. La Chrono étant effectuée à -0,3 V, -0.46V et +0.2 V.

L'électrode de référence était de type Ag/AgCl au KCl saturé et la contre électrode consistait en une grille d'acier inoxydable. Au cours des expériences, nous avons conçu une cellule adaptée dans certaines conditions spécifiques.

Les différentes souches bactériennes choisies dans cette étude, ont été testés suivant leur capacité à réduire ou oxyder un substrat donné. Ainsi, *Thiobacillus denitrificans* a été testé pour son pouvoir réducteur des nitrates et des nitrites ; *Shewanella oneidensis* pour la réduction du fumarate, *Escherichia coli* et *Pseudomonas putrificiens* pour l'oxydation du glucose, lactose et galactose. Les concentrations ont été relativement élevées de l'ordre de 20mM pour chaque substrat afin de favoriser la réponse catalytique.

## **II.3. Influence des facteurs de l'âge et la température sur la réponse cathodique**

### **II.3.1. Effet de l'âge de la bactérie**

Pour connaître l'influence de l'âge de la bactérie à la réceptivité et l'électrocatalyse, dans un milieu hostile, la contrainte était la présence des MWCNT-COOH dans le composite. A cet effet, nous avons effectué une série de mesures de voltammétrie cyclique sur des composites bactériens formés à partir de suspensions de *T. denitrificans* âgées de 5 jours, 10 jours et 15 jours respectivement, en présence de 20mM de nitrate. Le potentiel du champ appliqué était de -0.8V à +0.4V, une vitesse de balayage de 5mV/s, et un pas de 0.001V. Les mesures ont été réalisées dans des conditions nécessitant une électrode de référence, un flux d'azote continu, un pH neutre et une température ambiante (20°C). L'expérience a suscité cinq répétitions.

### **II.3.2. Effet de température**

Afin d'optimiser les réactions métaboliques bactériennes, nous avons adopté un autre facteur physique, la température. Cette dernière a été fixée à 30°C et maintenue grâce au bain marie thermostat. L'expérience a suscité cinq répétitions.

## **II.4. Utilisation de la Protamine dans le transfert d'électrons dans les biocomposites électroactifs**

Une analyse de la distribution de particule, dans un volume déterminé par DLS (dynamic light scattering), de suspensions composées uniquement de MWCNT, ou de cellules bactériennes de la souche *S. oneidensis* MR-1, ou bien du mélange composé de la souche *S. oneidensis* MR-1, de MWCNT et de la protamine sulfate.

### **III. Réduction bio-électrochimique des nitrates et des nitrites chez *Shewanella oneidensis* et *Thiobacillus denitrificans***

La réduction des nitrites a été démontrée par des mesures de chronoamperométrie réalisées sur des biocomposites constitués séparément de *T. denitrificans* et MR1. Les expériences de screening ont permis de fixer le potentiel appliqué aux profils de CVs à -0.35V pour les nitrates et -0.7V pour les nitrites.

#### **III.1. Effet de la concentration du nitrate sur la densité du courant**

Une série de mesures de voltammétrie cyclique ont été appliquées aux biocomposites déposés sur du feutre de carbone, en présence d'une gamme de concentrations de nitrate (0, 10, 20, 40 et 60mM) pour un composite fabriqué à partir de *T. denitrificans*. Dans le cas de MR1, cette gamme de concentrations correspondait à 0, 10, 20, 40, 60 et 80mM. Les conditions utilisées sont identiques à celles des expériences citées précédemment et les essais ont été répétés cinq fois. Ce qui a permis d'établir une courbe de calibrations pour les deux espèces utilisées.

#### **III.2. Effet de la concentration bactérienne sur la densité du courant**

Une étude sur la relation entre l'effet de la concentration bactérienne dans le composite et la réponse électrochimique a été particulièrement intéressante. L'intérêt que procurent les résultats est de l'ordre d'un travail de capteur. Des mesures de chronoamperométrie ont été effectués sur des biocomposites de MR1 à en présences de 10 mM de nitrates à différentes concentrations bactériennes ajustées à des densités optiques différentes :  $DO_1= 1$ ,  $DO_2= 0.6$ ,  $DO_3=0.4$ ,  $DO_4= 0.2$  et  $DO_5= 0.11$ .

### III.3. Calibration

Une mise au point de la calibration du rapport entre la concentration du substrat et la densité du courant est déterminée par l'équation comme suit  $F(I) = a(C_s) + C_{s0}$ . Le rapport mode capteur entre la concentration des bactéries et l'intensité du courant est calculé utilisant la formule suivante :  $F(I) = a(C_b) + C_{b0}$ .

## IV. Production du Biohydrogène

La production du biohydrogène est préconisée par la mise en place d'un électrolyseur microbien inoculé par des boues des sédiments saumâtres, dans des conditions de fermentation, une alimentation en substrat organique est renouvelée chaque 10 jours.

### IV.1. Conception de l'électrolyseur microbien à l'échelle laboratoire

L'optimisation des paramètres physicochimiques de la réaction cathodique et la sélection des souches à haut pouvoir électrochimiques ont conduit à la conception d'une cellule électrochimique comme un électrolyseur de 500 ml. L'inoculum utilisé dans cet essai est une boue des eaux saumâtres d'une teneur en sel de 34g/l, provenant des chottes de la wilaya d'Ouargla au sud d'Algérie. Cette boue a été prélevée en surface (0 cm) et à des profondeurs de 20 et 70 cm. Ses caractéristiques physicochimiques ont été définies par le laboratoire - CNRS - CRPG Service d'Analyse des Roches et des Minéraux à Nancy-France, et sont représentées dans le tableau 2.

**Tableau 4 :** Les caractéristiques physicochimiques des boues saumâtres de Ouargla, définies par le laboratoire - CNRS - CRPG Service d'Analyse des Roches et des Minéraux à Nancy-France.

Ref	Prf 0	Prf 20	Prf 70
Sc	< L.D.	< L.D.	< L.D.
SiO <sub>2</sub>	78,96	79,84	92,04
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0,99	1,26	0,99
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0,34	0,33	0,17
MnO	< L.D.	< L.D.	< L.D.
MgO	0,75	0,39	0,16
CaO	5,89	6,95	2,58
Na <sub>2</sub> O	1,18	0,28	0,10
K <sub>2</sub> O	0,39	0,48	0,42
TiO <sub>2</sub>	0,10	0,10	< L.D.
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	< L.D.	< L.D.	< L.D.
PF	11,06	8,27	2,78
<b>Total</b>	<b>99,65</b>	<b>97,90</b>	<b>99,25</b>

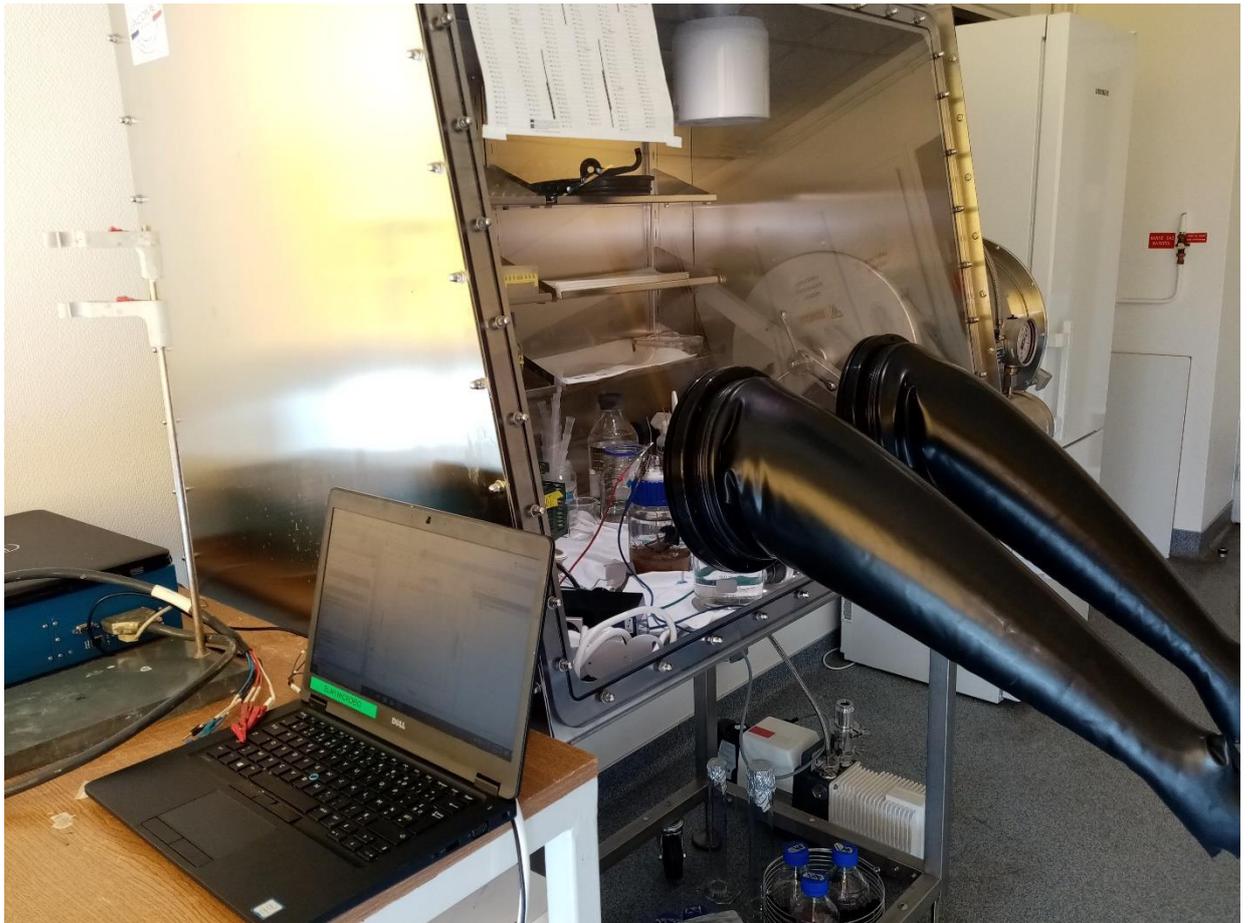
#### IV.1.1. Electrolyseur à une seule chambre de 500 ml

Un volume de 300 ml de sédiment a été mélangé à 500 ml enrichi avec 10% d'une suspension de *Shewanella oneidensis*, la température contrôlée avec un bain marie thermostat. Un feutre de carbone et la contre électrode de surfaces de 8cm<sup>2</sup> et 18 cm<sup>2</sup> respectivement, ont été utilisés comme électrode de travail. La connexion est assurée par des files de platine (Figure 25). L'ensemble des électrodes a été autoclavé. L'expérience a été conduite en anaérobiose, dans deux conditions différentes : l'une dans une boîte à gants et la

seconde sous flux continue d'azote (Figure 26). Une différence de potentiel de +0.2V est appliqué et après stabilisation du courant électrique, 2g de glucose ont été ajoutés.



**Figure 27:** Electrolyseur microbien à une seule chambre sous flux continu d'azote.



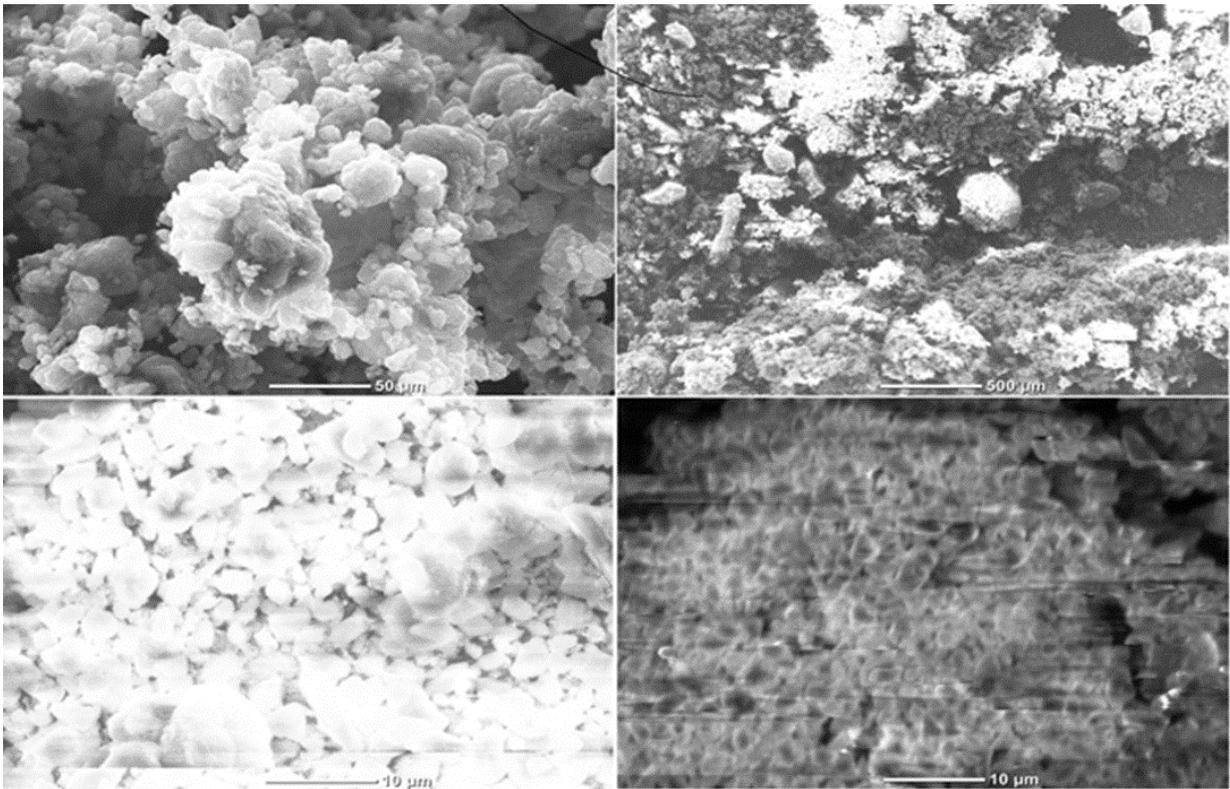
**Figure 28** : Electrolyseur microbien à une seule chambre sous boîte à gants.

# **Chapitre III**

## **Résultats et Discussions**

## I. Mécanismes d'assemblage des constituants du biocomposite

L'importance des forces électrostatiques pour la formation du biofilm artificiel a été évoquée plusieurs fois. Ce constat provient des différentes expériences menées avec des protéines présentant des charges différentes à pH neutre, le Multi Wall nanotube de carbone MWCNT chargée négativement et la protamine chargée positivement (Figure 27). La microscopie électronique à balayage a permis ensuite de décrire les agrégats formés avec



**Figure 29 :** Micrographie au MEB de l'assemblage protamine et les MWCNT.

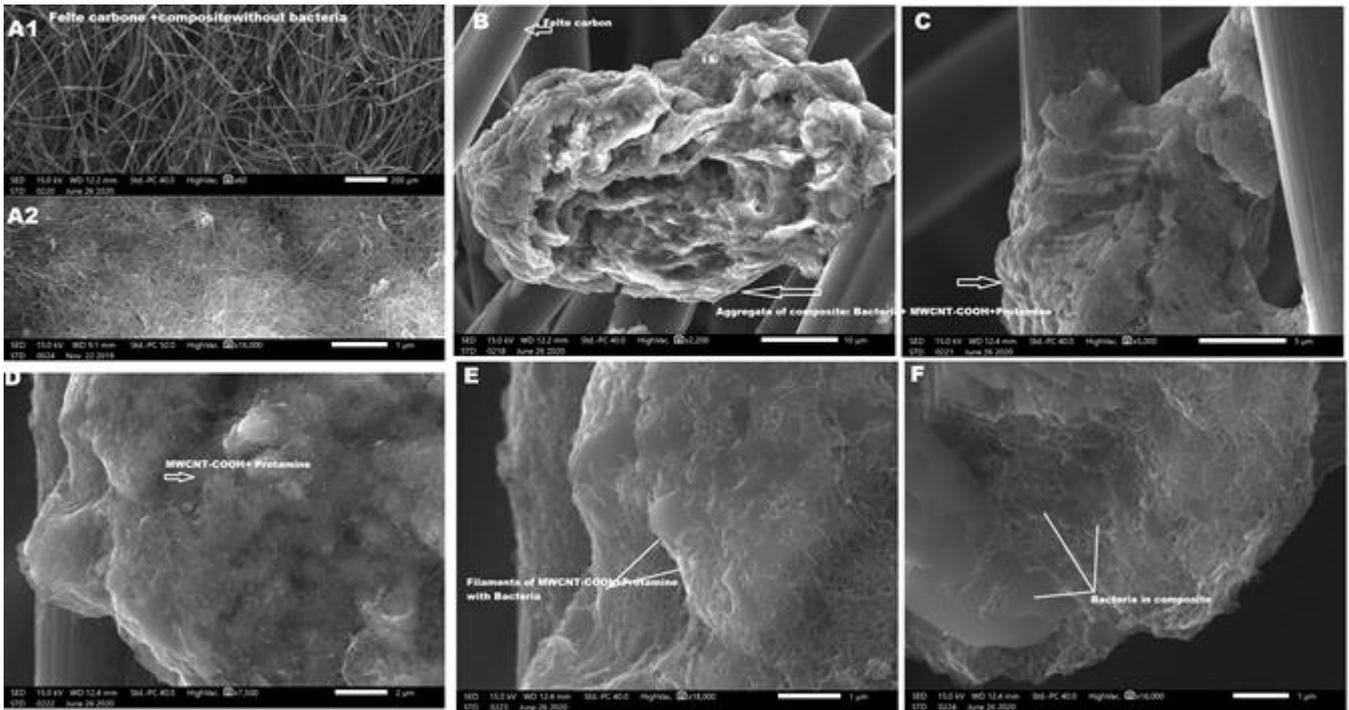
L'importance des forces électrostatiques pour la formation du biofilm artificiel à pH neutre des charges différentes, le Multi Wall nanotube de carbone MWCNT chargée négativement et la protamine chargée positivement.

Une structure rappelant les biofilms naturels où les MWCNTs remplaceraient la matrice des substances polymériques extracellulaires. Les agrégats ont alors été déposés sur le feutre de carbone et aussi sur des disques de Buckypaper, formant un matériau composite à base de

MWCNT et protamine dans lequel les bactéries étaient enrobées. La densité cellulaire des films formés était de 1 cellule  $\mu\text{m}^{-2}$ . La présence de la protamine a permis d'améliorer la viabilité, sans doute dû à l'organisation des MWCNT qui s'agrégeaient entre eux et avec la protamine, en limitant la cytotoxicité mécanique des MWCNT sur la bactérie.

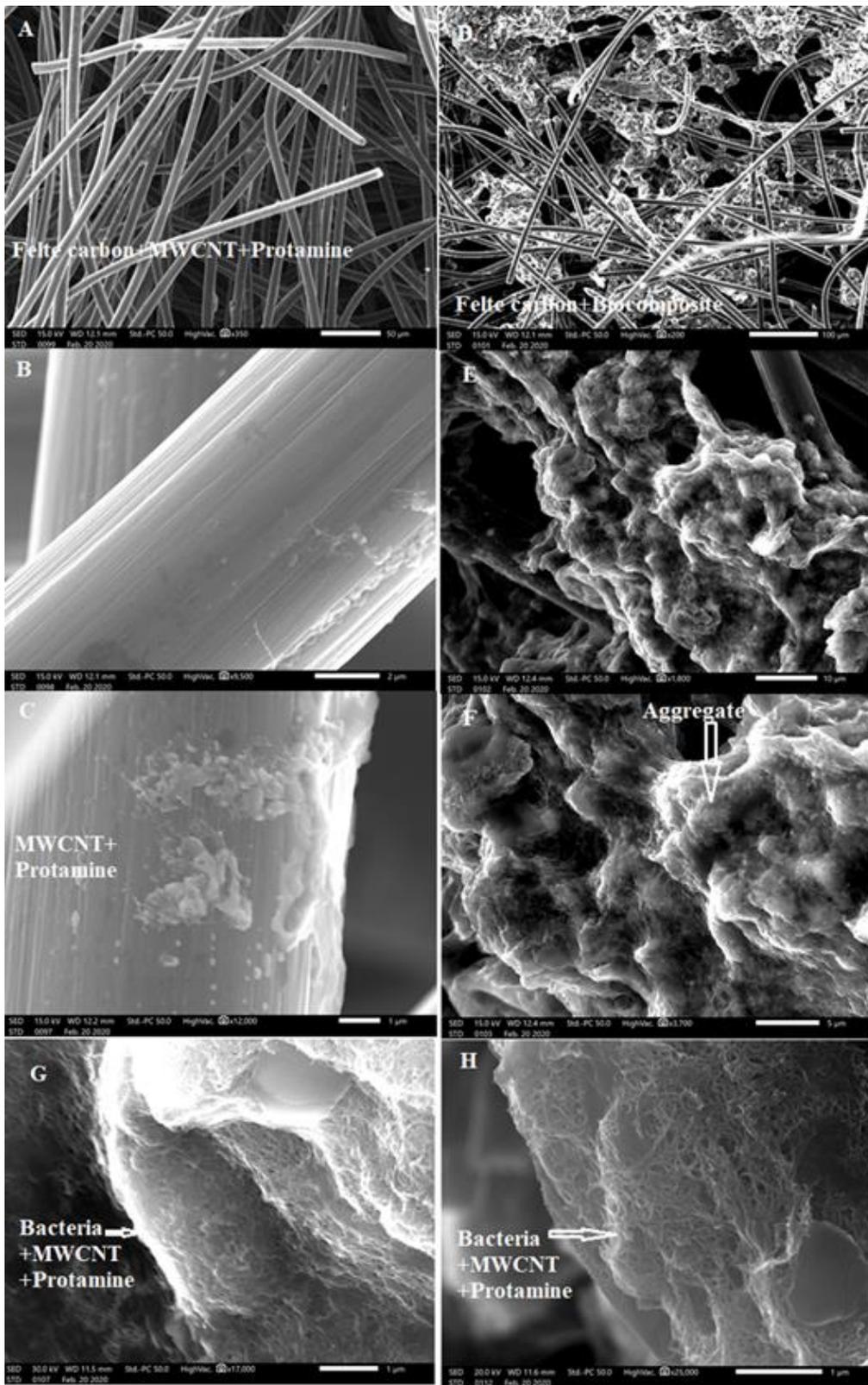
Les expériences menées avec ces protéines ont toutes confirmé que les agrégats biocomposites étaient formés seulement en présence de protéines qui étaient chargées positivement et rarement avec celle chargées négativement (Figures 28 et 29).

La figure 28 (A, B) montrent la morphologie du feutre de graphite avec deux grossissements différents comme une électrode nue, La figure 28 (C et D) montrent les MWCNT et la protamine après dépôt dans le feutre de graphite examiné à différents grossissements. La Figure 28 (F) montre que les bactéries sur le feutre de carbone sous forme de points blancs avec une échelle de  $1\mu\text{m}$ , (Zeledón. 2021). A ce stade du travail, la visualisation des bactéries de façon déterminante à l'aide d'un microscope électronique à balayage a été réalisée, en attendant l'acquisition d'un nouveau microscope électronique de haute résolution pour le reste du travail.



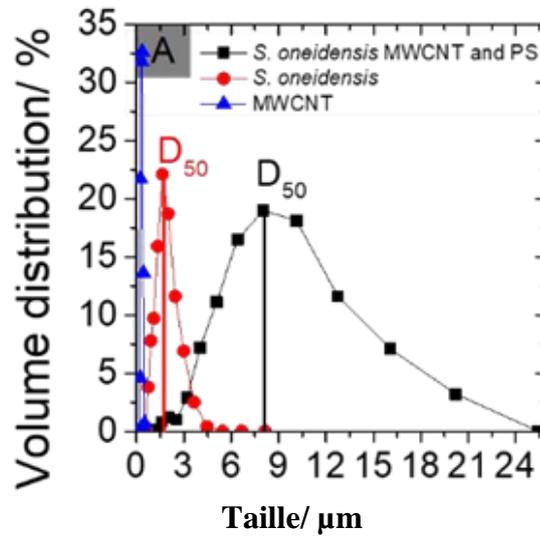
**Figure 30:** Micrographies du biocomposite en carbone feutré.

Vues au microscope électronique à balayage. (A1-A2) Le composite fabriqué avec des MWCNT et de la protamine. La bactérie, *Shewanella oneidensis*, avec MWCNT et protamine sur le carbone feutré. La figure (B-C-D-E-F) montre la morphologie de l'agrégat avec trois grossissements différents comme une électrode nue.



**Figure 31:** Micrographies électroniques à balayage du feutre graphite modifié

Avec une suspension de MWCNT et de protamine (A-C) ou avec le composite bactérien préparé avec *Thiobacillus denitrificans*, MWCNT et protamine (D-H).

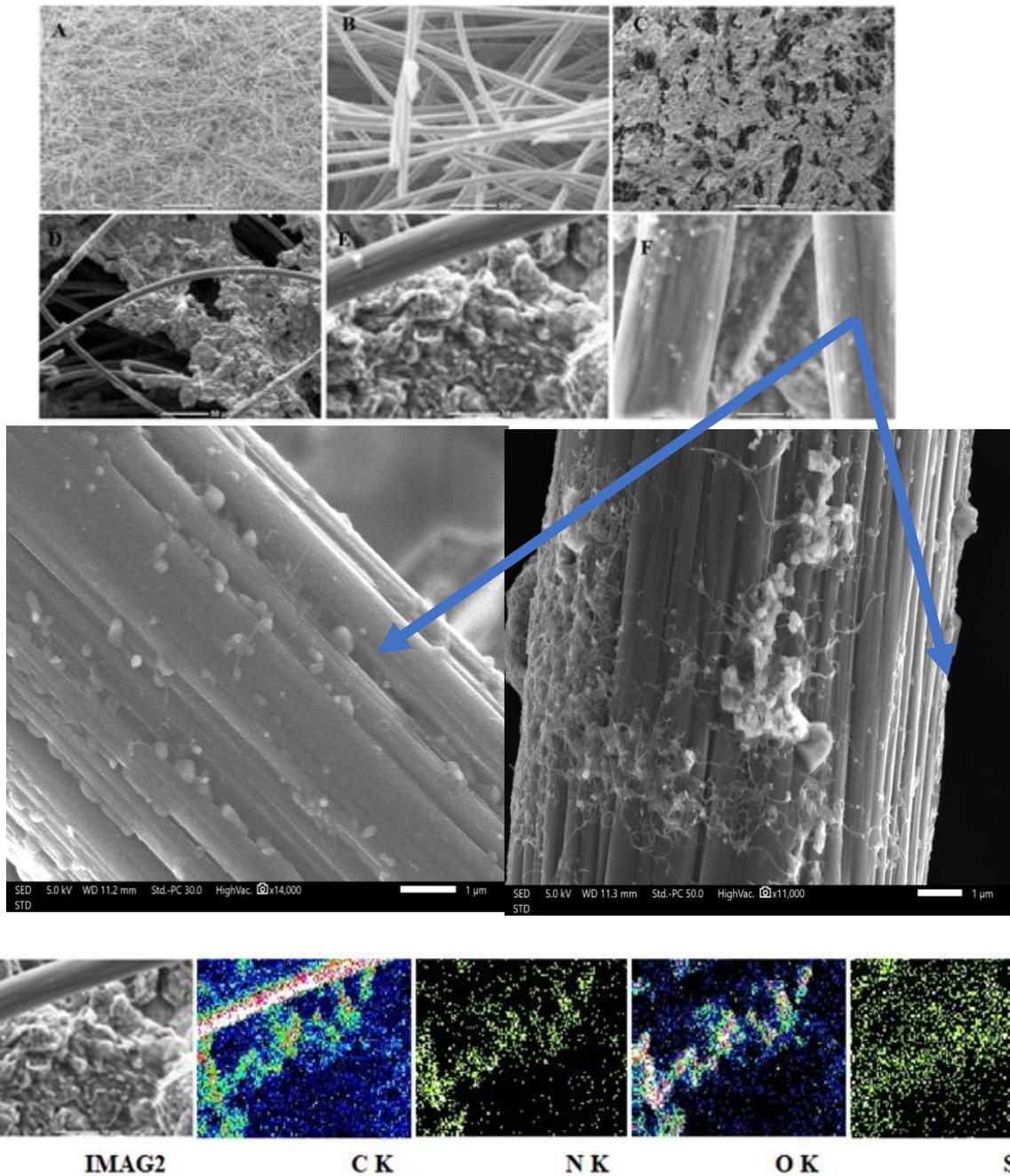


**Figure 32:** (A) Distribution globale dans un volume déterminé par DLS

(Dynamic light scattering) de suspensions composées de MWCNT, *S. oneidensis* MR-1 cells ou bien de l'ensemble *S. oneidensis* MR-1 cells, MWCNT et de la protamine sulfate.

Le résultat de la DLS exprime de façon claire le maintien du complexe protamine -bactérie-MWCNT dans le temps contrairement aux particules seules

La figure 31(G) montre la cartographie EDX pris sur un échantillon figurant dans 31F et qui montre la distribution des éléments. Les pourcentages de tous les éléments C, N, O et S sont de 76, 4, 12 et 8% assurant la présence de MWCNT et de protamine, (Wang, 2021).



**Figure 33: Images SEM du composite**

*A, B pour le feutre de graphite. C, F pour le feutre de carbone avec MWCNT et protamine*

En conclusion, les résultats montrent une très bonne attractivité entre les CNT- COOH et la protamine. Ce qui permet conduit à une forte complexité.

## II. Le screening micro-électrochimique

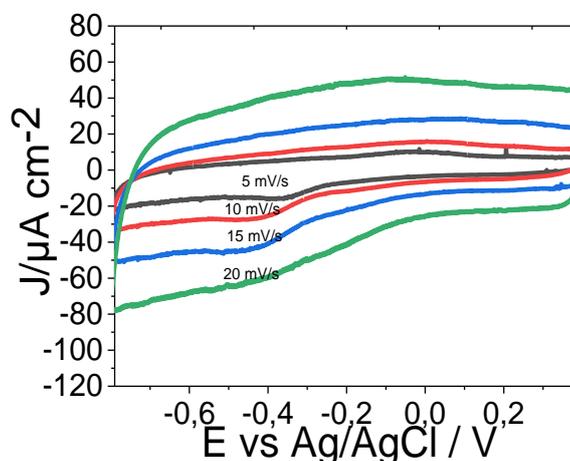
Dans la préparation du biocomposite, quatre souches bactériennes ont été utilisées : *S. oneidensis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Thiobacillus denitrificans* et *E. coli*. Les réponses de ces microorganismes en présence de substances à oxyder et à réduire ont été testées, en sachant que l'oxydation se déroule au niveau de l'anode et la réduction à la cathode. Le composite avec MR1 a produit un courant d'oxydation lorsque le glucose est ajouté à une concentration de 20 mM. D'autre part, un signal de réduction en présence de 50 mM de fumarate et de concentrations croissantes de nitrate et de nitrite a aussi été enregistré chez cette bactérie. Le remplacement de MR1 par *T. denitrificans* a entraîné une hausse significative de la densité du courant, en présence de concentrations croissantes de nitrate et de nitrite sous contrôle de température.

Par contre, le biofilm artificiel produit avec *Escherichia coli* et *Pseudomonas fluorescens* n'a pas généré de courant d'oxydation après l'addition de 0,5 mM de glucose à plusieurs reprises, ni de courant de réduction en présence de 50mM de fumarate et de 20mM de nitrate et de nitrite. Ceci pourrait s'expliquer par l'absence de cytochrome membranaire chez ces bactéries, et qui intervient dans le transfert extracellulaire d'électrons dans le biofilm artificiel. Ces transferts d'électrons dans le biocomposite semblent être effectués par l'activité des protéines membranaires par le biais de l'EET directe.

### II.1. Effet de la vitesse de balayage sur la détection du signal catalytique : le scan rate

Une série de mesure de voltammétrie cyclique a été effectuée afin de choisir la vitesse de balayage la plus appropriée à notre matériel d'analyse. D'après la littérature, les milieux oreux nécessitent de faibles vitesses de balayage. Différentes vitesses ont été choisies sans dépasser 20 mV/s et démarrant de 5 mV/s, puis 10mV/s et 15 mV/s. Comme

c'est illustré dans la figure 32, les résultats obtenus ont démontré que la vitesse la plus adéquate est 5mV/s.



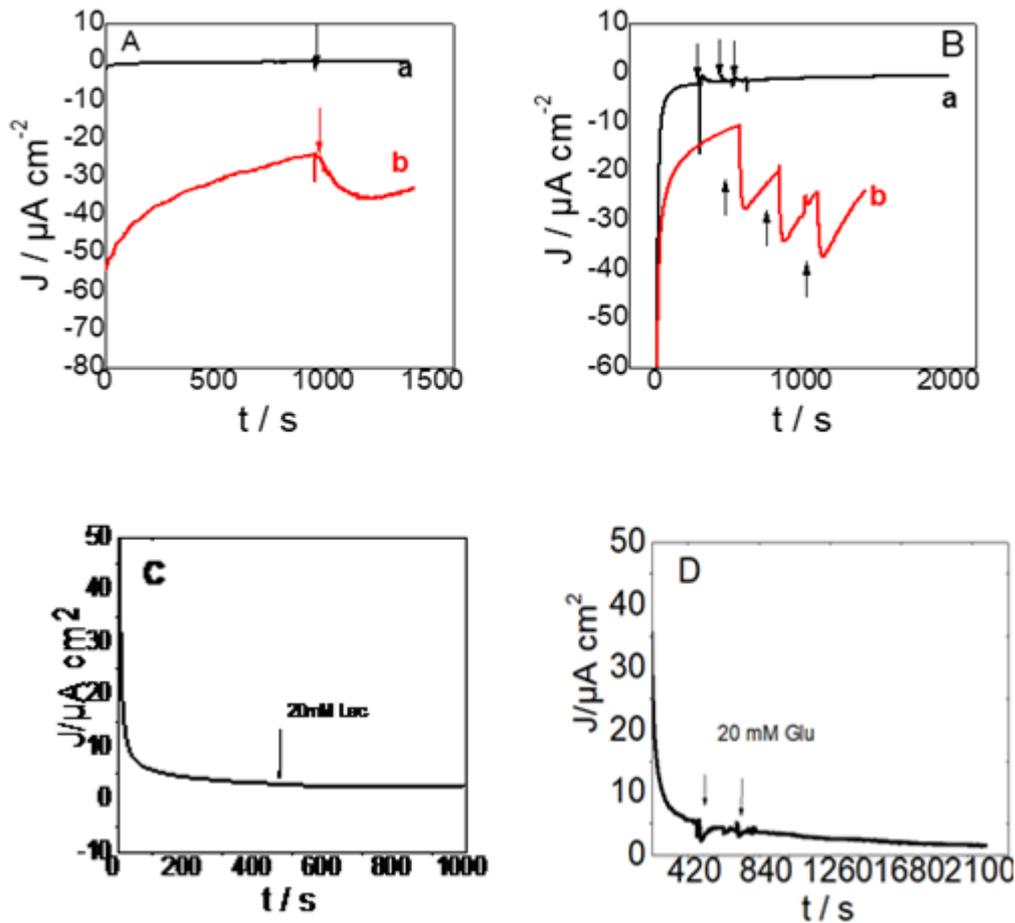
**Figure 34:** Profil des vitesses de balayage (scan rate) appliqué sur biocomposite

Portant *T. denitrificans* en présence de 10mM de nitrate sur un intervalle de +0,4 vs Ag/AgCl V et -0.8 vs Ag/AgCl V.

## II.2. Chronoampérométrie

La chronoampérométrie a révélé une activité électrochimique catalytique de type cathodique chez deux espèces bactériennes testées, *Shewanella oneidensis* et *Thiobacillus denitrificans* ; ainsi que l'absence totale d'une catalyse électrochimique chez les deux autres espèces *Escherichia coli* et *Pseudomonas fluorescens*. Les résultats obtenus ont montré une variation de la densité du courant au moment de l'addition du nitrate, ou du nitrite, ou bien du fumarate à une concentration de 20 mM, chez *T. denitrificans* et *S. oneidensis* à un potentiel de -0.3 V (Figure 33). En ce qui concerne *P. fluorescens* et *E. coli*, aucune variabilité de la densité du courant n'a été observée en présence d'une concentration de 20 mM de glucose ou du lactose, à un potentiel de +0.2V (Figure 34). Le graphe 33A rapporte la mesure effectuée par chronoampérométrie à -0.46 V contre Ag/Ag Cl en l'absence et en présence de nitrate (20 mM). Lorsque l'expérience a été réalisée en l'absence de cellules

bactériennes (courbe a), aucune modification du courant n'a été observée, après ajout du nitrate. En présence de *T. denitrificans* au contraire, une réponse claire visible est enregistrée avec une augmentation d'environ  $1 \mu\text{A cm}^{-2}$  (courbe b). Par ailleurs, une expérience similaire a été réalisée avec du nitrite en appliquant un potentiel plus faible de  $-0,68 \text{ V}$  par rapport à Ag/Ag Cl à l'électrode biocomposite. Aucune réponse n'a été observée en l'absence de cellules bactériennes et une augmentation significative du courant a été observée lors d'ajouts successifs de  $20 \text{ mM}$  de nitrite (courbe a). Il est intéressant de noter que l'augmentation du courant était environ 10 fois plus importante avec le nitrite qu'avec le nitrate et environ  $10 \mu\text{A cm}^{-2}$  d'augmentation après chaque ajout de  $20 \text{ mM}$  de nitrite. Ces résultats nous ont permis d'explorer plus ces variations de densité électrique, et pour cela une série de mesures de CV ont été réalisés.



**Figure 35:** Chronoamperométrie de *T. denitrificans*, *S. oneidensis*, *E coli* et *P. fluorescens*.

A (a, b) et B (a, b) Réponse de *T. denitrificans* au nitrate et au nitrite respectivement sous un potentiel de  $-0.3V$  et un scan rate de  $5 mV/s$   $10^{-3}V$ ; A(a) et B(a) Courbe du témoin (le composite sans la bactérie) en présence du nitrate et nitrite. A(b) et B(b) Réponses du composite avec *T. denitrificans* en présence du nitrate et nitrite.

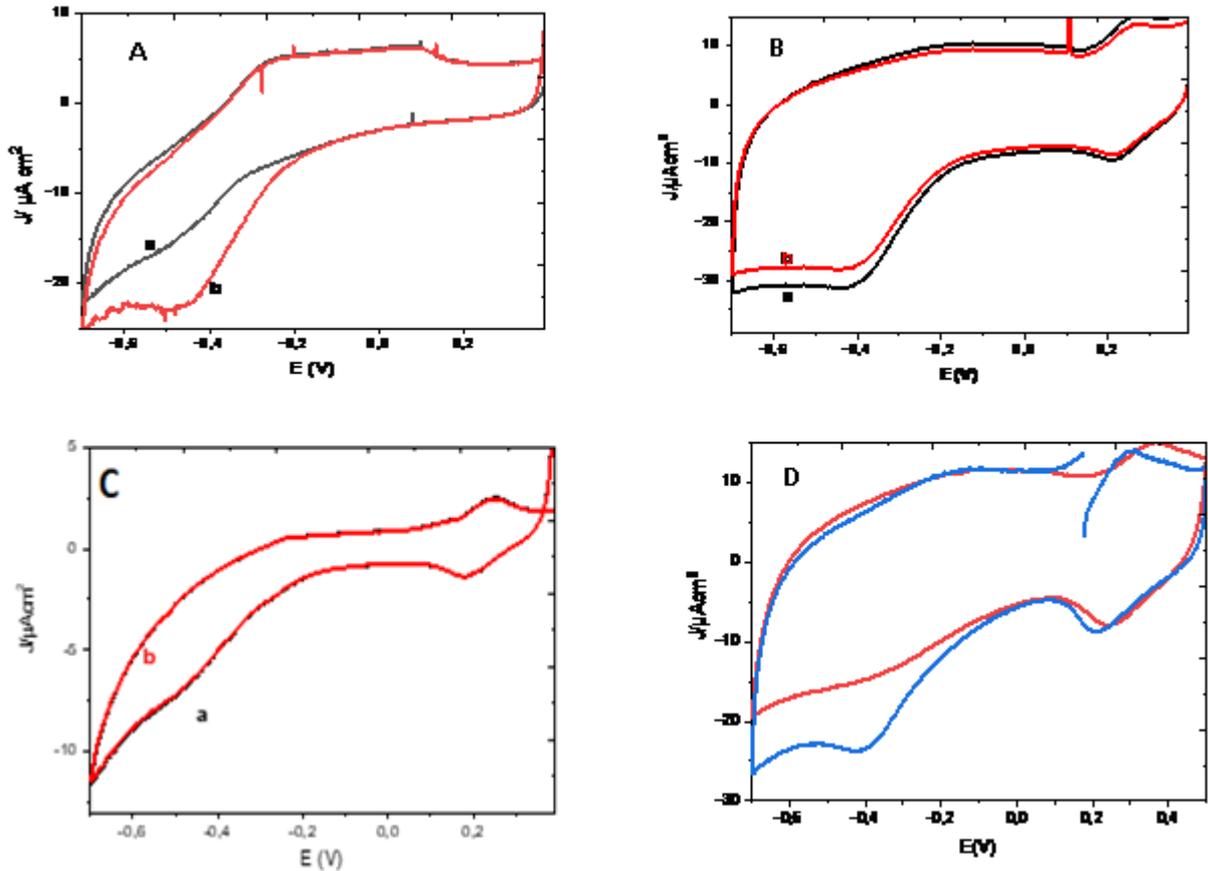
### II.3. Voltammétrie cyclique

Les résultats de la chronoampérométrie ont été confirmés par la voltammétrie cyclique et ont pu démontrer une activité électrochimique chez un groupe de micro-organismes utilisés et une absence totale chez l'autre groupe. Le signal électrochimique se manifeste par une augmentation de l'intensité de courant électrique qui est résulte d'un échange et un transfert extracellulaire d'électrons. L'augmentation du courant électrique vers les valeurs positives est un signal d'oxydation et donc un transfert des charges. Les

transferts étudiés sont les transferts cathodiques et les transferts anodiques comme est démontré dans les profils de voltammétrie cyclique avec une augmentation du courant en présence de 20mM de fumarate (Figure 36Ab). Cette augmentation dans les valeurs négatives, traduit une réduction du fumarate à la cathode. La courbe (Aa) témoigne de l'implication du fumarate dans cette augmentation car en son absence aucune variation significative n'est enregistrée.

Les résultats en figure 36(B) obtenus avec *Pseudomonas fluorescens* en présence de 20mM de glucose ne révèlent aucune variation de la densité du courant oxydatif, bien que les résultats de la galerie Api20 confirment l'oxydation du glucose. Donc cette espèce bactérienne ne présente aucune activité électrochimique notable.

La figure 36C, représente l'absence d'une catalyse électrochimique chez *Escherichia coli* en présence de 20 mM de lactose et ceci s'explique par l'absence du cytochrome C qui permet le transfert extracellulaire d'électron. L'ajout d'un médiateur permettra ce transfert qui correspondrait un transfert extracellulaire indirect. Cependant, *Thiobacillus denitrificans* montre un transfert extracellulaire direct avec une réduction cathodique de 20 mM de nitrate et une augmentation notable de la densité du courant (Figure 36D).



**Figure 36:** Screening électrochimique des espèces bactériennes.

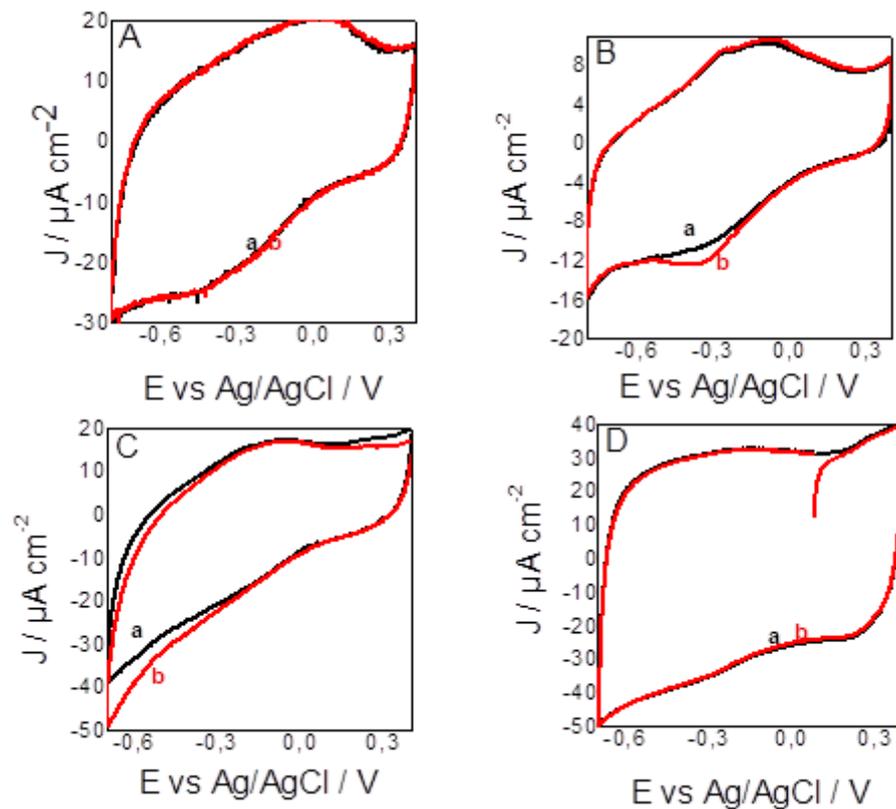
(A) *Shewanella oerdingensis* en absence(a) et en présence (b) de 50mM de fumarate, (B) *Pseudomonas fluorescens* en absence(a) et en présence (b) de 20mM de glucose, (C) Réponse d'*Escherichia coli* en absence (a) et en présence (b) de 20mM de Lactate. (D) Réponse de *Thiobacillus denitrificans* en absence (a) et en présence(b) de 20mM de nitrate. Potentiel +0.3V à -0.8V et +0.4 à -0,8 V respectivement avec un scan rate 5mV/s et un pas de  $10^{-3}$ V.

### III. Influence des facteurs âge et température sur la réponse cathodique

#### III.1. Influences de l'âge de la bactérie sur la réponse cathodique

Les résultats obtenus lors des mesures cathodiques effectués sur des biocomposites en utilisant des bactéries issues de cultures de différents âges, ont confirmé que les signaux cathodiques enregistrés sont effectivement des signaux de réductions assurés par la membrane cellulaire externe de la bactérie et non pas des médiateurs ou des cytochromes.

Ces derniers étant relargués par la cellule abimée en conséquence de l'effet toxique des CNTs. Ainsi, la figure 37 indique clairement la disparition du signal de réduction des nitrates chez *T. denitrificans* en fonction de l'âge de la bactérie. Le composite dépourvu de bactéries sert de référence et de témoin pour les résultats suivant (Figure 37A) et une réduction des nitrates est notée en présence de bactéries issues d'une culture de 5 jours dans le composite (Figure 37B). Cependant, une diminution de ce signal voire sa disparition est obtenue dans le cas du composite en présence de bactéries de 10 jours (Figure 37C) et 15 jours (Figure 37D).



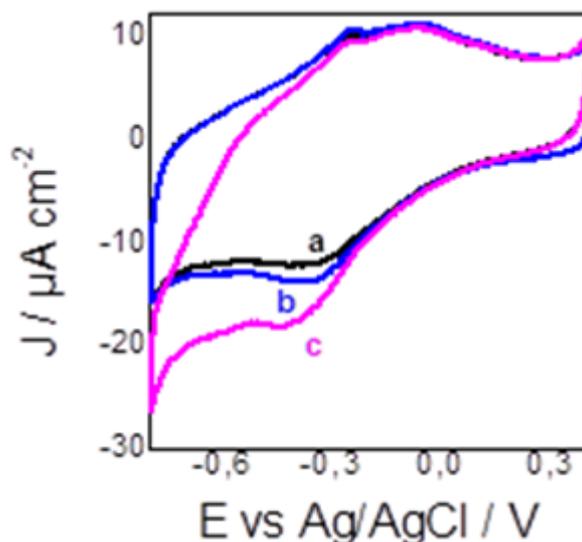
**Figure 37:** Evolution du signal cathodique du composite

*Témoin sans bactérie (A) et de *T. denitrificans* issu de cultures de 5 jours (B), 10 jours (C), 15 jours (D) et en présence de 20 mM de nitrate.*

### III.2. Influence de la température sur la réponse cathodique

A fin d'optimiser le rendement de la catalyse cathodique, l'influence de la température a été testée sur les réactions électrochimiques identifiées dans la section précédente. La figure 38(b) rapporte la réponse électrochimique de *T. denitrificans* dans le biocomposite à une concentration de 20 mM de nitrate et une température ambiante, (Daiyan et al.,2021), et qui est similaire à celle observée précédemment dans la Figure 38B. L'étape suivante a consisté à augmenter la température de la cellule électrochimique à 30°C. Dans ces conditions, le courant augmente significativement et le signal catalytique devient plus visible.

Le pic de potentiel a été déplacé vers une valeur légèrement plus élevée de -0,35 V à -0,43 V par rapport à Ag/AgCl, accompagné d'une augmentation de la densité du courant équivalent de 9 à 10 J/ $\mu\text{A cm}^2$  (Figure 36c). Cette relation entre l'augmentation du courant et la température pourrait être expliquée par le fait que les protéines membranaires de la bactérie sont plus actives à une température optimale de croissance. Etant donné que la bactérie a été privée de tous ses métabolites extracellulaires, nos résultats confirment que le transfert extracellulaire direct des électrons se fait exclusivement par les protéines membranaires, (Pink et al 2017).



**Figure 38** : Réponse voltampérométrique cyclique

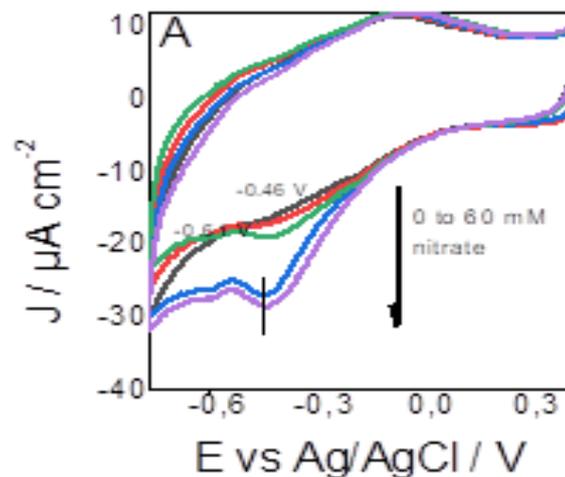
Mesurée avec des électrodes en feutre graphite modifiées avec biocomposite fait avec de la protamine, des MWCNT et de *Thiobacillus denitrificans*, (a) à température ambiante (21 °C) en l'absence de nitrate, (b) à température ambiante en présence de nitrate 20 mM et (c) à 30 °C en présence de 20 mM de nitrate. La vitesse de balayage du potentiel était de 5 mV s<sup>-1</sup>. Toutes les expériences ont été réalisées sous atmosphère d'azote.

#### IV. Réduction bio électrochimique des nitrates et des nitrites chez *Shewanella oneidensis* et *Thiobacillus denitrificans*

##### IV.1. Effet de la concentration du substrat nitrate sur la densité du courant avec *Thiobacillus denitrificans*

L'influence de la concentration de nitrate sur la réponse des biocomposites *Thiobacillus denitrificans* à 30 °C a été évaluée et illustrée par figure 39. L'ajout d'une quantité relativement faible de nitrate (10 à 20 mM) entraîne une légère augmentation limitée du courant à -0,46 V vs Ag/Ag Cl et un second signal légèrement peut être remarqué à -0,68 V vs Ag/Ag Cl (Figure 37c). En présence de 40 mM de nitrate, le courant à -0,46 V a augmenté de manière significative à 36 J/µAcm<sup>2</sup> et l'accentuation du second signal redox à -0,68 V est visible de -31 J/µAcm<sup>2</sup>; alors qu'une augmentation de la densité du courant a atteint 38 J/µAcm<sup>2</sup> à une concentration élevée de 60 mM et qui conduit à des signes de

saturation (Figure 37d). Le second signal avec un pic de  $-32 \text{ J}/\mu\text{Acm}^2$  est observé en utilisant une concentration de 40 mM et il est reproduit aussi à une concentration de 60 mM. Ces données nous permettent d'émettre une hypothèse selon laquelle le signal catalytique est dû à la réduction du nitrate. Cette hypothèse est appuyée par les résultats de la chronoampérométrie exposés dans le chapitre screening microbio-électrochimique qui démontre une catalyse du nitrite à  $-0,7 \text{ V vs Ag/Ag Cl}$ . Toutes les expériences ont été réalisées sous atmosphère d'azote. Courant catalytique à  $-0.46 \text{ V}$  en fonction de la concentration en nitrate. Le courant catalytique est estimé en soustrayant le courant mesuré en l'absence de nitrate.

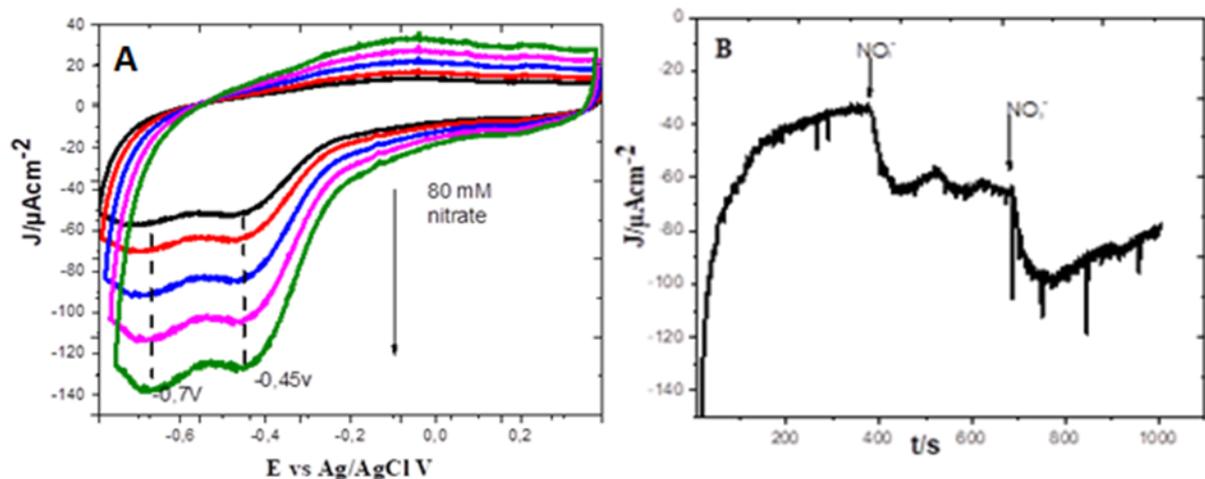


**Figure 39:** Réponse voltampérométrique cyclique

*Mesurée avec des électrodes en feutre de graphite modifiées avec un biocomposite fait de protamine, MWCNT et Thiobacillus denitrificans à 30 °C, en présence d'une quantité croissante de nitrate : 0, 10, 20, 40 et 60 mM. La vitesse de balayage du potentiel était de  $5 \text{ mV s}^{-1}$ .*

#### IV.2. Effet de la concentration du substrat nitrate et nitrite sur la densité du courant avec *Shewanella oneidensis* MR1

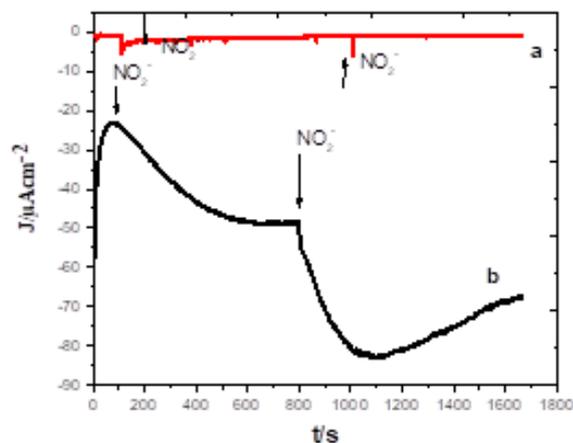
La même expérience citée précédemment a été reproduite sur un composite conçu avec *Shewanella oneidensis*. Les résultats obtenus ont montré une augmentation de la densité du courant de manière proportionnelle. L'absence de la limite de saturation à 60 et 80 mM de nitrate a été enregistrée avec *T. denitrificans* et la densité du courant a atteint  $-145 \text{ J}/\mu\text{Acm}^2$  qui est 10 fois plus de plus grande. Le pic de l'ordre à  $-0.68\text{V}$  observé dans le cas de *T. denitrificans*, est aussi présent chez MR1 avec un pic de  $-150 \text{ J}/\mu\text{Acm}^2$  (Figure 40A). La série de mesures de la voltammétrie cyclique est appuyée par les mesures de la chronoampérométrie et qui montre clairement l'augmentation de la densité du courant négative à chaque fois qu'une concentration importante de substrat est ajoutée (Figure 40B).



**Figure 38:** Réponse voltampérométrique cyclique

(A) mesurée avec des électrodes en feutre de graphite modifiées avec un biocomposite fait de protamine, MWCNT et *Shewanella oneidensis* à  $30^\circ\text{C}$ , en présence d'une quantité croissante de nitrate : 0, 10, 20, 40, 60 et 80 mM sous atmosphère d'azote. La vitesse de balayage du potentiel était de  $5 \text{ mV s}^{-1}$ . Courant catalytique à  $-0.46 \text{ V}$  en fonction de la concentration en nitrate. (B) Réponse de la chronoampérométrie appliquée à  $-0.7 \text{ vs Ag/AgCl V}$  avec une vitesse de  $5 \text{ mVs}^{-1}$  en présence de 20mM et 40mM de nitrate.

Afin de vérifier l'exactitude de l'hypothèse évoquée précédemment, concernant le pic observé aux alentours de  $-0.68\text{V}$  vs Ag/Ag Cl, nous avons réalisé des mesures de chronoampérométrie à un potentiel de  $-0.7\text{V}$  vs Ag/Ag Cl V en ajoutant 20 Mm et 40Mm de nitrite (Figure 41a, b). Les densités de courants obtenus sont en adéquations avec les résultats de la CV aux mêmes concentrations. Une augmentation de  $30\text{ J}/\mu\text{A cm}^2$  est obtenue à chaque 20 Mm de nitrite rajoutée, ce qui correspond à  $50\text{ J}/\mu\text{A cm}^2$  et  $80\text{ J}/\mu\text{A cm}^2$  comme la montre clairement la (Figure 41b) en comparaison avec la courbe (a) est obtenue avec biocomposite portant *E. coli* utilisé comme témoin. Ces résultats confirment l'hypothèse la réduction simultanée des nitrites résultants.

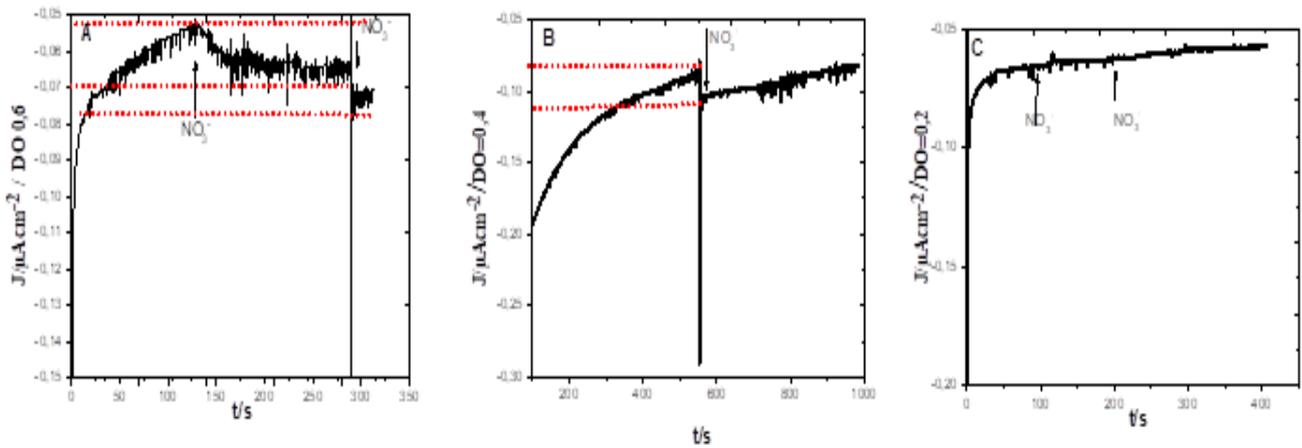


**Figure 391:** Réponse de la Chronoamperométrie appliquée sur un biocomposite

Avec, *E. coli* utilisé comme témoin (courbe a) et du biocomposite avec *T. denitrificans* (courbe b) en présence de 20 40 mM de nitrite, sous un potentiel de  $-0.7\text{V}$  vs Ag/Ag Cl V et un scan reat de  $5\text{ mV/s}$   $10^{-3}\text{V}$ ,

### IV.3. Effet de la concentration bactérienne sur la densité du courant

Les résultats de la chronoamperométrie obtenus avec des biocomposites contenant différentes concentrations de MR, démontrent une relation proportionnelle entre la concentration de la bactérie et l'augmentation de la densité du courant. Ainsi, une augmentation de  $0.15$  et  $0.02\text{ J}/\mu\text{A cm}^2$  est enregistrée respectivement à partir d'une DO de  $0.4$  et  $0.6$ . Cependant, elle disparaît à une DO de  $0.2$  (Figure 42).



**Figure 40:** Effet de la concentration de MR1 dans le biocomposite sur la densité du courant  
IV.4 La courbe de calibration

Les résultats obtenus lors de la catalyse cathodique de dénitrification avec *T. denitrificans* et *S. oneidensis*, ont permis d'établir deux courbes de calibration qui permettront de suivre l'augmentation de la densité du courant en fonction de la concentration des nitrates administrée.

La courbe de calibration représentée dans la Figure 41 donne une relation linéaire entre les différentes concentrations de  $\text{NO}_3^-$  (10-80 mM) et la densité de courant (valeurs absolues), dans le cas de MR1, D. Hao, (2021). L'équation était  $J/\mu\text{Acm}^{-2} = 0.4 C + 15.2$  avec un coefficient de corrélation de 0.94. Ce résultat montre une augmentation du signal de réduction avec une augmentation graduelle de la concentration de  $\text{NO}_3^-$ . La sensibilité de la méthode proposée a été évaluée en utilisant à la fois la limite de détection (LOD) et la limite de quantification (LOQ) qui ont été calculées selon la formule suivante, (Fekry. (2017):

$$\text{LOD} = 3s/b, \text{LOQ} = 10s/b.$$

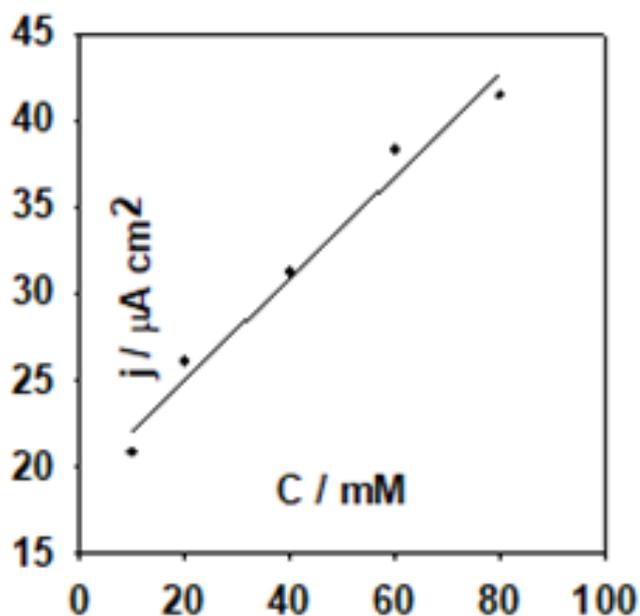
Avec **s** comme écart-type du courant de pic de réduction (trois passages) et **b** comme pente (mA/M) des courbes d'étalonnage correspondantes.

Leurs valeurs sont respectivement de 2.81 et 9.38  $\mu\text{M}$ . A partir de ces données, nous pouvons voir qu'il y a une bonne limite de détection

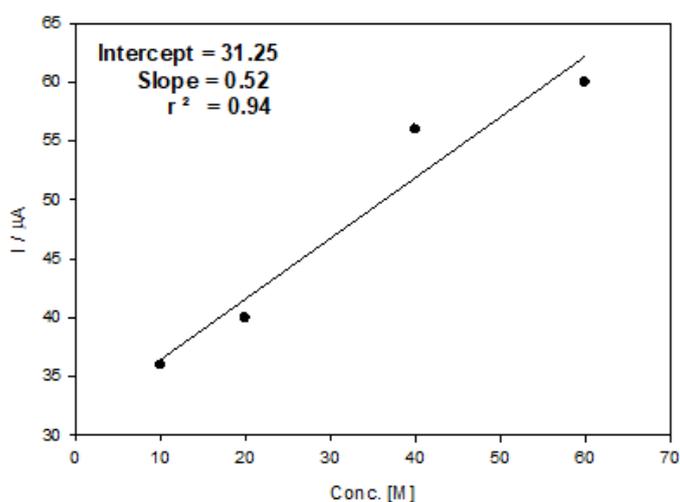
Dans le cas de *T. denitrificans*, la courbe obtenue est similaire à celle de MR1 mais avec des limites de détections sont différents (Figure42). Une relation linéaire existe entre les différentes concentrations de  $\text{NO}_3^-$  (10-60 mM) et le courant. L'équation linéaire est :  $I_p(\mu\text{A}) = 0,52 C + 31,25$  avec un coefficient de corrélation de 0,94. Cela signifie que le courant de réduction à l'état d'équilibre augmente avec l'augmentation progressive de la concentration de  $\text{NO}_3^-$ . La sensibilité de la méthode proposée a été évaluée en utilisant les valeurs de la limite de détection (LOD) et de la limite de quantification (LOQ). La LOD et la LOQ. L'écart-type du courant du pic de réduction (trois passages) et **b** est la pente (mA/M) des courbes d'étalonnage correspondantes ; elles ont été trouvées à 6,3 et 21  $\mu\text{M}$ , respectivement.

Il s'agit d'une bonne limite de détection, donc nous pouvons utiliser ce système comme un capteur pour connaître le courant correspondant à toute concentration de nitrate, (Fekry. 2015).

**IV.4. Courbe de calibration de la détection du  $\text{NO}_3^-$  par le composite de *Shewanella oneidensis* MR1 et *T. denitrificans***



**Figure 413:** Courbe de calibration de la détection du  $\text{NO}_3^-$  par le composite de *Shewanella oneidensis* MR1.

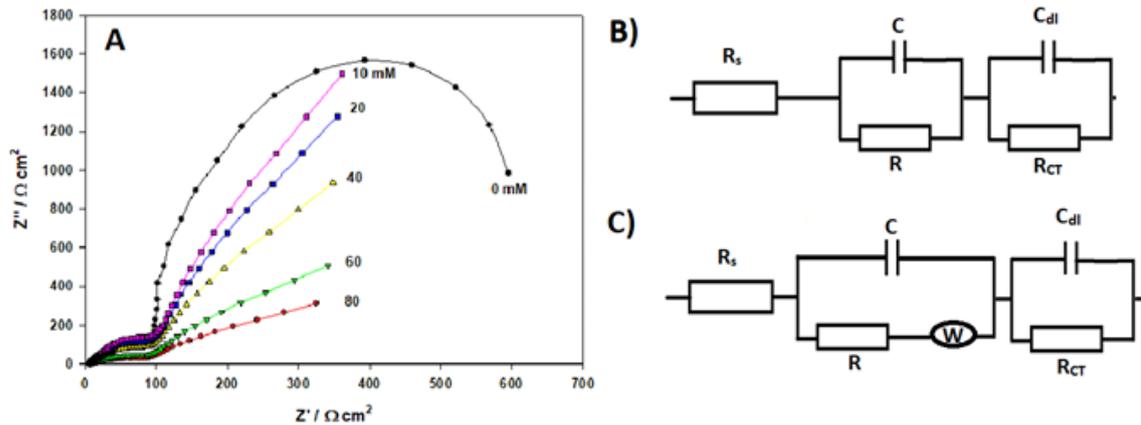


**Figure 424 :** Courbe de calibration de la détection de  $\text{NO}_3^-$  par le composite *T. denitrificans*.

#### IV.5. Mesures par spectroscopie d'impédance électrochimique

Les résultats de la voltammétrie cyclique ont été confirmés par la spectroscopie EIS. Des études de spectroscopie d'impédance électrochimique ont été réalisées au moyen d'une électrode biocomposite avec et sans *Shewanella oneidensis* en présence de différentes concentrations de nitrate de 0, 10, 20, 40, 60 et 80 mM. Les données sont exprimées en termes de tracés de Nyquist (Figure 45A) et montrent un diamètre d'arc plus grand dans le tracé de Nyquist pour l'électrode nue que pour celle avec *Shewanella oneidensis*. De plus, le diamètre de l'arc diminue avec l'augmentation de la concentration en nitrate. Cela signifie que la conductivité la plus faible est pour l'électrode nue et que la conductivité la plus élevée est pour l'électrode de *Shewanella oneidensis* avec une concentration de nitrate de 80 mM, ce qui est en accord avec les résultats. CV J. (Ampurdanés et al., 2021). Les résultats d'impédance pour le nu ont été ajustés à un modèle à deux constantes de temps (Figure 45B) et comprenant une combinaison parallèle de la capacité de l'électrode Cdl et de la résistance de transfert de charge RCT en série avec une combinaison parallèle de RC pour la résistance et la capacité de la couche externe et en série avec une résistance de solution Rs. La diffusion du biocomposite avec différentes concentrations de nitrate de 0, 10, 20, 40, 60 et 80 mM, est établie avec la diffusion de Warburg. Il est clair d'après les graphiques que le nu ne contient que deux demi-cercles en raison du transfert de charge uniquement. Cependant, les autres électrodes testées avec différentes concentrations de nitrate contiennent un demi-cercle et une ligne liée à la fois au transfert de charge et au processus de diffusion Warburg

(Figure 45C), (Tang et al., 2021). Ainsi, une impédance de Warburg est ajoutée au modèle pour indiquer le processus de diffusion.



**Figure 43:** Graphiques de Nyquist pour le composite

*Avec et sans bactéries (A), utilisant le modèle d'ajustement de deux constantes de temps (B) et de diffusion de Warburg (C).*

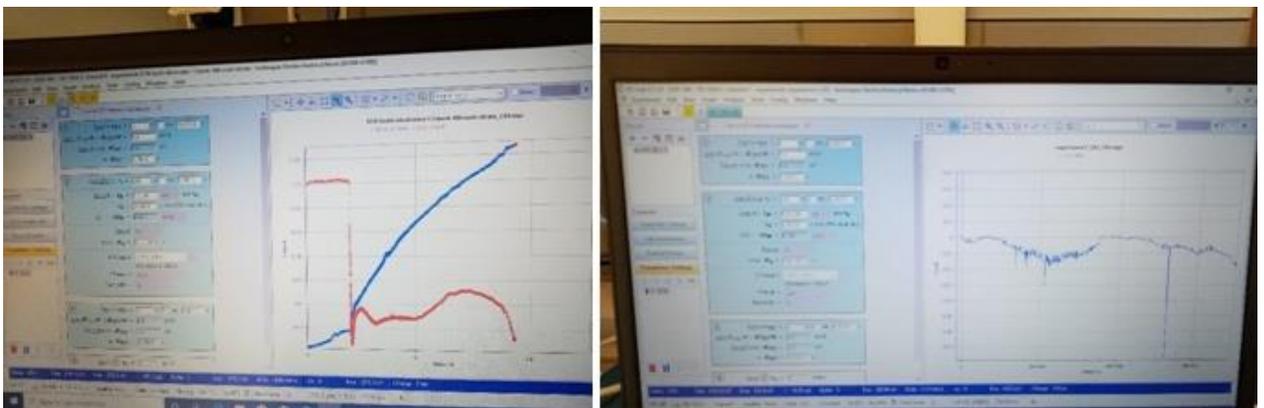
## V. L'électrolyseur pilote 500mL et production du Biohydrogène.

Le processus consiste à l'oxydation de la matière organique à l'anode et la réduction du biohydrogène à la cathode, cela n'est possible que grâce au développement sur l'anode d'un biofilm microbien électroactif qui joue le rôle d'électro-catalyseur. Par rapport aux procédés courants d'électrolyse de l'eau, une MEC fonctionne sous des tensions 5 à 10 fois plus faibles, divisant d'autant le coût en énergie de l'hydrogène produit. En outre, les procédés « classiques » de production de biohydrogène par voie fermentaire en cultures mixtes convertissent des sucres (saccharose, glucose) avec des rendements limités à 2-3 moles d'hydrogène par mole d'hexose tout en coproduisant des acides organiques (acide acétique ou butyrique principalement). Alimenté par de l'acétate, une MEC produit au maximum 3 moles d'hydrogène /mole d'acétate. Le couplage de la fermentation à un

procédé d'électrolyse microbienne pourrait donc produire de 8 à 9 moles d'hydrogène/mole d'hexose, soit un grand pas vers la limite théorique de 12 moles d'hydrogène/mole d'hexose.

La faisabilité de la fermentation en conditions salines (3-75 gNaCl/L) a été démontrée en lien avec l'inhibition de la consommation de l'hydrogène produit et une forte prédominance d'une nouvelle souche de Vibrionaceae à des concentrations en sel supérieures à 58 gNaCl/L. D'autre part, la mise en œuvre de biofilms électroactifs dans des conditions compatibles avec la fermentation sombre (pH 5.5 à 7 et alimenté avec différents acides organiques). (Pierra, 2013).

Après le lancement des expériences, nous étions contraints d'arrêter la manipulation et l'acquisition des données après juste une semaine du lancement des travaux à cause des restrictions sanitaire et la fermeture du laboratoire une seconde fois. Nous vous exposons les photos des enregistrements sans pouvoir traiter suffisamment de données pour conclure des hypothèses ou tirer des conclusions (Figure 46).



**Figure 44** : Début de l'acquisition des données de l'électrolyseur microbien pilote 500mL.

## Conclusion

Ce travail a démontré pour la première fois les caractéristiques EET de la biocathode dénitrifiante. Un biofilm artificiel dans lequel *Thiobacillus denitrificans* était dépourvu de tous les métabolites agissant comme médiateurs d'électrons et dans un composite hostile. Il a été utilisé avec succès pour étudier la thermodynamique de l'EET ainsi que l'analyse CV d'une biocathode dénitrifiante qui a montré que la réduction du nitrate en nitrites se produit à -0,46 V et la réduction des nitrites à -0,68 V. Les résultats présentés permettent de mieux comprendre les principes de l'EET des cathodes dénitrifiantes à base de *Thiobacillus denitrificans*. L'ingénierie utilisée dans la préparation du biofilm artificiel peut aider à mettre en œuvre l'exploitation des systèmes bioélectrochimiques dénitrifiants, par exemple le taux d'élimination des nitrates en fonction du potentiel de la cathode. De plus, la stratégie d'utilisation de ces biofilms artificiels a permis de répondre aux questions liées à l'effet de la température sur le transfert extracellulaire et l'activité de dénitrification de *Thiobacillus denitrificans* qui a donné une meilleure augmentation du courant à 30 °C que celle à la température ambiante qui était de 21 °C. La question posée par Pous *et al.* en 2015, sur la relation proportionnelle entre la concentration de nitrate et l'augmentation du courant des microcosmes exploités ici pourrait être plus appropriée, par exemple étudier la génération d'autres espèces d'azote réduit comme NO<sub>2</sub> et les hétérogénéités dans les électrodes près établie en utilisant les réactions microbiennes d'électrode, (Wu, 2021).

L'augmentation du courant aux valeurs de plus en plus négatives est apparue seulement pendant l'addition du nitrite dans la solution. Ceci peut être expliqué par la réduction simultanée du nitrite et du dégagement d'hydrogène. La question se pose de savoir d'où vient l'hydrogène, deux hypothèses peuvent être envisagées ; tout d'abord en utilisant le NADH comme donneur d'électron pour réduire le nitrite en ammonium, mais en ne générant aucun gradient énergétique de protons, ou bien on peut suggérer l'existence d'un transporteur

sympoteur  $\text{NO}_2^- / \text{H}^+$  similaire à NarK1 le sympoteur  $\text{NO}_3^- / \text{H}^+$  connu chez certaines bactéries.

Cette partie des travaux de thèse a aboutie sur une publication au prestigieux journal américain, Journal of Electrochemical Society.

L'étude des caractéristiques EET de la biocathode dénitrifiante composé de *Shewanella oneidensis*, dépourvu de tous les métabolites, assemblé avec CNTMW-COOH et protamine, utilisé comme une biocathode, a été utilisée avec succès pour étudier la thermodynamique de l'EET chez les bactéries une seconde fois. La voltammétrie cyclique et l'analyse chronoampérométrique ont défini chez *Shewanella oneidensis* les potentiels de réduction du nitrate en nitrite qui se produisent à  $-0,45 \text{ V}$  pour le nitrate et à  $-0,7 \text{ V}$  pour nitrite. Ces résultats ont été confirmés en utilisant une autre biocathode fabriquée avec *E coli* comme contrôle qui n'a pas montré d'augmentation de courant. Les résultats présentés permettent de mieux comprendre les principes de l'EET des cathodes dénitrifiantes à base de *Shewanella oneidensis*. Une courbe d'étalonnage mettant en relation la concentration de nitrates à éliminer et le courant catalytique a été réalisée chez MR1 et *T. denitrificans*. Dans la même optique, nous avons réussi à établir une réponse proportionnelle directe entre la concentration de bactéries situées dans le biofilm et le courant catalytique en présence de nitrates et une limite de détection a été enregistrée à la concentration de  $0,88 \times 10^8$  cellules/ml. Les résultats de la spectroscopie d'impédance renforcent nos interprétations et montrent clairement l'existence d'un transfert de charge dans le biofilm en contact avec les nitrates avec une relation inversement proportionnelle entre l'augmentation du courant et la diminution de la résistance. Les résultats de cette partie feront l'objet de publications ultérieures.

## **Perspectives**

Le prochain défi que nous nous fixons est le développement d'une application à grande échelle pour le traitement des eaux de surface et des déchets industriels. Le défi des travaux futurs est d'affirmer ou de nier l'existence du transporteur symporteur  $\text{NO}_2^- / \text{H}^+$  et d'appliquer cette voie à la production d'hydrogène comme vecteur énergétique dans les piles à combustible et les batteries.

## **Références bibliographiques**

## Références

### A

A, Damien. Guide de traitement des déchets : Réglementation et choix des procédés 6<sup>ème</sup> édition. Edition Dunod. Paris France, pp 461. 2013.

A.E. Franks ; K.P. Nevin. Microbial Fuel Cells, A Current Review. *Energies* 2010, 3(5), 899-919; <https://doi.org/10.3390/en3050899>

A. Scotti, W. Liu, J.S. Hyatt, E.S. Herman, H.S. Choi, J.W. Kim, et al., The CONTIN algorithm and its application to determine the size distribution of microgel suspensions, *Journal Chemical. Physic.* 142 (2015) 234905, <http://dx.doi.org/10.1063/1.4921686>.

A.A. Shvedova, E.R. Kisin, R. Mercer, A.R. Murray, V.J. Johnson, A.I. Potapovich, et al., Unusual inflammatory and fibrogenic pulmonary responses to single-walled carbon nanotubes in mice, *American Journal Physiology Lung Cell. Mol. Physiol.* 289 (2005) L698–708, <http://dx.doi.org/10.1152/ajplung.00084.2005> .

A.M. Fekry, S.M. Azab, M. Shehata, M.A. Ameer Novel electrochemical nicotine biosensor based on cerium nanoparticles with anionic surfactant, *RSC Advances*, (2015) 5, 51662-51671. <https://doi.org/10.1039/C5RA06024A>

A.M. Fekry. A new simple electrochemical Moxifloxacin Hydrochlorides sensor built on carbon paste modified with silver nanoparticles, *Biosensors and Bioelectronics*, (2017) 87, 1065-1070. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2016.07.077>

A.Y. Chen, C. Zhong, T.K. Lu, Engineering living functional materials, *ACS Synthetic Biology*. 4 (2015) 8–11, <http://dx.doi.org/10.1021/sb500113b>

A.Y. Chen, Z. Deng, A.N. Billings, U.O.S. Seker, M.Y. Lu, R.J. Citorik, et al., Synthesis and patterning of tunable multi scale materials with engineered cells, *Nature. Mater.* 13 (2014) 515–523, <http://dx.doi.org/10.1038/nmat3912>

AD. Goddard, JWB. Moir, DJ. Richardson & SJ. Ferguson Inter dependence of two NarK domains in a fused nitrate/nitrite transporter. *Molecular microbiology* (2008) 70(3):667-681. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06436.x>

### B

B.E. Logan, K. Rabaey, Conversion of waste into bioelectricity and chemicals by using microbial electrochemical technologies, *Science* 337 (2012) 686–690 <http://dx.doi.org/10.1126/science.1217412>

B.E. Logan *Microbial Fuel Cells*, John Wiley & Sons, New York (2008).

### C

C. Pfeffer, S. Larsen, J. Song, M. Dong, F. Besenbacher, R.L. Meyer, et al., Filamentous bacteria transport electrons over centimetre distances, *Nature* (2012) 10–13. <http://dx.doi.org/10.1038/nature.11586>

C. Tang, Y. Zheng, M. Jaroniec, S. Z. Qiao. Electrocatalytic Refinery for Sustainable Production of Fuels and Chemicals. *Angewandte Chemie International Edition* 2021, <https://doi.org/10.1002/anie.202101522>

## D

D. Call & B. Logan. Hydrogen Production in a Single Chamber Microbial Electrolysis Cell Lacking a Membrane. *Environ Sci Technol.* 2008 May 1;42 (9):3401-6. <http://dx.doi.org/10.1021/es8001822>

D. G. Weissbrodt, T. R. Neu, U. Kuhlicke, Y. Rappaz, & C. Holliger, (2013). Assessment of bacterial and structural dynamics in aerobic granular biofilms. *Frontiers in Microbiology*, 4, 175. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00175>

D. Hao, Z. Chen, M. Figiela, I. Stepniak, W. Wei, B. Jie Ni. Emerging alternative for artificial ammoniasynthesis through catalytic nitrate reduction. *Journal of Materials Science & Technology* 2021, 77, 163-168. <https://doi.org/10.1016/j.jmst.2020.10.056>

D.R. Bond, D.E. Holmes, L.M. Tender, D.R. Lovley, Electrode-reducing microorganisms that harvest energy from marine sediments, *Science* 80 (295) (2002) 483–485, <http://dx.doi.org/10.1126/science.1066771>.

D.R. Lovley, K.P. Nevin, Electrobiocommodities : powering microbial production of fuels and commodity chemicals from carbon dioxide with electricity, *Curr. Opin. Biotechnol.* 24 (2013) 385–390, <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2013.02.012>

D.R., Lovley, Electricity production by *Geobacter sulfurreducens* attached to electrodes. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 1548–1555. 2003. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.3.1548-1555>.

D.R., Lovley. *Electromicrobiology. Annual Review of Microbiology.* 2012 66, 391–409.

## E

E. Dague, J. Duval, F. Jorand, F. Thomas, F. Gaboriaud, Probing surface structures of *Shewanella* spp. By micro electrophoresis, *Biophysical Journal.* 90 (2006) 2612–2621, <http://dx.doi.org/10.1529/biophysj.105.068205> .

## F

F. Harnisch, S. Freguia, A basic tutorial on cyclic voltammetry for the investigation of electroactive microbial biofilms, *Chem. Asian. J.* 7 (2012) 466–475, <http://dx.doi.org/10.1002/asia.201100740>.

F. Lei, W. Xu, J. Yu, K. Li, J. Xie, P. Hao, Guanwei Cui, BoTang. Electrochemical synthesis of ammonia by nitrate reduction on indium incorporated in sulfur doped graphene. *Chemical Engineering journal* 2021, 5, 131317. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.131317>

## G

G. Reguera, K.D. McCarthy, T. Mehta, J.S. Nicoll, M.T. Tuominen, D.R. Lovley, Extracellular electron transfer via microbial nanowires, *Nature* 435 (2005) 1098–1101, <http://dx.doi.org/10.1038/nature03661>

G. Walter Zumft, H. Körner, Respiratory Nitric Oxide Reductases, NorB and NorZ, of the Heme–Copper Oxidase Type, *The Smallest Biomolecules : Diatomics and their Interactions with Heme Proteins* Chapter 13, 2008, Pages 327-353

## H

H. Niu, Z. Zhang, X. Wang, X. Wan, C. Shao, Y. Guo. Theoretical Insights into the Mechanism of Selective Nitrate to Ammonia Electroreduction on Single Atom Catalysts. *Advanced Functional Materials* 2021, 31 (11), 2008533. <https://doi.org/10.1002/adfm.202008533>

H. Omid, A. Sathasivan, Optimal temperature for microbes in an acetate-fed microbial electrolysis cell (MEC), *Int. Biodeter. Biodegr.* 85 (213) 688–692.

H. Wang, J. Park, Z.J. Ren, Practical energy harvesting for microbial fuel cells : a review, *Environmental science & technology.* (2015), <http://dx.doi.org/10.1021/es5047765>

H.J. Kim, H.S. Park, M.S. Hyun, I.S. Chang, M. Kim, B.H. Kim, A mediator-less microbial fuel cell using a metal reducing bacterium, *Shewanella putrefaciens*, *Enzyme Microbial. Technol.* 30 (2002) 145–152, [http://dx.doi.org/10.1016/S0141-0229\(01\)00478-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0141-0229(01)00478-1).

H.R. Luckarift, S.R. Sizemore, J. Roy, C. Lau, G. Gupta, P. Atanassov, et al., Standardized microbial fuel cell anodes of silica-immobilized *Shewanella oneidensis*, *Chemical Commun.* 46 (2010) 6048–6050, <http://dx.doi.org/10.1039/c0cc01255f>.

## I

I. Katsounaros. On the assessment of electrocatalysts for nitrate reduction. *Current Opinion in Electrochemistry* 2021, 28, 100721. <https://doi.org/10.1016/j.coelec.2021.100721>

I. Willner, M. Lion-Dagan, S. Marx-Tibbon, E. Katz, Bioelectrocatalyzed amperometric transduction of recorded optical signal using mono layer-modified Au-electrodes, *J. Am. Chem. Soc.* 117 (1995) 6581–6592, <http://dx.doi.org/10.1021/ja00129a023>.

IRD, L'Institut de recherche pour le développement 2021. Laboratoire mixte international (LMI) BIOTEC H2 : production de biohydrogène par des procédés biotechnologiques. <https://www.ird.fr/biotec-h2-production-de-biohydrogene-par-des-procedes-biotechnologiques>

## J

J. Ampurdanés, S. Bunea, A. Urakawa. PEM Electrolysis Assisted Catalysis Combined with Photo catalytic Oxidation towards Complete Abatement of Nitrogen Containing

Contaminants in Water. *ChemSusChem* journal. 2021, 14 (6), 1534–1544. <https://doi.org/10.1002/cssc.202002828>

J. A. Z. Zeledón, G. A. Kamat, G. T. K. Kalhara, J. K. Nørskov, M. Burke S. Thomas, F. Jaramillo. The Effects of Acid Electrolyte Anions on Electrocatalyst Activity and Selectivity for the Oxygen Reduction Reaction. *ChemElectroChem* 2021, 8 (13), 2467–2478. <https://doi.org/10.1002/celec.202100500>

J. Choi, D. Hoang-Long, C.K. Nguyen, H. R. Bryan Suryanto, Alexandr N. Simonov, Douglas R. MacFarlane. Electroreduction of Nitrates, Nitrites, and Gaseous Nitrogen Oxides : A Potential Source of Ammonia in Dinitrogen Reduction Studies. *ACS Energy Letters* 2020, 5 (6), 2095–2097. <https://doi.org/10.1021/acseenergylett.0c00924>

J. Li, G. Zhan, J. Yang, F. Quan, C. Mao, Y. Liu, B. Wang, F. Lei, L. Li, A. W. M. Chan, Liangpang Xu, Yanbiao Shi, Yi Du, Weichanghao, Po Keung Wong, Jianfang Wang, Shi-Xue Dou, Lizhi Zhang, Jimmy C. Yu. Efficient Ammonia Electrosynthesis from Nitrate on Strained Ruthenium Nanoclusters. *Journal of the American Chemical Society* 2020, 142 (15), 7036–7046. <https://doi.org/10.1021/jacs.0c00418>

J. Wang, T. Feng, J. Chen, V. Ramalingam, Z. Li, D.M. Kabtamu. Electrocatalytic nitrate/nitrite reduction to ammonia synthesis using metal nanocatalysts and bio-inspired metalloenzymes. *NanoEnergy* 2021, 86, 106088. <https://doi.org/10.1016/j.nanoen.2021.106088>

J., Bartlett, L., Gakhar, J., Penterman, P. Singh, R. K. Mallampalli, E. Porter, , & McCray, P. B. PLUNC: a multifunctional surfactant of the airways. *Biochemical Society Transactions*, 39, 1012–1016. (2011). <http://doi:10.1042/BST0391012>

JA. Cole. The rapid accumulation of large quantities of ammonia during nitrite reduction by *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*, Volume 4, Issue 6, December 1978, Pages 327–329, <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1978.tb02891.x>

## K

K. Fricke, F. Harnisch, U. Schröder, On the use of cyclic voltammetry for the study of anodic electron transfer in microbial fuel cells, *Energy Environmental Science*. 1 (2008) 144–147, <http://dx.doi.org/10.1039/b802363h> .

K. M. Thormann., R. M. Saville, S. Shukla , , D. A. Pelletier., & A. M. Spormann, (2004). Initial phases of biofilm formation in *Shewanella oneidensis* MR-1. *Journal of Bacteriology*, 186(23), 8096–8104. <http://doi:10.1128/JB.186.23.8096-8104.2004> .

K.B. Gregory, D.R. Bond, D.R. Lovley, Graphite electrodes as electron donors for anaerobic respiration, *Environmental Microbiol.* 6 (2004) 596–604, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00593.x> .

K.J.M. Bishop, C.E. Wilmer, S. Soh, B.A. Grzybowski, Nanoscale forces and their uses in self-assembly, *Small* 5 (2009) 1600–1630, <http://dx.doi.org/10.1002/smll.200900358> .

K.J.M. Bishop, C.E. Wilmer, S. Soh, B.A. Grzybowski, Nanoscale forces and their uses in self-assembly, *Small* 5 (2009) 1600–1630. <http://dx.doi.org/10.1002/smll.200900358> .

K.L. Straub, M. Benz, B. Schink, F. Widdel, Anaerobic, nitrate-dependent microbial oxidation of ferrous iron, *Applied Environmental Microbiology*. 62 (1996) 1458–1460. <https://doi.org/10.1128/aem.62.4.1458-1460.1996>

## L

L. Peng, S.-J. You, J.-Y. Wang, Carbon nanotubes as electrode modifier promoting direct electron transfer from *Shewanella oneidensis*, *Biosens. Bioelectron.* 25 (2010) 1248–1251, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2009.10.002> .

L.Wang<sup>1</sup>, S. Trujillo, H. Liu. Selective inhibition of methanogenesis by acetylene in single chamber microbial electrolysis cells *Bioresource Technology* issue 274 (2019) 557–560. <http://10.1016/j.biortech.2018.12.039>

Lu L, Xing D, Xie T, Ren N, Logan BE. Hydrogen production from proteins via electrohydrogenesis in microbial electrolysis cells. *Biosens Bioelectron* 2010; pages 25:2690-5. <http://10.1016/j.bios.2010.05.003>

## M

M. Chen, J. Bi, X. Huang, T. Wang, Z. Wang. Bi<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanosheets arrays in-situ decorated on carbon cloth for efficient electrochemical reduction of nitrate. *Chemosphere* 2021, 278, 130386. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130386> .

M. Monachona, M. Albelda-Berenguera, E. Joseph Biological oxidation of iron sulfides. *Advances in Applied Microbiology* Volume 107, Chapter One-Pages 1-27, 2019, <http://10.1016/bs.aambs.2018.12.002>

M. Okada, N.I. Smith, A.F. Palonpon, H. Endo, S. Kawata, M. Sodeoka, et al., Label-free Raman observation of cytochrome c dynamics during apoptosis, *Proceedings of the National Academy of Sciences. U. S. A.* 109 (2012) 28–32, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1107524108>.

M. Patila, I.V. Pavlidis, E.K. Diamanti, P. Katapodis, D. Gournis, H. Stamatis, Enhancement of cytochrome c catalytic behaviour by affecting the heme environment using functionalized carbon-based nanomaterials, *Process Biochem.* 48 (2013) 1010–1017, <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2013.04.021>.

M. Pierra. Couplage de la fermentation sombre et de l'électrolyse microbienne pour la production d'hydrogène : Formation et maintenance du biofilm électro-actif. *Sciences du Vivant [q-bio]*. 2013. Université Montpellier 2. <https://hal.inrae.fr/tel-02810585>

M. Pierra, E. TRABLY, J-J GODON, N. BERNET Fermentative hydrogen production under moderate halophilic conditions. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2013 <http://10.1016/j.ijhydene.2013.08.035>

M. Picot, L. Lapinonnière, M. Rothballer, F. Barrière, Graphite anode surface modification with controlled reduction of specific aryl diazonium salts for improved microbial fuel cells power output, *Biosens. Bioelectron.* 28 (2011) 181–188, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2011.07.017>.

M. Rosenbaum, F. Aulenta, M. Villano, L.T. Angenent, Cathodes as electron donors for microbial metabolism : which extracellular electron transfer mechanisms are involved. *Bioresour. Technology*. 102 (2011) 324–333, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.07.008>.

M.A. Rosenbaum, A.W. Henrich, Engineering microbial electrocatalysis for chemical and fuel production, *Current Opinion in Biotechnology - Journals | Elsevier*. 29 (2014) 93–98, <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2014.03.003>.

M.C. Potter, Electrical effects accompanying the decomposition of organic compounds, *Proceeding of the Royal Society B. London. Ser. B. Contain. Pap. a Biological science. Character*. 84 (1911) 260–276. 14 September 1911 <https://doi.org/10.1098/rspb.1911.0073>

M.D. Yates, J. Golden, J. Roy, S.M. Strycharz-Glaven, S. Tsoi, J. Erickson, et al., Thermally activated long range electron transport in living biofilms, *physics chemistry chemistry physics*. 17 (2015) 32564–32570, <http://dx.doi.org/10.1039/C5CP05152E>.

M.D. Yates, S.M. Strycharz-Glaven, J.P. Golden, J. Roy, S. Tsoi, J.S. Erickson, et al., Measuring conductivity of living *Geobacter sulfurreducens* biofilms, *Nature Nanotechnology*. 11 (2016) 910–913, <http://dx.doi.org/10.1038/nnano.2016.186>.

M.Y. El-Naggar, G. Wanger, K.M. Leung, T.D. Yuzvinsky, G. Southam, J. Yang, et al., Electrical transport along bacterial nanowires from *Shewanella oneidensis* MR-1, *Proceedings of the National Academy of Sciences of U. S. A.* 107 (2010) 18127–18131, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1004880107>.

## N

N.S. Malvankar, D.R. Lovley, Microbial nanowires for bioenergy applications, *Curr. Opin. Biotechnol.* 27 (2014) 88–95, <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2013.12.003>.

N.S. Malvankar, S.E. Yalcin, M.T. Tuominen, D.R. Lovley, Visualization of charge propagation along individual pili proteins using ambient electrostatic force microscopy, *Nature. Nanotechnology*. 9 (2014) 1012–1017, <http://dx.doi.org/10.1038/nnano.2014.236>.

## P

P.D. Kiely, G. Rader, J.M. Regan, B.E. Logan, 2011. Long-term cathode performance and the microbial communities that develop in microbial fuel cells fed different fermentation endproducts. *Bioresour. Technology* 102, 361–336. <http://10.1016/j.biortech.2010.05.017>

P. H., Van Langevelde, I., Katsounaros, & M. T. M. Koper, (2021). *Electrocatalytic Nitrate Reduction for Sustainable Ammonia Production*. *Joule*, 5(2), 290–294. <http://dx.doi:10.1016/j.joule.2020.12.025>

PJ, Gonzalez, C. Correia, I. Moura, CD. Brondino & JJ Moura (2006) Bacterial nitrate reductases: Molecular and biological aspects of nitrate reduction. *Journal of Inorganic Biochemistry* 100(5-6):1015-1023 <http://10.1016/j.jinorgbio.2005.11.024>

P. Stoodley, K. Sauer, D. G. Davies, and J. W. Costerton<sup>1</sup> Annual. Review of Microbiology. Biofilms as Complex Differentiated. Vol.56:187-209.2002. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.160705>

P. Stoodley, R., Cargo, C. Rupp, *et al.* Biofilm material properties as related to shear-induced deformation and detachment phenomena. *J Ind Microbiol Biotech* **29**, 361–367 (2002). <https://doi.org/10.1038/sj.jim.7000282>

## Q

Q. Wu, H. S. Shen, B. Huang, Y. Dai, Y. Ma. Efficient nitric oxide reduction to ammonia on a metal-free electrocatalyst. *Journal of Materials Chemistry A* 2021, 9 (9), 5434-5441. <https://doi.org/10.1039/D0TA11209G>

## R

R. Chauhan, V. C. Srivastava. A Suitable Combination of Electrodes for Simultaneous Reduction of Nitrates and Oxidation of Ammonium Ions in an Explosive Industry Wastewater. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 2021, 60 (15), 5482-5493. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.1c00130>

R. Daiyan, T. Tran-Phu, P. Kumar, K. Iputera, Z. Tong, J. Leverett, M. Haider Ali Khan, A. Asghar, and al. Nitrate reduction to ammonium : from CuO defect engineering to waste NO<sub>x</sub> -to-NH<sub>3</sub> economic feasibility. *Energy & Environmental Science* 2021, 14 (6), 3588-3598. <https://doi.org/10.1039/D1EE00594D>

R. Dronov, D.G. Kurth, H. Möhwald, R. Spricigo, S. Leimkühler, U. Wollenberger, et al., Layer-by-layer arrangement by protein-protein interaction of sulfite oxidase and cytochrome c catalyzing oxidation of sulfite, *J. Am. Chem. Soc.* 130 (2008) 1122–1123, <http://dx.doi.org/10.1021/ja0768690>.

R. Mao, H. Zhu, K. F. Wang, Xu Zhao. Selective conversion of nitrate to nitrogen gas by enhanced electrochemical process assisted by reductive Fe (II)-Fe (III) hydroxides at cathode surface. *Applied Catalysis B: Environmental* 2021, 46, 120552. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2021.120552>

R.J. Narayan, C.J. Berry, R.L. Brigmon, Structural and biological properties of carbon nanotube composite films, *Mater. Science Energy. B* 123 (2005) 123–129, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mseb.2005.07.007> .

R.J. Steidl, S. Lampa-Pastirk, G. Reguera, Mechanistic stratification in electroactive biofilms of *Geobacter sulfur* reduces mediated by pilus nanowires, *Nature Communications*. 7 (2016) 12217, <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms12217>.

## S

S. Kang, M. Herzberg, D.F. Rodrigues, M. Elimelech, Antibacterial effects of carbon nanotubes: size does matter! *Langmuir* 24 (2008) 6409–6413, <http://dx.doi.org/10.1021/la800951v> .

- S. Kato, K. Hashimoto, K. Watanabe, Microbial interspecies electrontransfer via electric currentsthroughconductiveminerals, Procetings National Academy of Science of U. S. A. 109 (2012) 10042–10046, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1117592109> .
- S. Lampa-Pastirk, J.P. Veazey, K.A. Walsh, G.T. Feliciano, R.J. Steidl, S.H. Tessmer, et al., Thermallyactivated charge transport in microbial protein nanowires, Scientific Reports-Nature 6 (2016) 23517, <http://dx.doi.org/10.1038/srep23517> .
- S. Patil, F. Harnisch., C. Koch, T. Hübschmann, I. Fetzer, S. Carmona-Martínez, A. a, Müller, U. Schröder, 2011. Electroactive mixed culture derived biofilms in microbial bioelectrochemical systems : the role of pH on biofilm formation, performance and composition. Bioresource Technology 102, 9683–9690. <http://dio.10.1016/j.biortech.2011.07.087>
- S. Pinck, M. Etienne, M. Dossot, F. P. A. Jorand. A rapid and simple protocol to prepare a living biocomposite thatmimics electroactive biofilms. Bioelectrochemistry, 118, (2017) 131–138. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2017.07.010>
- S. Pirbadian, S.E. Barchinger, K.M. Leung, H.S. Byun, Y. Jangir, R.A. Bouhenni, et al., Shewanellaoneidensis MR-1 nanowires are outer membrane and periplasmic extensions of the extracellularelectron transport components, Proc. Natl. Acad. Sci. 111 (2014) 1–6, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1410551111>
- S. Rinaldo, F. Cutruzzolà, Nitrite Reductases in Denitrification, , Biology of the Nitrogen Cycle, Chapter 3 - 2007, Pages 37-55.
- S. Su, L. Eileen& all. Bioanode as a limiting factor to biocathode performance in microbial electrolysis cells Bioresource Technology Volume 238, August 2017, Pages 313-324. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.03.127>
- S. Wu, P. Liang, C. Zhang, H. Li, K. Zuo, X. Huang, Enhanced performance of microbial fuel cell at lowsubstrate concentrations by adsorptive anode, Electrochim. Acta 161 (2015) 245–251, <http://dx.doi.org/10.1016/>
- S. Xu, Y. Jangir, M.Y. El-Naggar, Disentangling the roles of free and cytochrome-boundflavins in extracellularelectron transport fromShewanellaoneidensis MR-1, Electrochimica Acta 198 (2016) 49–55, <http://dx.doi.org/10.1016/j>.
- S. Xu, Y. Jangir, M.Y. El-Naggar, Disentangling the roles of free and cytochrome-boundflavins in extracellularelectron transport fromShewanellaoneidensis MR-1, Electrochimica. Acta 198 (2016) 49–55, <http://dx.doi.org/10.1016/j> .
- S.A. Patil, K. Hasan, D. Leech, C. Hägerhäll, L. Gorton, Improved microbial electrocatalysis with osmium polymer modified electrodes, Chemical Communications. (Camb.) 48 (2012)<http://dx.doi.org/10.1039>
- S.K. Manna, S. Sarkar, J. Barr, K. Wise, E.V. Barrera, O. Jejelowo, et al., Single-walledcarbon nanotube inducesoxidative stress and activatesnuclear transcription factor-κB in human keratinocytes, Nano Letters. 5 (2005) 1676–1684, <http://dx.doi.org/10.1021>

S.M. Azab, M. Shehata, A.M. Fekry. A novelectrochemicalanalysis of the legal psychoactive drugcaffeineusingzeolites/MWCNT modifiedcarbon paste sensor, *New Journal of Chemistry*, (2019) 43(38), 15359-15367. DOI <https://doi.org/10.1039/C9NJ04070F>

## T

T. Doherty, J.G. Sunderland, E.P.L. Roberts, D.J. Pickett, An improved model of poten- tial and current distribution within a flow-throughporouselectrode, *Electrochimica. Acta* 41 (1996) 519–526, <http://dx.doi.org/10.1016>

T. Fenchel, T.H. Blackburn and all , *Bacterial Metabolism, Bacterial Metabolism, Bacterial Biogeochemistry*,Chapter 1 - Pages 1-34, Third Edition, 2012,

T. Krieg, A. Sydow, U. Schröder, J. Schrader, D. Holtmann, Reactor concepts for bioelectrochemicalsyntheses and energy conversion, *Trends Biotechnol.* 32 (2014) 645–655, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2014.10.004>.

## U

U. Schröder, Discover the possibilities: microbial bioelectrochemical systems and the revival of a 100-year–olddiscovery, *Journal of Solid State Electrochemical.* 15 (2011) 1481–1486, <http://dx.doi.org/10.1007/s10008-011-1395-7>.

## V

V.K.K. Upadhyayula, S. Deng, M.C. Mitchell, G.B. Smith, Application of carbon nanotube technology for removal of contaminants in drinking water: areview, *Science Total Environnement.* 408 (2009) 1–13, <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.09.027>.

## W

W. Beatrix, A. W. Wohanka, *Root Zone Microbiology of Soilless Cropping Systems, Soilless Culture* Pages 149-194 Second Edition, 2019

W. Fu, X. Du, P. Su, Qizhan Zhang, Minghua Zhou. SynergisticEffect of Co(III) and Co(II) in a 3D Structured Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Carbon Felt Electrode for EnhancedElectrochemical Nitrate Reduction Reaction. *ACS Applied Materials & Interfaces* 2021, 13 (24), 28348-28358. <https://doi.org/10.1021>

W. Ghach, M. Etienne, V. Urbanova, F.P.A. Jorand, A. Walcarius, Sol–gel based “artificial” biofilm from *Pseudomonas fluorescens*using bovine heart cytochrome c as electronmediator, *Electrochemical. Communication.* 38 (2014) 71–74, <http://dx.doi.org/10.1016/j>.

W. Zhao, S.Ci. Nanomaterials as Electrode Materials Of Microbial Electrolysis Cells For Hydrogen Generation. *Micro and Nano Technologies* 2019, Pages 213-242 <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814837-2.00007-X>

## X

X. Deng, Y. Yang, L. Wang, X. Z. Fu, J. Li Luo. Metallic Co Nanoarray Catalyzes Selective NH<sub>3</sub> Production from Electrochemical Nitrate Reduction at Current Densities Exceeding 2 A cm<sup>-2</sup>. *Advanced Science* 2021, 8 (7), 2004523. <https://doi.org/10.1002/adv.202004523>

X. Jiang, J. Hu, A.M. Lieber, C.S. Jackan, J.C. Biffinger, L.A. Fitzgerald, et al., Nanoparticle facilitated extracellular electron transfer in microbial fuel cells, *Nano Lett.* 14 (2014) 6737–6742, <http://dx.doi.org/10.1021/nl503668q>.

X. Li, Y. Gu, Shuai Wu, Shuo Chen, Xie Quan, Hongtao Yu. Selective reduction of nitrate to ammonium over charcoal electrode derived from natural wood. *Chemosphere* 2021, 285, 131501. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131501>.

X.C. Abrevaya, D. Galante, F. Nobrega, and al. In situ Search for Extraterrestrial Life : A microbial fuel cell-based Sensor for the detection of Photosynthetic Metabolism. *Astrobiology*. 2015, Volume 10, Issue 10, pp. 965-971. <http://10.1089/ast.2009.0460>

X.C. Abrevaya, N. Sacco, P .D, Mauas, E.Cortón,. Archaea-based microbial fuel cell operating at high ionic strength conditions. *Extremophiles* Volume 15, 633 (2011). <https://doi.org/10.1007/s00792-011-0394-z>

X.C. Abrevaya, N.J. Sacco, M.C. Bonetto, A. Hilding-Ohlsson, E. Cortón, Analytical applications of microbial fuel cells. Part II: toxicity, microbial activity and quantification, single analyte detection and other uses, *Biosensors and Bioelectronics* Volume 63, 15 January 2015, Pages 591-601 <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2014.04.053>.

X.M. Guo, E.Trably, E.Latrille, H.Carrère, J.-P. Steyer, 2010. Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation : A review. *International Journal of Hydrogen Energy* Volume 35, Issue 19, October 2010, Pages 10660-10673 <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.03.008>

## Y

Y. Wang, C. Wang, M. Li, Y. Yu, B. Zhang. Nitrate electro reduction: mechanism insight, in situ characterization, performance evaluation, and challenges. *Chemical Society Reviews* 2021, Volume 50 (12), 6720-6733. <https://doi.org/10.1039/D1CS00116G>

Y. Wu, Z. Jiang, Z. Lin, Y. Liang, H. Wang. Direct electrosynthesis of methylamine from carbon dioxide and nitrate. *Nature Sustainability* 2021, 2, s41893-021-00705-7 <https://doi.org/10.1038/s41893-021-00705-7>

Y.A. Gorby, S. Yanina, J.S. McLean, K.M. Rosso, D. Moyles, A. Dohnalkova, et al., Electrically conductive bacterial nanowires produced by *Shewanella oneidensis* strain MR-1 and other microorganisms, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 103 (2006) 11358–11363, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0604517103>.

Y.-C. Yong, Y. Yu, X. Zhang, H. Song, Highly active bidirectional electron transfer by a self-assembled electroactive reduced-graphene-oxide-hybridized biofilm, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 53 (2014) 4480–4483, <http://dx.doi.org/10.1002/anie.201400463>.

Journal of The Electrochemical  
Society



---

## Electrochemical Investigation of *Thiobacillus Denitrificans* in a Bacterial Composite

To cite this article: Bachira Abada *et al* 2020 *J. Electrochem. Soc.* 167 135502

View the [article online](#) for updates and enhancements.



## Electrochemical Investigation of *Thiobacillus Denitrificans* in a Bacterial Composite

Bachira Abada,<sup>1,2,\*</sup> Sabah Boumerfeg,<sup>1</sup> Ahmed Haddad,<sup>3</sup> and Mathieu Etienne<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Characterization, Valorisation of Natural Resources, University Mohamed El Bachir El Ibrahimy, Bordj Bou-  
Arredj, Algeria

<sup>2</sup>Centre de développement des Energies Renouvelables, Bouzareah 16300 Alger, Algeria

<sup>3</sup>Research Center in Industrial Technologies (CRTI), Cheraga 16014 Algiers, Algeria

<sup>4</sup>Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour les Matériaux et l'Environnement Unité Mixte de Recherche—UMR  
7564, CNRS, Université de Lorraine, France

The use of biocathodes in bioelectrochemical systems (BES) for the removal of nitrate from waste water has become a vital field for research. However, the elucidation of the underlying extracellular electron transfer (EET) fundamentals of denitrifying biocathodes is rarely done, but it is required for a deeper BES understanding and engineering. This study shows the thermodynamics of microbial electron transfer for reduction of nitrate and nitrite using bacteria immobilized on a biofilm used in BES. *Thiobacillus denitrificans* are best species that demonstrate both direct extracellular electron transfer and the phenomenon of microbial denitrification. The Cyclic voltammetry and chronoamperometry confirm the reduction of the nitrate at a potential of  $-0.46$  V and the nitrite at  $-0.68$  V vs Ag/AgCl, however the electrochemical response changes according to both the concentration and the temperature.

© 2020 The Electrochemical Society ("ECS"). Published on behalf of ECS by IOP Publishing Limited. [DOI: 10.1149/1945-7111/abdd7]

Manuscript submitted April 1, 2020; revised manuscript received September 24, 2020. Published October 15, 2020.

Supplementary material for this article is available [online](#)

Nature has always been a mystery, as for its self-purifying power, indeed natural environments find their equilibrium whatever the disorder may occur. This equilibrium is due to the existence of microorganisms that have the capacity to metabolize chemical residues from pesticide residues or other industrial sectors. Nitrates and nitrites are increasingly important pollutants in surface waters. The microorganisms best known for their ability to denitrify nitrates and nitrites are *Thiobacillus denitrificans*, *Shewanella oneidensis* and *Paracoccus denitrificans*.<sup>1–3</sup> The bacteria in the center of this study is *Thiobacillus denitrificans*, an autotrophic gram-negative bacterium, i.e. living in an environment without any source of organic carbon.

Water pollution by nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) is worldwide a concern.<sup>1</sup> Conventional procedures based on biological heterotrophic denitrification (i.e. organic carbon as source of bacterial carbon) are limited by the lack of availability of electron donors.<sup>2</sup> Alternatively, the cathodes of bioelectrochemical systems (BES) could be used as a safe and endless source of electrons for nitrate reduction but microbial extracellular electron transfer (EET) is still insufficiently exploited and, to promote potential applications, it is necessary to better understand the autotrophic microbial metabolism, and to evaluate for electron transfer reactions linked to denitrification of aquifer polluted by nitrate and nitrite when inorganic carbon is the only source of microbial carbon.<sup>3,4</sup>

The midpoint potentials ( $E_m$ , formal potentials) of isolated denitrifying enzymes of specific microbial species were elucidated. Nitrate reductase GHI,<sup>5</sup> Cu nitrite reductase<sup>6</sup> and Cu nitrous oxide reductase<sup>7</sup> have potentials of  $-0.19$  V,  $-0.07$  V and  $-0.14$  V vs Ag/AgCl, respectively. However, little is known about EET of denitrifying biocathodes.

Within this publication, we report on the EET characteristics of denitrifying biocathodes using a biocomposite as an artificial biocathode, i.e. a simplified ecosystem using protamine to immobilize *Thiobacillus denitrificans*. Protamine is positively charged at neutral pH and allows the assembly of biocomposite elements together. This self-assembly has been evidenced by dynamic light scattering and scanning electron microscopy (SEM).<sup>8</sup> MWCNTs show exceptional electrical and mechanical properties due to their relatively high surface area, small dimensions and stable nature.<sup>9</sup>

They can improve the electronic performance of the biofilm and facilitate the electron transfer between bacteria and electrodes.<sup>10</sup> MWCNT acts as a conductor in the bacterial biocomposite that is free of mediating metabolites that can interfere in the direct transfer of electron between the bacterial membrane and the electrode.<sup>11,12</sup> Detailed analysis in cyclic voltammetry and chronoamperometry are provided.<sup>13,14</sup> This study focuses on nitrate and nitrite reduction as a model process, and evaluate the effect of temperature and nitrite concentration on the electrochemical response.

### Materials and Methods

**Bacterial strains and growth conditions.**—*Thiobacillus denitrificans* from DSMZ laboratory, cultivated at mineral medium ( $\text{N}^\circ 113$  DSMZ)<sup>15</sup>, preparing four solutions: A, B, C and D for 1 l. The four solutions are prepared separately: the solution of trace elements, the solution A (containing in addition to the base salts, the electron acceptor,  $\text{NO}_3^-$ ), the solution B containing the thiosulfate (electron donor), solution C containing the carbon source (bicarbonate), and solution D. The composition of these different media is trace element solution SL-4: 50 g  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ ; 20 g  $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ; 10 g  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 30 mg  $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ ; 0.3 g  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ; 0.2 g  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 10 mg  $\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ; 20 mg  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 30 mg  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 1000 ml water. **Solution A**<sup>16</sup>: 2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 2 g  $\text{KNO}_3$ ; 1 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ; 0.8 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 2 ml elements trace solution SL-4 and 960 ml water. The pH adjusted at 7 with NaOH. **Solution B**<sup>17</sup>: 5 g  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 20 ml water; **Solution C**<sup>18</sup>: 1 g  $\text{NaHCO}_3$ , 20 ml water; **Solution D**<sup>19</sup>: 20 mg  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 10 ml 0.1 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .

Media A, B and D are boiled and degassed under filtered  $\text{N}_2$ . Solution C is degassed under filtered  $\text{N}_2/\text{CO}_2$  (80%/20%). Solutions A, B, C and D are sterilized separately by autoclaving at 121 °C for 15 min. The pH of solution A is checked after autoclaving with a drop taken aseptically and deposited on a piece of pH paper (it should remain around 7).<sup>20</sup>

**Bio-composite preparation.**—Five bottles of 100 ml containing 96 ml of solution A were prepared as described before and completed with 2 ml of solution B, 2 ml of solution C and 0.1 ml of solution D taken by syringe 2 to 3 ml of *Thiobacillus denitrificans* suspension are added in four medium bottles.<sup>21</sup> The 5th bottle is used as a control. The five bottles are incubated at 30 °C in a stove for one week.<sup>22,23</sup> Bacteria growth was monitored by direct counting with an optical microscope of a drop put between two microscope

\*E-mail: b.abada@ceder.dz; abadabachira@gmail.com

glass slides at 100X magnification. At the last day of the growing period, pictures of bacteria were taken for epifluorescence analysis. After one week of incubation,  $DO_{600} = 1$  it was equivalent of  $6.4 \times 10^8$  cells  $ml^{-1}$  and it was conserved at  $+4$  °C.<sup>24</sup>

The culture was harvested by centrifugation at 5000 g for 10 min at room temperature.<sup>25</sup> The pellet was washed twice with 1 mM KCl, and then suspended in 1 mM KCl in order to reach a cell density between  $2 \times 10^9$  and  $5 \times 10^9$  cell  $ml^{-1}$  (determined by optical density measurement) as shown in Fig. S1 in the Supplementary Material (available online at [stacks.iop.org/JES/167/135502/mmedia](https://stacks.iop.org/JES/167/135502/mmedia)).<sup>26</sup>

The biocomposite was prepared according to protocol from the literature<sup>5</sup> by mixing one volume of bacterial suspension ( $5 \times 10^9$  Cells  $ml^{-1}$ ), one volume of MWCNT-COOH suspension ( $5$  mg  $ml^{-1}$  dispersed in water by sonication for 30 min), protamine ( $5$  mg  $ml^{-1}$ , dispersed in water by vortexing for 30 min), and two volumes of 1 mM KCl for 15 min until a sedimentation was observed (Fig. S2 in the Supplementary Material). After that biocomposite has sedimented in the suspension, it was deposited it on the graphite felt by vacuum filtration as shown in Fig. S3 in the Supplementary Material.

**Microscopies.**—In epifluorescence microscopy, the LIVE™ Bac Light™ kit (Thermo Fischer Scientific) was used.<sup>27</sup> Briefly, samples were mixed with DNA dyes SYTO 9 ( $1.67$   $\mu$ M) and propidium iodide ( $1.67$   $\mu$ M) and incubated for 15 min before filtration (on  $0.22$   $\mu$ m membrane filters).<sup>28</sup> The filtrate was afterwards dropped on microscope glass slide and observed with an epifluorescence microscope (OLYMPUS BX51) with a magnification factor  $\times 1000$ .<sup>29</sup> A sample image is provided in Fig. S4 in the Supplementary Material. High magnification scanning electron microscopy (SEM) was performed with JSM-IT 500 HR from JEOL. Energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS) was performed with a table-top JEOL SEM equipped with a JEOL analyzer.<sup>30</sup>

**Electrochemical measurements.**—The experiments were carried out in a conventional electrochemical three electrodes cell (Fig. S5 in Supplementary Material), with a graphite felt as working electrode having 17 mm diameter and 5 mm thickness (GFD4.6 EA from SGL, Germany), stainless steel as a counter electrode and Ag/AgCl as a reference electrode (sat. KCl, SE11 Sensortechnik Meinsberg, Germany). The cell was connected to a bath water thermostat at 30 °C. Experiments were performed in 20 ml of PBS at pH 7 under nitrogen flow and slow magnetic agitation. If not stated otherwise, all potentials in this work are provided vs Ag/AgCl (sat. KCl;  $+0.197$  V vs Standard hydrogen electrode SHE). Cyclic voltammetry experiments were done under nitrogen atmosphere at a scan rate  $5$  mV  $s^{-1}$ , at room temperature and at 30 °C.<sup>31</sup> Nitrate (20 or 40 mM) was added after the current response was stabilized; Amperometric measurements have been performed at constant potential at  $-0.46$  V or  $-0.68$  V vs Ag/AgCl. After decay of the capacitive current, nitrate or nitrite have been added in the solution.

## Results and Discussion

**Microscopic observations.**—Figure S5 in Supplementary Material shows the *Thiobacillus denitrificans* observed in epifluorescence microscopy. With a Bac Light Live/Dead assay, the green staining shows that bacteria display low membrane permeation and are potentially viable.<sup>32</sup> After formation of the biocomposite of *Thiobacillus denitrificans* cells and carbon nanotube, the material is deposited on graphite felt. Figure 1 reports details of this biomaterial when immobilized on the graphite fibers (Figs. 1D–1G) and the electrode obtained by following the same protocol but without bacteria (Figs. 1A–1C). Aggregates are visible in the presence of bacteria. High resolution imaging allows to get a detailed view of the interaction between MWCNT with bacteria when protamine is present. At pH 7, protamine is positively charged (isoelectric point of 9.5) whereas bacterial cells and MWCNT are negatively charged.<sup>33</sup>

Together, these elements self-assemble and MWCNTs surround the bacterial cell (see Figs. 1G and 1H).

Figures 2A, 2B show the morphology of the graphite felt with two different magnifications as a bare electrode.<sup>33</sup> Figures 2C to 2D shows the MWCNT and protamine after deposition in graphite felt with different magnifications. Figure 2F shows complex of protamine and MWCNT-COOH on the carbon felt as white dots.<sup>34</sup> Figure 2G shows the Mapping EDX which show the distribution of the elements. The percentage of all C, N, O and S are 76, 4, 12 and 8% ensuring the presence of both MWCNT and protamine.<sup>35</sup>

**Electrochemical response to nitrate and nitrite.**—Preliminary experiments have been directed to evaluate the response to 20 mM nitrate of *Thiobacillus denitrificans* in a biocomposite electrode. First, a control experiment with an electrode prepared by following a similar protocol but in the absence of the bacterial cells do not show any response to the introduction of nitrate (Fig. 3A). The bacterial cells were stored in 1 mM KCl for 5 (Fig. 3B), 10 (Fig. 3C), and 15 d (Fig. 3D) before to be introduced in the biocomposite for electrochemical characterization. With the fresher culture (5 d), a current increase is observed upon the introduction of nitrate in the solution. The signal is broad with a peak around  $-0.35$  V vs Ag/AgCl. After 10 d, a change is still noticed in the voltammogram in the same potential region and a higher current is noticed at higher potential, close to  $-0.6$  V vs Ag/AgCl. After 15 d, no current change was observed upon addition of nitrate. These results suggest that *Thiobacillus denitrificans* possesses membrane proteins responsible for the extracellular electron transfer linked to nitrate reduction but also that electron transfer chain is degrading with time. The response to nitrite was also evaluated with a relatively fresh *Thiobacillus denitrificans* culture (Fig. 4). No response of the electrode is observed in the absence of bacterial cells (Fig. 4A) and a clear current response to nitrite is observed at low potential, below  $-0.6$  V (Fig. 4B). A hypothesis is that the low potential response (close to  $-0.35$  V) is linked to nitrate reduction while the current increase at a lower potential (close to  $-0.6$  V) is linked to nitrite reduction. To control that idea, constant potential amperometry have been performed and discussed in the next section.

Figure 5B A reports the amperometry measurement performed at  $-0.46$  V vs Ag/AgCl, first in the absence of nitrate and then after spiking 20 mM  $NO_3^-$ . When the experiment was performed in the absence of bacterial cells (curve (a)), no current change was observed when nitrate was spiked but a clear response was visible in the presence of *Thiobacillus denitrificans* in the biocomposite electrode (curve b), and the current was increasing by about  $1$   $\mu$ A  $cm^{-2}$ . A similar experiment was performed with nitrite. (Fig. 5B). A lower potential was applied to the biocomposite electrode,  $-0.68$  V vs Ag/AgCl. No response was observed in the absence of bacterial cells (curve a) and a significant current increase was observed upon successive additions of 20 mM nitrite. Interestingly, the current increase was about 10 times larger with nitrite than with nitrate, about  $10$   $\mu$ A  $cm^{-2}$  increase after each addition of 20 mM nitrite.

**Effect of temperature.**—The purpose of the following experiments is to evaluate the influence of temperature on the electrochemical reactions that were identified in the previous section. Figure 6 reports the electrochemical response of *Thiobacillus denitrificans* in the biocomposite to 20 mM nitrate at room temperature.<sup>36</sup> The response is similar as the one observed before (compare it with Fig. 3B). Here, the next step was to increase the temperature of the electrochemical cell to 30 °C (curve c). In that conditions, the current response increases significantly and the catalytic signal becomes more visible. The peak potential was moved to a slightly higher value, from  $-0.35$  V to  $-0.43$  V vs Ag/AgCl. We explain this relation between the increase of the current and the temperature to the fact that the membrane proteins of the bacteria are more active at the temperature of 30 °C and as we have deprived the bacteria of all its extracellular metabolites.<sup>37</sup>

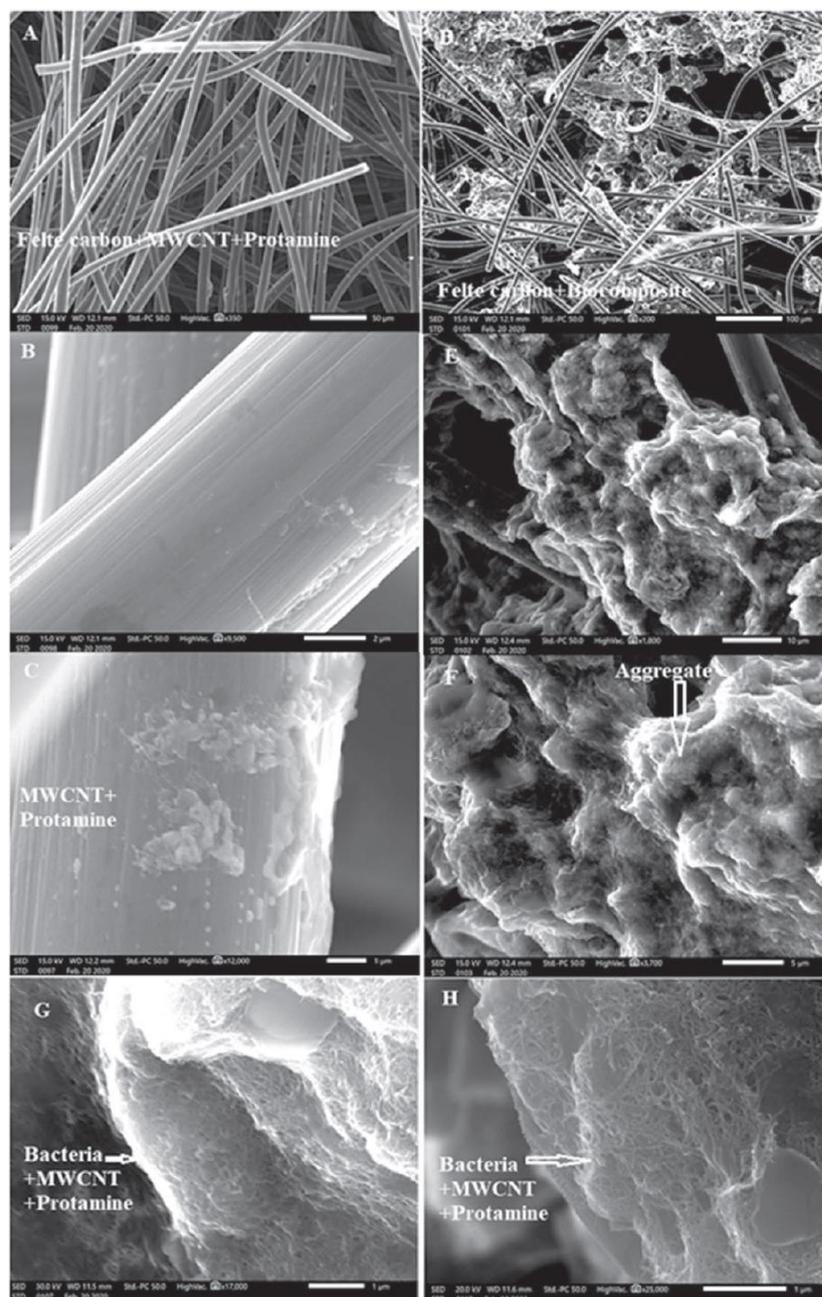


Figure 1. Scanning electron micrographs of the graphite felt modified with a suspension of MWCNT and protamine (A)–(C) or with the bacterial composite prepared with *Thiobacillus denitrificans*, MWCNT and protamine (D)–(H).

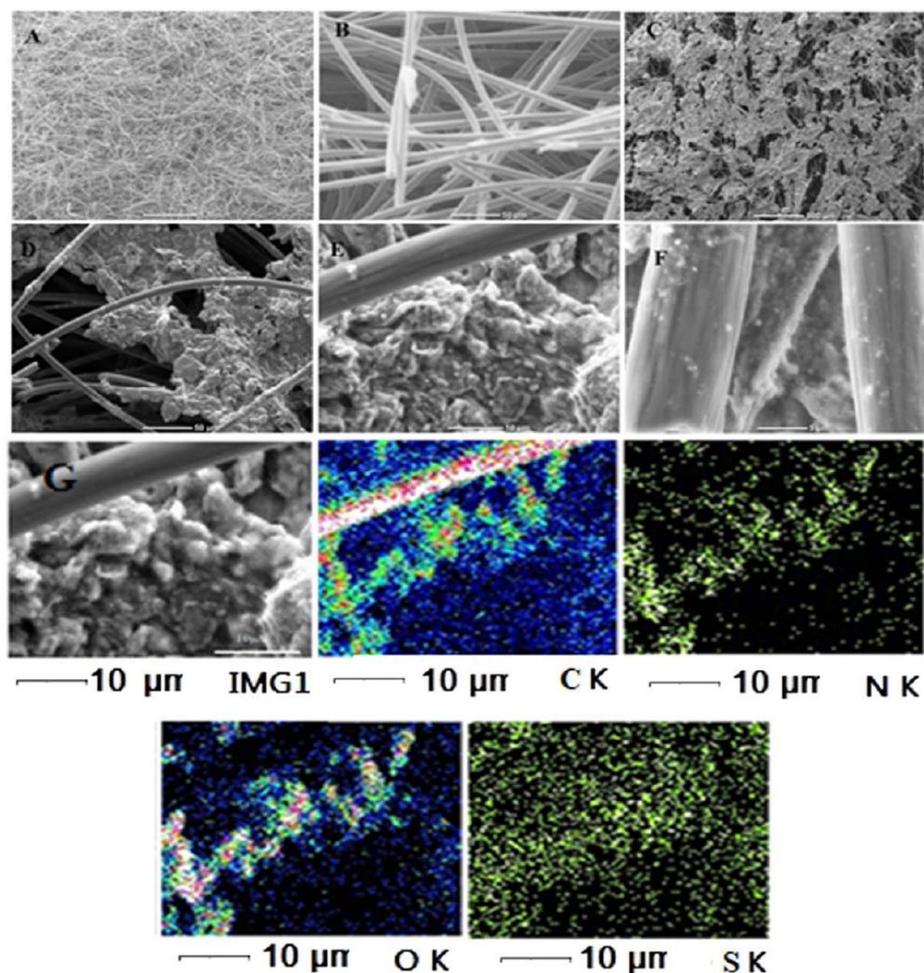


Figure 2. SEM images (A), (B) for graphite felt, (C), (F) for felt carbon with MWCNT and protamine. G: EDX Mapping of graphite felt with MWCNT and protamine.

**Effect of nitrate concentration.**—The influence of concentration of nitrate on the response of *Thiobacillus denitrificans* biocomposites at 30 °C was evaluated.<sup>32</sup> It is presented in Fig. 7. When relatively small amount of nitrate was added (from 10 to 20 mM) a limited current increase was observed at  $-0.46$  V vs Ag/AgCl and a second signal can be noticed at  $-0.61$  V vs Ag/AgCl. In the presence of 40 mM nitrate, the current at  $-0.46$  V increased significantly and the presence of second redox signal at  $-0.61$  V is confirmed. The largest concentration (60 mM) leads only to a limited increase in current.

Figure 8 shows the calibration curve as a linear relationship between different  $\text{NO}_3^-$  concentrations (10–60 mM) and the current density (absolute values).

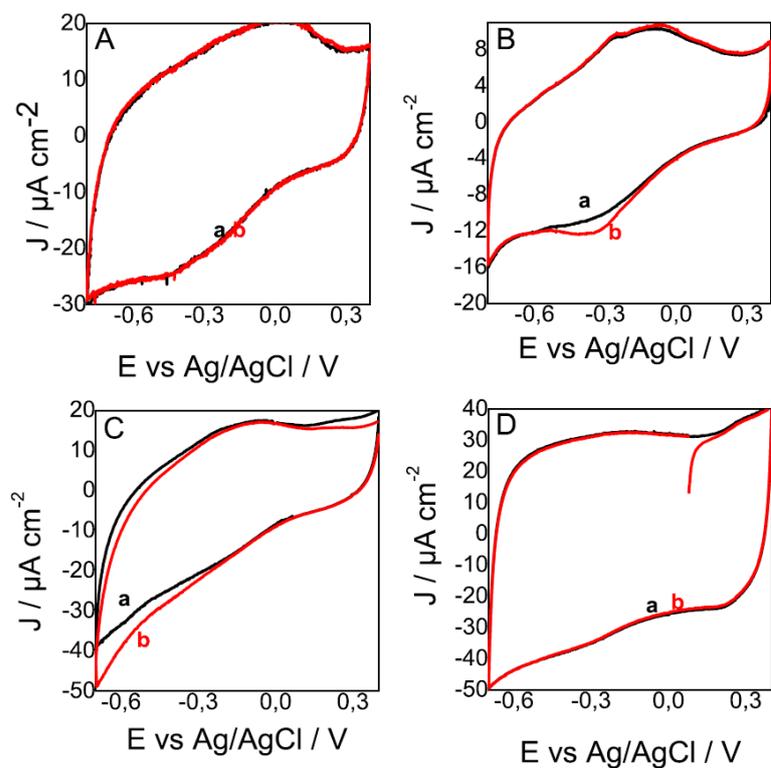
The linear equation<sup>38</sup> was  $J/\mu\text{A cm}^{-2} = 0.32 C + 13.7$  with a correlation coefficient of 0.94. This means that the steady state

reduction current increases with gradual increase in  $\text{NO}_3^-$  concentration. The sensitivity of the proposed method was evaluated using both the limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) values. The LOD and LOQ were calculated using the following<sup>39</sup>:

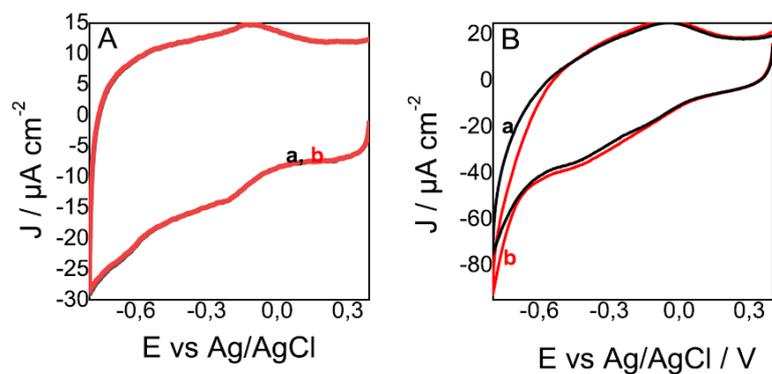
$$\text{LOD} = 3 s/b$$

$$\text{LOQ} = 3 s/b$$

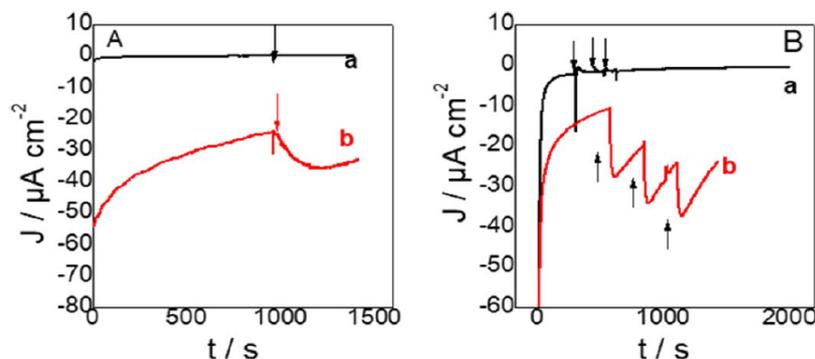
Where  $s$  is the standard deviation of the reduction peak current (three runs) and  $b$  is the slope ( $\text{mA M}^{-1}$ ) of the related calibration curves; they were found to be  $6.3 \mu\text{M}$  and  $21 \mu\text{M}$ , respectively. This is a good detection limit which means that we can use this system as a sensor to know the current of any nitrate concentration.<sup>40</sup>



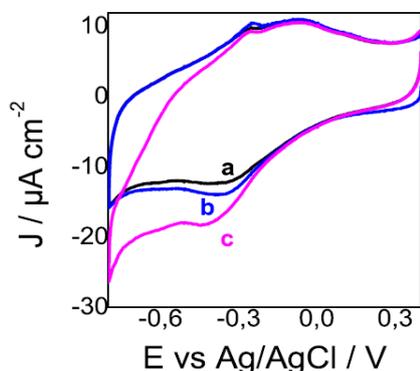
**Figure 3.** (A) Cyclic voltammetric response measured with graphite felt electrodes modified with (A) a suspension of protamine and MWCNT, (B)–(D) biocomposite made with protamine, MWCNT and *Thiobacillus denitrificans* from (B) a 5 d old culture, (C) a 10 d old culture and (D) a 15 d culture. (a) Response in the absence of nitrate and (b) response in the presence of 20 mM nitrate. Scan rate of the potential sweep was  $5 \text{ mV s}^{-1}$ . All experiments are done under nitrogen atmosphere.



**Figure 4.** Cyclic voltammetric response measured with graphite felt electrodes modified with the biocomposite made with protamine, MWCNT and *Thiobacillus denitrificans* from a 5 d old culture. (a) Response in the absence of nitrite and (b) response in the presence of 20 mM nitrite. Scan rate of the potential sweep was  $5 \text{ mV s}^{-1}$ . All experiments are done under nitrogen atmosphere.



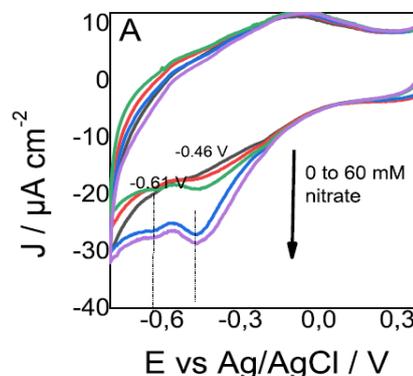
**Figure 5.** Amperometric responses to (A) 20 mM  $\text{NO}_3^-$  and (B) 20 mM  $\text{NO}_2^-$ , measured with graphite electrodes modified with (a) a composite electrode made of protamine and MWCNT and (b) a biocomposite made with MWCNT, protamine and *Thiobacillus denitrificans* from a five days culture. All experiments are done under nitrogen atmosphere. (A) was done at  $-0.46$  V and (B) at  $-0.68$  V vs Ag/AgCl.



**Figure 6.** Cyclic voltammetric response measured with graphite felt electrodes modified with biocomposite made with protamine, MWCNT and *Thiobacillus denitrificans*, (a) at room temperature ( $21^\circ\text{C}$ ) in the absence of nitrate, (b) at room temperature in the presence of 20 mM nitrate, and (c) at  $30^\circ\text{C}$ , in the presence of 20 mM nitrate. Scan rate of the potential sweep was  $5\text{ mV s}^{-1}$ . All experiments are done under nitrogen atmosphere.

### Conclusions

This publication demonstrated for the first time the EET characteristics of denitrifying biocathode. Artificial biofilm in which *Thiobacillus denitrificans* was devoid of all the metabolites acting as electron mediators and in a hostile composite. It has been used successfully to study the thermodynamics of EET as well as CV analysis of a denitrifying biocathode has shown that the reduction of nitrate to nitrites occurs at  $-0.46$  V and the reduction of nitrites at  $-0.68$  V. The results presented allow to better understand the EET principles of denitrifying cathodes based on *Thiobacillus sp.* The engineering used in the preparation of the artificial biofilm can help put into operation the exploitation of denitrifying bioelectrochemical systems, e.g. rate of removal of nitrates as a function of the potential of the cathode. In addition, the strategy of using these artificial biofilms allowed to answer questions related to the effect of the temperature on the extracellular transfer and the denitrification activity of *Thiobacillus denitrificans* which gave a better increase of the current at  $30^\circ\text{C}$  than that at the ambient temperature which



**Figure 7.** (A) Cyclic voltammetric response measured with graphite felt electrodes modified with biocomposite made with protamine, MWCNT and *Thiobacillus denitrificans* at  $30^\circ\text{C}$ , in the presence of increasing amount of nitrate: 0, 10, 20, 40 and 60 mM. Scan rate of the potential sweep was  $5\text{ mV s}^{-1}$ . All experiments are done under nitrogen atmosphere. Catalytic current at  $-0.46$  V vs nitrate concentration. The catalytic current is estimated by subtracting the current measured in the absence of nitrate.

was  $21^\circ\text{C}$ . This question asked by Pous et al. about the proportional relationship between the concentration of nitrate and the increase of the current of microcosms exploited here may be more suitable, e.g. study the generation of other reduced nitrogen species (such as  $\text{NO}_2^-$ ) and heterogeneities in packed electrodes using microbial electrode reactions.<sup>41</sup>

The increase in current to negative values appears only when added nitrite in the solution. This can be explained by the simultaneous reduction of nitrite and hydrogen, so we can suggested this question, from which way hydrogen is produced, we can suppose two hypotheses: first by using NADH as an electron donor to reduce nitrite to ammonium, but without generating a proton energy gradient,<sup>42</sup> the second we can think the existence of an  $\text{NO}_2^-/\text{H}^+$  symporter which is a transporter similar to the NarK1 protein named the symporter  $\text{NO}_3^-/\text{H}^+$ ; known in some bacteria.<sup>43</sup> The challenge in future work is to assert or deny the existence of the transporteur named the  $\text{NO}_2^-/\text{H}^+$  symporter in *Thiobacillus denitrificans*.

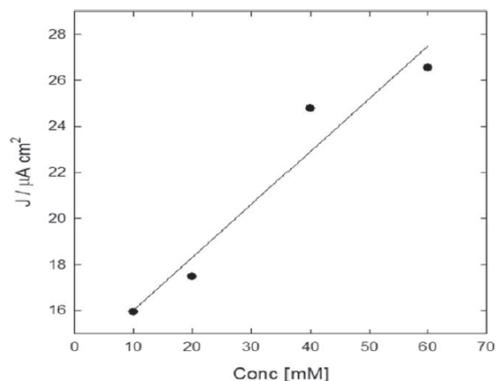


Figure 8. Calibration curve for detection of  $\text{NO}_3^-$  by the *Thiobacillus denitrificans* biocomposite.

#### ORCID

Bachira Abada  <https://orcid.org/0000-0002-7103-9047>

#### References

- P. M. Vitousek, J. D. Aber, R. W. Howarth, G. E. Likens, P. A. Matson, D. W. Schindler, W. H. Schlesinger, and D. G. Tilman, "Human alteration of the global nitrogen cycle: sources and consequences," *Ecol. Appl.*, **7**, 737 (1997).
- V. Matějík, S. Čížinská, J. Krejčí, and T. Janoch, "Biological water denitrification—a review," *Enzym. Microb. Technol.*, **14**, 170 (1992).
- P. Clauwaert, K. Raebay, P. Aelterman, L. De Schampelaire, T. H. Pham, P. Boeckx, N. Boon, and W. Verstraete, "Biological denitrification in microbial fuel cells," *Environ. Sci. Technol.*, **41**, 3354 (2007).
- K. B. Gregory, D. R. Bond, and D. R. Lovley, "Graphite electrodes as electron donors for anaerobic respiration," *Environ. Microbiol.*, **6**, 596 (2004).
- S. Pinck, M. Etienne, M. Dossot, and F. P. A. Jorand, "A rapid and simple protocol to prepare a living biocomposite that mimics electroactive biofilms," *Bioelectrochemistry*, **118**, 131 (2017).
- W. G. Zumft and H. Körner, "Respiratory Nitric Oxide Reductases, NorB and NorZ, of the heme-copper oxidase type," *The Smallest Biomolecules: Diatomics and their Interactions with Heme Proteins* (Elsevier, Germany) **13**, 327 (2008).
- A. Daiber, "Nitrite Reductases in Denitrification, Serena Rinaldo, Francesca Cutzuola," *Biology of the Nitrogen Cycle* (Elsevier Science, United States of America) 3452 (2007).
- A. Daiber, H. Shoun, and V. Ullrich, "Nitric oxide reductase (P450nor) from *Fusarium oxysporum*," *J Inorg Biochem.*, **99**, 185 (2005).
- F. Peter, "Guengerich reduction of cytochrome b5 by NADPH-cytochrome P450 reductase," *Arch. Biochem. Biophys.*, **440**, 204 (2005).
- X. C. Abrevaya, N. Sacco, P. J. D. Mauas, and E. Cortón, "Archaea-based microbial fuel cell operating at high ionic strength conditions," *Extremophiles*, **15**, 633 (2011).
- L. Lu, D. Xing, T. Xie, N. Ren, and B. E. Logan, "Hydrogen production from proteins via electrohydrogenesis in microbial electrolysis cells," *Biosens. Bioelectron.*, **25**, 2690 (2010).
- S. S. L. Eileen et al., "Bioanode as a limiting factor to biocathode performance in microbial electrolysis cells," *Bioresour. Technol.*, **238**, 313 (2017).
- L. Wang, S. Trujillo, and H. Liu, "Selective inhibition of methanogenesis by acetylene in single chamber microbial electrolysis cells," *Bioresour. Technol.*, **274**, 557 (2019).
- Simon and P. M. H. Kroneck, "Microbial sulfite respiration," *Advances in Microbial Physiology*, **62**, 45 (2013).
- L. I. Dsmz et al., German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH Prokaryotic Nomenclature Up-to-date - compilation of all names of Bacteria and Archaea validly published according to the Bacteriological Code since (2020), <https://www.dsmz.de>.
- T. Fenchel and T. H. Blackburn, "Bacterial Metabolism," *Bacterial Biogeochemistry* (Academic Press, Denmark) 3rd ed., **1** (2012).
- M. Monachona, Albelda-Berenguera Magdalena, and Joseph Edith, "Biological oxidation of iron sulfides," *Adv. Appl. Microbiol.*, **107**, 1 (2019).
- W. A. Beatrix and W. Walter, "Root Zone Microbiology of Soilless Cropping Systems," *Soilless Culture* (Microbiology of growing media, Swedish) 2nd ed., **5**, 143 (2019).
- S. D. Siciliano and J. J. Germida, "Sulfur in Soils/Biological Transformations," *Encyclopedia of Soils in the Environment* (Elsevier, United States of America) **1**, 2200 (2005).
- W. Zhao and S. Ci, *Nanomaterials as Electrode Materials Of Microbial Electrolysis Cells For Hydrogen Generation. Key Laboratory of Jiangxi Province for Persistent Pollutants Control and Resources Recycle* (Nanchang Hangkong University, Nanchang, People's Republic of China) (2019).
- F. Harnisch and S. Freguia, "A basic tutorial on cyclic voltammetry for the investigation of electroactive microbial biofilms," *Chem. Asian J.*, **7**, 466 (2012).
- A. Vilar-Sanz, S. Puig, A. García-Lledó, R. Trias, M. D. Balaguer, J. Colprim, and L. Bañeras, "Denitrifying bacterial communities affect current production and nitrous oxide accumulation in a microbial fuel cell," *PLoS One*, **8**, e63460 (2013).
- K. J. M. Bishop, C. E. Wilmer, S. Soh, and B. A. Grzybowski, "Nanoscale forces and their uses in self-assembly," *Small*, **5**, 1600 (2009).
- R. J. Narayan, C. J. Berry, and R. L. Brigman, "Structural and biological properties of carbon nanotube composite films," *Mater. Sci. Eng. B*, **123**, 123 (2005).
- S. K. Manna et al., "Single-walled carbon nanotube induces oxidative stress and activates nuclear transcription factor- $\kappa$ B in human keratinocytes," *Nano Lett.*, **5**, 1676 (2005).
- H. Hu, Y. Fan, and H. Liu, "Hydrogen production using single-chamber membrane-free microbial electrolysis cells," *Water Res.*, **42**, 4172 (2008).
- D. Call and B. Logan, "Hydrogen Production in a Single Chamber Microbial Electrolysis Cell Lacking a Membrane," *Environ. Sci. Technol.*, **42**, 3401 (2008).
- A. A. Shvedova, E. R. Kisin, R. Mercer, A. R. Murray, V. J. Johnson, and A. I. Potapovich et al., "Unusual inflammatory and fibrogenic pulmonary responses to single-walled carbon nanotubes in mice," *Am. J. Phys. Lung Cell. Mol. Phys.*, **289**, L698 (2005).
- S. Xu, Y. Jiang, and M. Y. El-Naggar, "Disentangling the roles of free and cytochrome-bound flavins in extracellular electron transport from *Shewanella oneidensis* MR-1," *Electrochim. Acta*, **198**, 49 (2016).
- H. J. Wijma, L. J. C. Jeuken, M. P. Verbeet, F. A. Armstrong, and G. W. Canters, "A random-sequential mechanism for nitrite binding and active site reduction in copper-containing nitrite reductase," *J. Biol. Chem.*, **281**, 16340 (2006).
- K. Fricke, F. Harnisch, and U. Schröder, "On the use of cyclic voltammetry for the study of anodic electron transfer in microbial fuel cells," *Energy Environ. Sci.*, **1**, 144 (2008).
- M. Rosenbaum, F. Aulenta, M. Villano, and L. T. Angenent, "Cathodes as electron donors for microbial metabolism: which extracellular electron transfer mechanisms are involved," *Bioresour. Technol.*, **102**, 324 (2011).
- T. Doherty, J. G. Sunderland, E. P. L. Roberts, and D. J. Pickett, "An improved model of potential and current distribution within a flow-through porous electrode," *Electrochim. Acta*, **41**, 519 (1996).
- K. L. Straub, M. Benz, B. Schink, and F. Widdel, "Anaerobic, nitrate-dependent microbial oxidation of ferrous iron," *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 1458 (1996).
- S. Kato, K. Hashimoto, and K. Watanabe, "Microbial interspecies electron transfer via electric currents through conductive minerals," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **109**, 10042 (2012).
- P. Bertrand, B. Frangioni, S. Dementin, M. Sabaty, P. Amoux, B. Guigliarelli, D. Pignol, and C. Léger, "Effects of slow substrate binding and release in redox enzymes: theory and application to periplasmic nitrate reductase," *J. Phys. Chem. B*, **111**, 10300 (2007).
- H. Omidi and A. Sathasivan, "Optimal temperature for microbes in an acetate fed microbial electrolysis cell (MEC)," *Int. Biodeter. Biodegr.*, **85**, 688 (2013).
- S. M. Azab, M. Shehata, and A. M. Fekry, "A novel electrochemical analysis of the legal psychoactive drug caffeine using zeolites/MWCNT modified carbon paste sensor," *New J. Chem.*, **43**, 15359 (2019).
- A. M. Fekry, "A new simple electrochemical moxifloxacin hydrochloride sensor built on carbon paste modified with silver nanoparticles," *Biosens. Bioelectron.*, **87**, 1065 (2017).
- A. M. Fekry, S. M. Azab, M. Shehata, and M. A. Ameer, "Novel electrochemical nicotine biosensor based on cerium nanoparticles with anionic surfactant," *RSC Adv.*, **5**, 51662 (2015).
- J. A. Cole, "The rapid accumulation of large quantities of ammonia during nitrite reduction by *Escherichia coli*," *FEMS Microbiol. Lett.*, **4**, 327 (1978).
- A. D. Goddard, J. W. B. Moir, D. J. Richardson, and S. J. Ferguson, "Interdependence of two NarK domains in a fused nitrate/nitrite transporter," *Mol. Microbiol.*, **70**, 667 (2008).
- N. Akhtar et al., "High-affinity nitrate/nitrite transporters NrtA and NrtB of *Aspergillus nidulans* exhibit high specificity and different inhibitor sensitivity," *Microbiology Reading*, **161**, 1435 (2015).

## Résumé

L'utilisation des biocathodes dans les systèmes bioélectrochimiques (BES) pour éliminer les nitrates et les nitrites des eaux usées est devenue un domaine de recherche important. Notre objectif est d'étudier la capacité de certaines bactéries à éliminer les polluants grâce à un système électrochimique. A travers cette étude, nous tentons à expliquer un mécanisme de transfert de charge direct entre la bactérie et la cathode. À cette fin, nous avons choisi cinq espèces bactériennes, *Shewanella oneidensis* (MR1), *Thiobacillus denitrificans*, *Pseudomonas fluorescens*, et *Escherichia Coli*, incorporées comme catalyseurs dans des biofilms. Ces biofilms ont été employés dans un screening bactérien pour déceler le transfert extra cellulaire direct des électrons, ce qui a permis par la suite d'appliquer dans la réduction des nitrates et les nitrites dans le système bioélectrochimique (BES). Le screening bactérien a démontré le non capacité d'*Escherichia Coli* et *Pseudomonas fluorescens* à échanger les électrons directement avec la cathode et donc utilisées comme témoin. Cependant *Shewanella oneidensis* et *Thiobacillus denitrificans* ont montré une activité électrochimique par le biais de la voltammétrie cyclique et l'ampérométrie aux potentiels de -0,35 V et -0,7 V vs Ag/Ag Cl respectivement, au cours de la réduction des nitrates et nitrites par MR1, et à différentes concentrations de nitrate ; 0 mM ; 10 mM ; 20 mM ; 40 mM ; 60 mM et 80 mM, sous contrôle de température fixée à 30 °C. Les résultats obtenus montrent une augmentation de 30 J /Aμ cm2 est obtenue à chaque 20 Mm de nitrite rajoutée, ce qui correspond à 50 J /Aμ cm2 et 80 J /Aμ cm2 avec MR-1. La densité du courant a atteint -145 J/μAcm2, ce qui est 10 fois plus de plus grande. Le pic est observé au voisinage de -0,46 V, dans le cas de T. denitrificans, Chez MR1 une augmentation est enregistrée avec un pic de -150 J/μA cm2 au voisinage de -0,45 V. Une influence de la concentration bactérienne avec MR1 a donné en présence du NO-3 Une augmentation de 0.15 et 0.02 J /μA cm2 est enregistrée respectivement à partir d'une DO de 0.4 et 0.6. Cependant, elle disparaît à une DO de 0.2. Nous avons également établi un modèle de transfert de charge et de matière à partir des données d'impédance. Les résultats obtenus avec la variation de concentrations bactériennes, nous permettent d'aller vers la possibilité de faire un modèle de biocapteur bactérien. Les travaux sur l'électrolyseur inoculé par les boues sédimentaires des eaux saumâtres d'Ourgla, ont été testé pour leur rendement en biohydrogène, suite à un couplage entre fermentation et bioélectrochimie.

Mots-clés: Biodénitrification , Système Bioélectrochimique, Voltammétrie cyclique, Biofilms, Cellule électrochimique microbienne, Nitrate reductase.

## Abstract

The use of biocathodes in bioelectrochemical systems (BES) to remove nitrates and nitrites from wastewater has become an important area of research. Our goal is to study the ability of certain bacteria to eliminate pollutants using an electrochemical system. Through this study, we try to explain a direct charge transfer mechanism between the bacteria and the cathode. To this end we have chosen five bacterial species, *Shewanella oneidensis*, *Thiobacillus denitrificans*, *Pseudomonas fluorescens*, and *Escherichia Coli*, incorporated as catalysts in artificial biofilms designed by us in the laboratory during the work of the thesis. These biofilms were used in a bacterial screening to decelerate the direct extracellular transfer of electrons, which subsequently made it possible to apply in the reduction of nitrates and nitrites in the bioelectrochemical system (BES). Bacterial screening demonstrated the inability of *Escherichia Coli* and *Pseudomonas fluorescens* to exchange electrons directly with the cathode and used as a control. However, *Shewanella oneidensis* and *Thiobacillus denitrificans* showed electrochemical activity through cyclic voltammetry and amperometry a potential of -0.35 V and -0.7 V vs Ag / Ag Cl respectively, during the reduction of nitrates and nitrites by MR1, and at different concentrations of nitrate; 0 mM; 10 mM; 20 mM; 40 mM; 60 mM and 80 mM, under temperature control fixed at 30 °C. The results obtained show an increase of 30 J /Aμ cm2 is obtained with each 20 Mm of nitrite added, which corresponds to 50 J /Aμ cm2 and 80 J /Aμ cm2 with MR-1. The current density reached -145 J/μA cm2, which is 10 times greater, the peak is observed in the vicinity of -0.46 V, in the case of T. denitrificans, In MR1 an increase is recorded with a peak of -150 J/μA cm2 in the round of -0.45 V. An influence of the bacterial concentration with MR1 gave in the presence of NO-3 an increase of 0.15 and 0.02 J /μA cm2 is recorded respectively from an OD of 0.4 and 0.6. However, it disappears at an OD of 0.2. We also established a change transfer model from the impedance data. The results obtained with the variation of bacterial concentrations, we allow to go towards the possibility of making a model of bacterial sensor and nitrate sensor. The work on the electrolyzer inoculated with sedimentary sludge from the brackish waters of Ourgla, has been tested for its biohydrogen yield, following a coupling between fermentation and bioelectrochemistry.

**Keywords:** Bionitrification, Bioelectrochemical system, cyclic voltametry, Microbial electrochemical cell, Nitrate reductase; Biofilm.

## المخلص

أصبح استخدام الكاثودات الحيوية في الأنظمة الكهروكيميائية الحيوية (BES) لإزالة النترات والنترات من مياه الصرف مجالاً مهماً للبحث. هدفنا دراسة قدرة بعض البكتيريا على التخلص من الملوثات باستخدام نظام كهروكيميائي. من خلال هذه الدراسة، نحاول شرح آلية نقل الشحنة المباشرة بين البكتيريا والكاثود لتحقيق هذه الغاية، اخترنا خمسة أنواع من البكتيريا، *Shewanella oneidensis* و *Thiobacillus denitrificans* و *Pseudomonas fluorescens* و *Escherichia Coli*، والتي تم دمجها كمحفزات في الأغشية الحيوية الاصطناعية التي صممناها في المختبر أثناء عمل الأظروحة. تم استخدام هذه الكائنات الحيوية في الفحص البكتيري لإبطاء النقل المباشر خارج الخلية للإلكترونات، مما جعل من الممكن لاحقاً تطبيقه في تقليل النترات والنترات في النظام الكهروكيميائي الحيوي. أظهر الفحص البكتيري عدم قدرة *Escherichia Coli* و *Pseudomonas fluorescens* على تبادل الإلكترونات مباشرة مع الكاثود واستخدامها كعنصر تحكم. ومع ذلك، أظهر *Shewanella oneidensis* و *Thiobacillus denitrificans* نشاطاً كهروكيميائياً من خلال قياس الجهد الدوري وقياس التيار بقوة 0.35 فولت و 0.7 فولت مقابل Ag / Ag Cl على التوالي، أثناء تقليل النترات والنترات بواسطة MR1، وبتركيزات مختلفة من النترات؛ 0 مم 10 ملم 20 ملم 40 ملم 60 ملم و 80 ملم، تحت درجة حرارة ثابتة (30 درجة مئوية). أظهرت النتائج المتحصل عليها زيادة 30 J / Aμ سم مع إضافة كل 20 ملم من النترات، والذي يتوافق مع 50 J / Aμ سم و 80 J / Aμ سم مع MR-1. وصلت الكثافة الحالية إلى -145 J / A سم 2، وهي أكبر بـ 10 مرات، لوحظت الذروة في جولة 0.46- فولت، في حالة T. denitrificans، في MR1 تم تسجيل زيادة مع ذروة 150 J / μA سم 2 في جولة 0.45- فولت. أعطى تأثير التركيز البكتيري مع MR1 في وجود NO-3 زيادة قدرها 0.15 و 0.02 J / A سم على التوالي من 0.4 و 0.6. ومع ذلك، فإنه يختفي عند OD 0.2. أنشأنا أيضاً نموذج نقل التغيير من بيانات الممانعة. النتائج التي تم الحصول عليها مع تباين التركيزات البكتيرية، تسمح بالتوجه نحو إمكانية صنع نموذج لمستشعر البكتيريا ومستشعر النترات. تم اختبار العمل على المحلل الكهربائي الملقح بالحماة الرسوبية من المياه قليلة الملوحة في ورقلة، من أجل إنتاج الهيدروجين الحيوي، بعد اقتران بين التخمر والكيمياء الكهربية الحيوية.