



HAL
open science

Piles à combustible microbiennes pour la production d'électricité couplée au traitement des eaux de l'industrie papetière

Françoise Ketep

► **To cite this version:**

Françoise Ketep. Piles à combustible microbiennes pour la production d'électricité couplée au traitement des eaux de l'industrie papetière. Autre. Université de Grenoble, 2012. Français. NNT : 2012GRENI066 . tel-00872058

HAL Id: tel-00872058

<https://theses.hal.science/tel-00872058>

Submitted on 11 Oct 2013

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Matériaux, Mécanique, Génie civil, Electrochimie**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Françoise Stéphanie KETEP

Thèse dirigée par **Alain BERGEL**
coencadrée par **Eric Fourest**

préparée au sein du **Laboratoire de Génie Chimique de Toulouse...**

dans l'**École Doctorale Ingénierie – Matériaux Mécanique
Energétique Environnement Procédés Production...**

Piles à combustible microbiennes pour la production d'électricité couplée au traitement des eaux de l'industrie papetière

Thèse soutenue publiquement le **09 novembre 2012**,
devant le jury composé de :

M. Gérard MERLIN

Professeur à l'Université de Savoie, Président

M. Jack LEGRAND

Professeur à l'Université de Nantes, Rapporteur

M. Mathieu SPERANDIO

Professeur à l'INSA de Toulouse, Rapporteur

M. Renaut MOSDALE

PDG PaxiTech de Grenoble, Examineur

Mme Wafa ACHOUAK

Directrice de recherche, CEA Cadarache, Invité

M. Eric FOUREST

Chef de projet au CTP de Grenoble, Co-encadrant

M. Alain BERGEL

Directeur de recherche au LGC de Toulouse, Directeur



A mon père,

Je garderai toujours dans mon âme ton amour et ton sacrifice pour ta famille...

Remerciements

Ce mémoire est l'aboutissement de trois années d'étude réalisées en contrat CIFRE au sein du Centre Technique du Papier à Grenoble en parallèle avec le Laboratoire de Génie Chimique de Toulouse.

Je tiens à remercier en premier lieu mon directeur de thèse Alain Bergel qui a été à l'initiative du projet Agri-Elec dans lequel s'inscrit cette thèse. Ses exceptionnelles qualités individuelles et académiques, sa patience, son savoir, son attention, son implication constante et ses conseils m'ont inspiré et continueront de le faire. Il m'a appris la patience, la persévérance et peut-être je l'espère la rigueur scientifique. Je le remercie d'avoir su trouver les mots justes lorsque le désespoir a pu parfois m'habiter et d'avoir corrigé mon manuscrit avec le plus grand soin. Cela a été un très grand honneur d'être son élève, et un privilège que je n'oublierai pas. J'espère que le présent travail et mes futurs travaux lui rendront digne hommage. S'il est vrai que l'influence du directeur de thèse se fait ressentir tout au long de la carrière d'un chercheur, je suis plus que ravie de ce coup du sort.

Ma gratitude va également à Eric Fourest qui a été mon encadrant au sein de l'unité «énergie et développement durable» au Centre Technique du Papier. Merci de m'avoir fait confiance en me donnant l'opportunité d'intégrer le monde merveilleux des piles à combustibles microbiennes. Merci également pour ta disponibilité, tes conseils judicieux, ton honnêteté scientifique, ton implication dans le projet et ton expertise scientifique dans le domaine du traitement d'effluents qui a été d'une grande valeur pour moi. Tes critiques toujours enrichissantes et tes coups de mains de temps en temps sur les manip ont permis de créer d'excellentes conditions d'encadrement au long de ces trois années et demi qu'ont duré notre collaboration depuis mon stage de master.

Je remercie les membres du jury pour le temps et l'attention qu'ils ont bien voulu prêter à mon travail, ainsi que pour leurs remarques et leurs questions qui m'ont permis de l'améliorer et de prendre du recul. Il s'agit de: Jack Legrand et Matthieu Sperandio qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'être les rapporteurs de ce travail de thèse; Renaut Mosdale et Wafa Achouak pour avoir accepté respectivement les places d'examineur et invité et enfin à Gérard Merlin qui a présidé le Jury.

Cette thèse a été enrichie par de nombreuses collaborations dans le cadre du projet «Agri-Elec ». À ce titre, je remercie tous les membres du projet pour l'ambiance plus que chaleureuse qui ne donnait pas l'impression de travailler durant nos longues réunions de projet. Merci pour les multiples anniversaires d'Alain tous les semestres, les déconnades autour des repas et surtout l'expérience inoubliable des tortues en Guyanne. Un petit clin d'œil à Wafa pour les DDGE, Annette pour les cathodes et Luc pour les boîtes à résistances.

Je tiens également à remercier Benjamin Erable et Delphine Caprieri pour leur aide précieuse dans la relecture de mon manuscrit

Merci à tous les techniciens qui m'ont à un moment ou à un autre donné un coup de main pour la réalisation des expériences. Merci pour le fameux transport des bouteilles d'azote.

Merci à Eric et Vincent pour leurs discussions intéressantes mais très souvent intrigantes pour moi qui ont égayé mes journées longues et fatigantes. Grâce à vous je ne mourrai pas «ignorante»! Un merci tout spécial à Eric pour les nombreux moments sympas que nous avons organisé en dehors de l'ambiance tendue du boulot.

Merci à Céline ma «voisine de bureau» pour nos échanges. Ta bonne humeur et ta gentillesse ont rendu mon séjour au CTP agréable. Ça été un plaisir pour moi de te côtoyer durant ces 3 ans et demi et je garde d'excellents souvenirs ancrés dans ma mémoire. Merci de m'avoir fait découvrir les concerts live. Par contre, j'attends toujours les leçons de natation que tu m'avais promises.

Mes pensées affectueuses vont à mes proches et amis pour leur soutien et leurs encouragements constants. Je pense notamment à Harris avec qui je découvre tous les jours la beauté de l'amitié véritable. Cela va faire plus de 15 ans que ton amitié me transporte, merci pour ce cadeau rare. Merci également à Yolande et Aïssatou mes copines de toujours du Cameroun, à Gérard mon ami du Canada, ainsi qu'à Iya-sou, Stéphane et Thiery mes amis de France. Merci pour votre présence indéfectible à mes côtés, vous avez chacun à votre façon contribué à cette aventure. Un merci ému à Florence, « ma sœur » qui a pris en main avec beaucoup d'abnégation l'organisation de la réception donnée pour ma soutenance.

Un grand merci à toute ma grande famille (Grands-parents, parents, frères, cousins, oncles, nièces...La famille Africaine!!!). Merci pour votre soutien sans faille malgré la distance. Vous n'avez jamais douté de mes capacités et m'avez toujours donné tout le réconfort et infusé tout le courage possible quand j'en avais besoin. Une pensée spéciale à mes frères et sœurs, puissions-nous toujours rester aussi soudés!

Cette liste n'est bien sûr pas exhaustive, aussi je remercie tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation de ce travail.

Merci à tous et en route pour la suite...

TABLE DE MATIERE

| | |
|---|-----------|
| Introduction générale | 27 |
| | |
| Chapitre I: Contexte scientifique | 33 |
| | |
| I.1. Introduction..... | 35 |
| I.1.1. Besoin énergétique | 35 |
| I.1.2. Energies alternatives | 35 |
| I.1.3. Piles à combustible classiques (PAC)..... | 37 |
| I.2. Les biofilms | 41 |
| I.2.1. Définition | 41 |
| I.2.2. Formation des biofilms..... | 41 |
| I.2.3. Problèmes liés aux biofilms..... | 43 |
| I.2.4. Rôles positifs des biofilms | 43 |
| I.2.5. Les biofilms électro-actifs (EA) | 44 |
| I.3. Les piles à combustible microbiennes (PACMs) | 45 |
| I.3.1. Historique (Schroder 2007; Davis et Higson 2007)..... | 45 |
| I.3.2. Principe de fonctionnement des PACMs | 47 |
| I.3.3. Les bioanodes | 48 |
| I.3.3.1. Mécanismes de transfert d'électrons vers l'anode (Lovley 2006a; Schroder 2007)..... | 48 |
| I.3.3.1.1. Oxydation abiotique de composés issus du métabolisme bactérien | 48 |
| I.3.3.1.2. Transfert électronique par médiateurs | 50 |
| I.3.3.1.2.1. Médiateurs redox artificiels (médiateurs exogènes) | 50 |
| I.3.3.1.2.2. Bactéries qui produisent leurs propres médiateurs (médiateurs endogènes) ... | 51 |
| I.3.3.1.3. Transfert électronique direct..... | 52 |
| I.3.3.2. Constitution des biofilms électro-actifs: cultures pures ou communautés mixtes | 53 |
| I.3.4. Les cathodes abiotiques (He et Angenent 2006; Du <i>et al.</i> 2007; Watanabe 2008)..... | 54 |
| I.3.5. Les biocathodes (He et Angenent 2006) | 56 |
| I.3.5.1. Biocathodes en milieux aérobies (Lovley 2006a; He et Angenent 2006; Schampelaire <i>et al.</i> 2008) | 57 |

| | |
|--|-----------|
| I.3.5.2. Biocathodes en milieux anaérobies..... | 58 |
| I.3.6. Les constituants d'une PACM..... | 60 |
| I.3.6.1. Les matériaux d'anode..... | 60 |
| I.3.6.2. Les matériaux de cathode | 60 |
| I.3.6.3. Le séparateur, la membrane échangeuse d'ions..... | 61 |
| I.3.6.4. Les substrats..... | 61 |
| I.3.7. Différentes architectures de PACMs..... | 62 |
| I.3.7.1. PACMs à deux compartiments | 62 |
| I.3.7.2. PACMs à un compartiment..... | 65 |
| I.3.7.2.1. Systèmes de PACM à un compartiment avec membrane | 65 |
| I.3.7.2.2. Systèmes de PACM à un compartiment sans membrane | 67 |
| I.3.8. Piles à combustible en série ou en parallèle..... | 68 |
| I.3.9. Pilotes de PACMs | 69 |
| I.3.10. Grandeurs caractéristiques des PACMs..... | 70 |
| I.3.10.1. Caractéristiques thermodynamiques (Logan et Regan 2006a) | 70 |
| I.3.10.2. Différentes surtensions (Logan et Regan 2006a; Lee <i>et al.</i> 2008)..... | 72 |
| I.3.10.2.1. Surtension d'activation | 73 |
| I.3.10.2.2. Chutes ohmiques..... | 74 |
| I.3.10.2.3. Surtension de concentration..... | 75 |
| I.3.10.2.4. Cas des PACMs | 75 |
| I.3.11. Méthodes de caractérisation des PACMs | 76 |
| I.3.11.1. La puissance..... | 76 |
| I.3.11.2. Les courbes de polarisation..... | 78 |
| I.3.11.3. Le rendement faradique | 79 |
| I.3.11.4. La relation entre le potentiel d'anode et le métabolisme microbien (Schroder 2007; Aelterman <i>et al.</i> 2008; Pham <i>et al.</i> 2009). | 80 |
| I.3.12. Applications..... | 81 |
| I.3.12.1. La production d'hydrogène..... | 81 |
| I.3.12.2. Le traitement d'effluents..... | 82 |
| I.3.12.3. La biorémediation (Cunningham <i>et al.</i> 2003; Logan et Regan 2006a; Lovley 2006a). | 86 |
| I.3.12.4. Les capteurs environnementaux..... | 87 |
| I.3.13. PACM et effluents papetiers..... | 87 |
| Conclusion..... | 90 |

Chapitre II: Matériels et méthodes.....91

| | |
|---|------------|
| II.1. Echantillons industriels et milieu synthétique | 93 |
| II.1.1. Effluents et biofilms du site N°1..... | 93 |
| II.1.2. Effluents et biofilms du site N°2..... | 94 |
| II.1.2.1. L'effluent sortie méthaniseur | 95 |
| II.1.2.2. Les rejets de la station d'épuration..... | 96 |
| II.1.3. Effluents et biofilms du site N°3..... | 96 |
| II.1.3.1. L'échantillon «Effluent machine à papier» (MaP) | 97 |
| II.1.3.2. L'échantillon «Effluent entrée biologique» (E B) | 97 |
| II.1.3.3. L'échantillon «Effluent sortie de station d'épuration» (STEP)..... | 97 |
| II.1.4. Milieu de culture synthétique pour les bactéries anaérobies | 98 |
| II.2. Méthodologie de formation des bioanodes sous potentiel imposé..... | 99 |
| II.2.1. Montage expérimental en système 3 électrodes..... | 99 |
| II.2.1.1. Les réacteurs | 99 |
| II.2.1.2. Electrodes et prétraitements | 100 |
| II.2.2. Sélection et repiquage des biofilms anodiques..... | 101 |
| II.2.3. Techniques électrochimiques | 102 |
| II.2.3.1. Chronoampérométrie (C A)..... | 102 |
| Calculs des densités de courant et rendements faradiques..... | 103 |
| II.2.3.2. Voltammétrie Cyclique (V C) | 103 |
| II.2.4. Modes d'alimentation | 105 |
| II.2.4.1. Alimentation batch | 105 |
| II.2.4.2. Alimentation batch séquentielle | 105 |
| II.2.4.3. Alimentation continue | 105 |
| II.3. Expérimentation en piles semi-microbiennes..... | 105 |
| II.3.1. Cathode à air | 105 |
| II.3.2. Première version du prototype de pile semi-microbienne..... | 107 |
| II.3.3. Deuxième version du prototype de pile semi-microbienne..... | 107 |
| II.3.4. Caractérisation des piles semi-microbiennes: courbes de puissance..... | 108 |
| II.3.4.1. Première version du prototype..... | 108 |
| II.3.4.2. Deuxième version du prototype..... | 108 |
| II.4. Caractérisation des effluents et des biofilms..... | 109 |
| II.4.1. La Demande Chimique en Oxygène (DCO)..... | 109 |

| | |
|---|------------|
| Calcul des rendements et incertitudes..... | 109 |
| II.4.2. La Demande Biologique en Oxygène (DBO₅) | 110 |
| II.4.3. Les Acides Gras Volatiles (AGV)..... | 110 |
| II.4.4. Carbone inorganique, carbone total, dureté de l'effluent | 111 |
| II.4.5. Techniques microscopiques..... | 111 |
| II.4.5.1. Microscopie à épifluorescence | 111 |
| II.4.5.2. Microscopie Electronique à Balayage (MEB)..... | 112 |
| II.4.6. Méthodes microbiologiques..... | 112 |
| II.4.6.1. La méthode DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)..... | 112 |
| II.4.6.2. Mesure de la flore totale | 113 |

Chapitre III: Détection et sélection de biofilms anodiques dans les circuits d'eau des procédés papetiers115

| | |
|--|------------|
| III.1. Approche expérimentale..... | 117 |
| III.1.1. Etat de l'art | 117 |
| III.1.2. Choix du potentiel imposé pour former une bioanode..... | 120 |
| III.2. Résultats | 122 |
| III.2.1. Conditions opératoires | 122 |
| III.2.2. Etude des échantillons d'une lagune aérobie du Site N°1 | 123 |
| III.2.2.1. Référencement des biofilms formés à partir des échantillons de lagune..... | 123 |
| III.2.2.2. Article N°1 | 124 |
| III.2.2.3. Commentaires sur l'article N°1 | 142 |
| III.2.2.4. Résultats complémentaires non présentés dans l'article N°1 | 143 |
| III.2.3. Etude des échantillons issus d'un méthaniseur du Site N°2 | 144 |
| III.2.3.1. Formation du biofilm primaire..... | 145 |
| III.2.3.2. Formation des biofilms secondaires..... | 146 |
| III.2.4. Etude des échantillons du Site N°3..... | 147 |
| III.2.4.1. Echantillons du site N°3 collectés sur la machine à papier et en entrée du traitement biologique..... | 147 |
| III.2.4.1.1. Référencement des biofilms formés et repiqués | 147 |
| III.2.4.1.2. Article N°2..... | 148 |
| III.2.4.1.3. Commentaires sur l'article N°2 | 163 |
| III.2.4.1.4. Résultats complémentaires non présentés dans l'article N°2..... | 163 |

| | |
|---|------------|
| III.2.4.2. Echantillons du site N°3 prélevés en sortie de la station d'épuration | 165 |
| III.2.4.2.1. Référencement des biofilms formés et repiqués | 165 |
| III.2.4.2.2. Formation des biofilms électro-actifs primaires | 165 |
| III.2.4.2.3. Repiquages du biofilm primaire formé à -0,2V | 166 |
| ❖ Premier repiquage au même potentiel (-0,2V) | 166 |
| ❖ Second repiquage du biofilm (R1) en abaissant le potentiel de -0,2 V à -0,4 V | 168 |
| III.2.4.2.4. Repiquages du biofilm primaire formé à +0,2V | 168 |
| ❖ Premier repiquage en abaissant le potentiel de +0,2 V à -0,2 V..... | 168 |
| ❖ Deuxième repiquage du biofilm en abaissant le potentiel de -0,2 V à -0,3 V | 170 |
| III.2.4.2.5. Evolution de la composition des biofilms au cours des repiquages..... | 172 |
| III.3. Discussion générale des différents résultats issus des 3 sites..... | 173 |
| Conclusion..... | 176 |
| | |
| Chapitre IV: Optimisation des performances des biofilms anodiques en batch avec acétate..... | 177 |
| | |
| IV.1. Effet du matériau et de la surface des électrodes | 179 |
| ❖ Influence de la concentration en acétate | 182 |
| ❖ Influence du rapport surface de l'électrode/volume du réacteur | 182 |
| IV.2. Confirmation du choix du potentiel imposé..... | 183 |
| IV.3. Effet de la filtration de l'effluent à 0,2 µm | 185 |
| IV.4. Effet de la composition du milieu et de la quantité de milieu synthétique. | 187 |
| IV.5. Effet de l'enrichissement de l'inoculum | 188 |
| IV.6. Mise en conditions anaérobie par barbotage gazeux..... | 189 |
| IV.6.1. Effets comparés du barbotage d'azote et de l'agitation | 189 |
| IV.6.2. Effets comparés des barbotages N ₂ et N ₂ /CO ₂ | 190 |

| | |
|--|------------|
| IV.6.3. Expériences témoins de l'évolution du pH et de l'abatement de la DCO sans polarisation | 192 |
| IV.7. Essais de polarisation retardée pour la formation de biofilms EA ... | 195 |
| Conclusion..... | 196 |

Chapitre V: Optimisation des bioanodes en conditions industrielles.....199

Introduction201

V.1. Expériences réalisées en alimentation continue.....202

V.1.1. Effluent sortie méthaniseur 202

V.1.1.1. Vérification des conditions de stockage des effluents..... 202

V.1.1.2. Formation des biofilms EA en présence d'acétate 203

V.1.1.3. Formation de biofilms EA avec l'effluent brut 204

V.1.1.3.1. Voltammétries cycliques à différents stades du développement du biofilm 205

V.1.1.3.2. Voltammétries cycliques à différentes vitesses de balayage..... 206

V.1.1.4. Suivi de l'abatement de DCO de l'effluent brut et du rendement faradique..... 207

V.1.1.5. Effet du temps de rétention hydraulique (TRH) à flux de DCO variable..... 211

V.1.1.6. Effet du temps de rétention hydraulique (TRH) à flux de DCO constant..... 215

V.1.1.7. Effet de la concentration de l'effluent..... 217

V.1.2. Caractérisations microbiologiques (DGGE) 221

V.1.3. Effluent entrée biologique..... 222

V.1.3.1. Formation d'un biofilm EA avec l'effluent brut 222

V.1.3.2. Effet du flux de DCO sur les performances du biofilm EA 223

V.2. Alimentation en batch séquentielle225

V.2.1. Polarisation retardée des électrodes - effet du barbotage de N₂..... 225

V.2.1.1. Biofilm formé sous barbotage continu de N₂ dès le début 225

V.2.1.2. Biofilm formé sans barbotage continu de N₂ dès le début 227

V.2.2. Contrôle du pH par barbotages de N₂ ou CO₂ 230

V.2.2.1. Contrôle du pH par barbotage continu de N₂ 230

V.2.2.2. Contrôle du pH par barbotages de CO₂ et N₂..... 231

| | |
|---|------------|
| V.2.2.3. Expériences témoins sans polarisation | 234 |
| V.2.3. Etude de l'effet des nutriments | 236 |
| V.2.3.1. Biofilm formé initialement sans nutriments | 237 |
| V.2.3.2. Biofilms formés avec les nutriments | 239 |
| Conclusion..... | 241 |

Chapitre VI: Conception et évaluation de piles microbiennes dans des effluents papetiers245

Introduction247

VI.1. Première version du prototype247

| | |
|--|------------|
| VI.1.1. Conditions expérimentales | 247 |
| VI.1.2. Effluent sortie méthaniseur (SM) | 248 |
| VI.1.2.1. Comparaison de deux modes d'alimentation (batch vs continue) | 248 |
| VI.1.2.2. Etude de différentes cathodes à air | 252 |
| VI.1.2.3. Effet de l'ajout des nutriments dans l'effluent..... | 256 |
| VI.1.3. Effluent entrée biologique (EB) | 259 |
| VI.1.3.1. Formation du biofilm EA..... | 259 |
| VI.1.3.2. Caractérisation du biofilm en pile..... | 260 |

VI.2. Deuxième version du prototype261

| | |
|---|------------|
| VI.2.1. Configuration du prototype pour la formation des biofilms EA | 261 |
| VI.2.2. Configuration du prototype pour le fonctionnement en pile | 262 |
| VI.2.3. Etude de différentes membranes | 263 |
| VI.2.3.1. Formation des biofilms EA..... | 264 |
| VI.2.3.2. Caractérisations des piles avec différentes membranes | 265 |
| VI.2.4. Effet du barbotage de gaz | 267 |
| VI.2.4.1. Formation des biofilms EA..... | 267 |
| VI.2.4.2. Caractérisation des piles | 270 |
| VI.2.5. Performance des biofilms secondaires en piles | 272 |
| VI.2.5.1. Formation des biofilms anodiques primaires et secondaires..... | 272 |
| VI.2.5.2. Caractérisation en pile des biofilms secondaires | 274 |
| VI.2.6. Formation des biofilms EA en système à 2 ou 3 électrodes..... | 275 |

| | |
|--|------------|
| VI.2.6.1. Biofilms formés en piles (systèmes à 2 électrodes) | 276 |
| VI.2.6.1.1. Biofilms primaires | 276 |
| VI.2.6.1.2. Biofilms secondaires..... | 277 |
| VI.2.6.2. Biofilms formés sous polarisation (systèmes à 3 électrodes)..... | 278 |
| VI.3. Comparaison des performances des deux versions des prototypes de piles..... | 280 |
| Conclusion..... | 281 |
| | |
| Conclusion générale et perspectives | 283 |
| | |
| Conclusion générale | 285 |
| Perspectives | 288 |
| | |
| References Bibliographiques | 291 |
| | |
| Résumé/ Abstract..... | 315 |

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|---|-----|
| Tableau 1: Principales caractéristiques des différents types de piles à combustibles classiques. AFC: Alcaline Fuel cell, PEMFC: Proton Exchange Membrane Fuel Cell, PAFC: Phosphoric Acid Fuel Cell, MCFC: Molten Carbonate Fuel Cell, SOFC: Solid Oxide Fuel Cell (Larminie et Dicks 2003; Miachon 1995; Mainka 2011)..... | 38 |
| Tableau 2: Quelques couples, potentiels standards et réactions redox pouvant avoir lieu aux électrodes de PACMs à pH 7 (Rabaey et Verstraete 2005; He et Angenent 2006; Schroder 2007)..... | 59 |
| Tableau 3: Quelques PACMs liées au traitement d'effluents présentées par ordre chronologique. Abat DCO : abattement de DCO, TRH : temps de rétention hydraulique, Rf : rendement faradique | 85 |
| Tableau 4: Récapitulatif de la composition des différents échantillons prélevés dans différents sites papetiers..... | 98 |
| Tableau 5: Performances de biofilms électro-actifs secondaires et tertiaires formés avec les échantillons Lagune qui ne sont pas présentés dans l'article N°1..... | 144 |
| Tableau 6: Performances de différents biofilms électro-actifs R0' et R1' formés avec les échantillons Machine à Papier (MaP) et entrée biologique (EB) pas présentés dans l'article N°2 | 164 |
| Tableau 7: Densités de courant (J) et rendements faradiques (Rf) de biofilms secondaires formés dans un dispositif N-stat avec des électrodes en tissu et feutre de carbone de surfaces différentes..... | 182 |
| Tableau 8: Performances du biofilm EA présenté Figure 66 | 208 |
| Tableau 9: Evolution du Rendement faradique (Rf) et de l'abattement de la DCO des expériences présentés Figure 70 | 212 |
| Tableau 10: Performances de biofilms EA formés en parallèle et présentés sur la Figure 73 (A= expérience A et B = expérience B) et d'une expérience témoin réalisée dans les mêmes conditions opératoires avec des électrodes non polarisées (T = expérience témoin). | 216 |
| Tableau 11: Rendements faradiques (Rf) et abattements de DCO produits par les biofilms présentés sur la Figure 75 . Les valeurs en rouge représentent les abattements de DCO de l'expérience témoin. | 219 |
| Tableau 12: Rendements faradiques (Rf) et abattements de DCO produits par les biofilms présentés sur la Figure 78 | 223 |
| Tableau 13: Performances du biofilm EA présenté sur la Figure 79 | 224 |
| Tableau 14: Evolution du pH, rendement faradique et abattement de DCO au cours du temps pour l'expérience de la Figure 80 | 226 |
| Tableau 15: Evolution des caractéristiques pH, rendement faradique et abattement de DCO au cours du temps du biofilm de la Figure 82 | 228 |
| Tableau 16: Moyennes hebdomadaires des différents paramètres pH, rendement faradique et abattement de DCO lors de l'expérience CA de la Figure 84 | 231 |
| Tableau 17: Evolution des paramètres pH, rendement faradique et abattement de DCO lors de l'expérience CA de la Figure 85 | 233 |
| Tableau 18: Evolution du pH et de l'abattement de la DCO lors de l'expérience témoin sous différents barbotages de gaz..... | 235 |
| Tableau 19: Moyenne sur deux semaines de l'évolution des différents paramètres physico-chimiques de l'effluent brut, Biofilm EA: réacteur sous polarisation, T: réacteur témoin. | 236 |
| Tableau 20: Effet des nutriments. Effluent sans nutriments du jour 0 au jour 24, puis avec nutriments à partir du jour 24..... | 238 |

| | |
|--|-----|
| Tableau 21: Effet des nutriments. Du jour 0 au jour 26, effluent avec nutriments à la proportion industrielle puis à partir du jour 26, l'effluent sans nutriments..... | 240 |
| Tableau 22: Effet des nutriments. Du jour 0 au jour 26, effluent avec nutriments à 1/5 de la proportion industrielle puis à partir du jour 26, l'effluent sans nutriments..... | 240 |
| Tableau 23: Performances du prototype lors de la formation du biofilm EA et de la caractérisation en pile en fonction du mode d'alimentation. La cathode standard a été utilisée (0,5 mg/cm ² de Pt, 20% PTFE + membrane polyoléfine)..... | 248 |
| Tableau 24: Performances du biofilm EA formé en alimentation continue (TRH 24h) avec l'effluent sortie méthaniseur brut à -0,3 V et sous barbotage continu de N ₂ | 252 |
| Tableau 25: Performances de la pile avec différentes cathodes en alimentation continue avec l'effluent brut ou batch avec l'effluent complétementé avec de l'acétate. | 253 |
| Tableau 26: Performances des biofilms formés avec et sans ajout de nutriments dans l'effluent sortie méthaniseur en alimentation batch séquentielle pour un TRH de 48h et sous barbotage continu de N ₂ . Les valeurs maximales des caractéristiques de la pile sont obtenues au premier jour de caractérisation. | 256 |
| Tableau 27: Performances du biofilm EA de la Figure 98 | 259 |
| Tableau 28: Puissances délivrées par les piles équipées de cathodes à air sur lesquelles sont fixées différentes membranes..... | 266 |
| Tableau 29: Effet du barbotage des gaz N ₂ et CO ₂ sur les performances des biofilms EA et des piles. En orange, performance obtenue après avoir changé la cathode..... | 269 |
| Tableau 30: Performances des biofilms primaires et secondaires présentés sur la Figure 105 | 274 |
| Tableau 31: Performances des bioanodes primaires et secondaires formées dans les prototypes de piles (p) et dans les réacteurs (r). Elles sont ensuite caractérisées en pile avec la cathode à air de type standard Lles différentes électrodes sont des tissus de carbone de 25 cm ² | 279 |

LISTE DES FIGURES

| | |
|---|----|
| Figure 1: Récapitulatif des applications et avantages majeurs des principales piles à combustible classiques. Adapté de (Larminie et Dicks 2003). | 39 |
| Figure 2: Principe de fonctionnement d'une pile à membrane échangeuse de protons. | 39 |
| Figure 3: Les 5 étapes de maturation d'un biofilm. 1: attachement initial; 2: attachement irréversible; 3: colonisation et croissance; 4 maturation ; 5: dispersion. Les photomicrographies (toutes à même échelle) sont celles d'un biofilm de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en développement. (Davis, 2008): | 42 |
| Figure 4: Schémas de piles à combustible. A: totalement microbienne, B: semi-microbienne anodique | 47 |
| Figure 5: Transfert d'électrons à l'anode via l'oxydation des produits de la fermentation (Schroder 2007). | 49 |
| Figure 6: Transfert d'électrons à l'anode via les médiateurs artificiels (Schroder 2007). | 51 |
| Figure 7: Transfert électronique via des médiateurs endogènes. Deux mécanismes redox possibles: via les protéines externes membranaires (cytochromes) ou via les couples redox du périplasma ou du cytoplasme (Schroder 2007). | 52 |
| Figure 8: Deux mécanismes de transfert possibles: A= via les cytochromes membranaires; B= via les pilis ou «nanowires» conducteurs (Schroder 2007). | 52 |
| Figure 9: Mécanisme de transfert indirect entre les bactéries (A) mangano-oxydantes (Rhoads et al. 2005) et (B) ferro-oxydantes (Heijne et al. 2006) | 58 |
| Figure 10: PACM à deux compartiments de forme rectangulaire schématisé par Du et al, 2007 et adapté de Allen et Benetto, 1993. | 62 |
| Figure 11: PACM miniaturisée à deux compartiments (Ringelsen et al. 2006). | 63 |
| Figure 12: PACM à deux compartiments en forme de H (Min et Logan 2004; Min et al. 2005a). | 63 |
| Figure 13: PACMs à deux compartiments de formes cylindriques configurées pour la recirculation A: membrane inclinée à 15° (He et al. 2005), B: cathode en U (He et al. 2006) | 64 |
| Figure 14: PACM avec cathode à air présentée par (Liu et Logan 2004). Schéma adapté par (Du et al. 2007) | 66 |
| Figure 15: Systèmes cylindriques de PACMs avec cathodes à air. A: La cathode se situe à l'extérieur du tube cylindrique B: La pile comporte 8 anodes en série avec une cathode interne; B': illustration de l'emplacement des constituants de la pile représentée en B. Source (Du et al. 2007). | 67 |
| Figure 16: PACM sans membrane avec un flux continu de l'électrolyte de l'anode vers la cathode (Cheng et al. 2006b). | 68 |
| Figure 17: 6 unités individuelles de PACMs en mode continu empilées en parallèle ou en série avec des électrodes en granules de graphite (Du et al. 2007). | 69 |
| Figure 18: Courbe de polarisation d'une pile indiquant les surtensions prépondérantes dans chaque zone de densité de courant. Adapté de (EG&G Technical Services, Inc. 2004, vol. 880). | 73 |
| Figure 19: Chutes ohmiques dans des systèmes bio-électrochimiques. Valeurs calculées pour 1 cm de distance entre l'anode à la cathode, en fonction de la conductivité des effluents et à différentes densités de courant (1, 5, 10, 25 et 50 A/m ² de surface d'anode) (Rozendal et al. 2008b). | 75 |
| Figure 20: Courbes de densité de puissance et de tension en fonction du courant (EG&G Technical Services, Inc. 2004, vol. 880) | 78 |
| Figure 21: Allure des courbes de polarisation des électrodes d'une PACM. | 78 |

| | |
|---|-----|
| Figure 22: Schéma du flux énergétique dans les PACMs. Adapté de (Schroder 2007) | 81 |
| Figure 23: Schéma de la lagune (site N°1) et points de prélèvements des échantillons étudiés. Les points noirs sur le schéma représentent les turbines d'aération..... | 94 |
| Figure 24: Photos des points de prélèvements des effluents, des sédiments et des biofilms dans la lagune (Site N°1). A: entrée de lagune; B: sortie de lagune | 94 |
| Figure 25: Points de prélèvements au sein du site N°2 | 95 |
| Figure 26: Points de prélèvements au sein du site N°3 | 96 |
| Figure 27: Dispositif expérimental du montage à 3 électrodes..... | 99 |
| Figure 28: Photos du montage expérimental. A) montage simple à 3 électrodes, B) montage avec dispositif N-STAT. | 100 |
| Figure 29: Représentation schématique du repiquage des biofilms EA | 102 |
| Figure 30: Exemple de chronoampérogramme lors du développement d'un biofilm électro-actif. Les flèches sur les figures indiquent les ajouts d'acétate | 102 |
| Figure 31: Allure d'un voltammogramme | 104 |
| Figure 32: Composition de la cathode à air «standard» utilisée dans cette étude (Schéma PaxiTech). | 106 |
| Figure 33: Première version du prototype de PAC. (Schéma PaxiTech). | 107 |
| Figure 34: Représentation schématique du montage pour la caractérisation avec la première version du prototype..... | 108 |
| Figure 35: Représentation schématique du montage pour la caractérisation avec la deuxième version du prototype..... | 109 |
| Figure 36: Référencement des biofilms électro-actifs formés à différents potentiels imposés à partir des échantillons de la Lagune (Site N°1). Biofilms Rx: biofilm formé après x repiquages..... | 124 |
| Figure 37 : Représentation schématique du gain énergétique de la bactérie en fonction du pH.... | 142 |
| Figure 38: Référencement des biofilms EA formés à différents potentiels imposés à partir des échantillons du Site n°2. Biofilms Rx : x = état de repiquage du biofilm. | 145 |
| Figure 39: Densités de courant et rendements faradiques (Rf) obtenus avec le biofilm primaire formé avec l'effluent sortie méthaniseur. Electrodes de travail en plaque de graphite polarisées à -0,2 V. 145 | 145 |
| Figure 40: Biofilms secondaires: CA obtenues lors du repiquage du biofilm primaire de la Figure 39 à 2 potentiels: -0,2 V (R1) et -0,3 V (R1'). | 146 |
| Figure 41: Différents biofilms EA formés à différents potentiels imposés à partir des effluents et biofilms récupérés au niveau de la machine à papier et de l'entrée de la station d'épuration du site N°3. En rouge, les biofilms utilisés pour réaliser l'article N°2. | 148 |
| Figure 42: Référencement des biofilms EA formés à différents potentiels imposés à partir des effluents et biofilms de la station épuration du Site N°3..... | 165 |
| Figure 43: Biofilms primaires, étude de l'influence du potentiel imposé sur les densités de courant obtenues avec l'inoculum collecté en sortie de la station d'épuration du Site n°3. En noir : potentiel imposé -0,2 V, en gris : potentiel imposé 0,2 V..... | 166 |
| Figure 44: Biofilm secondaire: CA obtenue après repiquage du biofilm primaire de la Figure 43 . Electrode de graphite polarisée à -0,2V, puis -0,3 et -0,4V..... | 167 |
| Figure 45: Voltammétries cycliques tracées aux instants indiqués sur la Figure 44 . Elles sont réalisées à 1 mV/s à partir de -0,4 V entre -0,6 V et 0,6 V..... | 167 |
| Figure 46: Biofilm tertiaire, CA obtenue après repiquage du biofilm R1 de la Figure 44 . L'électrode de graphite est polarisée à -0,4 V..... | 168 |

| | |
|---|-----|
| Figure 47: Biofilm secondaire : CA obtenue après repiquage du biofilm de la Figure 43 formé à 0,2 V. L'électrode de graphite est polarisée à -0,2 V/ECS. Au jour 11 le potentiel de l'électrode passe à -0,3 V. | 169 |
| Figure 48: VCs obtenues avec l'électrode colonisée aux différents points indiqués sur la Figure 47 . Elles sont réalisées à 1 mV/s à partir de -0,4V puis entre -0,6 V et 0,6 V. | 170 |
| Figure 49: Biofilm tertiaire: CA obtenue après repiquage du biofilm (R1) de la Figure 47 . L'électrode de graphite est polarisée à -0,3 V..... | 171 |
| Figure 50: VCs obtenues avec l'électrode aux instants indiqués sur la Figure 49 . Elles sont réalisées à 1 mV/s à partir de -0,3V entre -0,6 V et 0,6 V..... | 171 |
| Figure 51: Evolution des populations microbiennes des biofilms obtenus par les repiquages successifs avec l'effluent sortie STEP. A = Biofilms Rx; B = Biofilms Rx '.Expérience réalisée par le LEMIRE. | 173 |
| Figure 52: Biofilms secondaires: Effet de cinq matériaux d'électrode sur les performances des biofilms EA formés avec les effluents sortie méthaniseur et entrée biologique. | 181 |
| Figure 53: Effet du potentiel imposé sur les performances des biofilms EA formés avec les effluents sortie méthaniseur et entrée biologique. Réacteurs sous N ₂ en continu et électrodes de graphite (10 cm ²) polarisées individuellement à l'aide du dispositif N-STAT. | 184 |
| Figure 54: Effet de la filtration ou non de l'effluent lors du repiquage d'un biofilm EA primaire. Les réacteurs sont maintenus sous barbotage continu de N ₂ et les électrodes en plaque de graphite sont polarisées à -0,3 V. A) biofilm primaire, B) repiquage du biofilm primaire dans l'effluent filtré à 0,2 µm (courbe bleu) ou non filtré (courbe rouge). | 186 |
| Figure 55: Biofilms primaires, effet de l'ajout du milieu synthétique à l'effluent sortie méthaniseur. Les électrodes en plaque de graphite sont polarisées à -0,3 V et les réacteurs laissés sous barbotage continu de N ₂ | 187 |
| Figure 56: Biofilms primaires, effet de l'enrichissement ou non de l'effluent sortie méthaniseur par des granules sur les performances des biofilms EA. Electrodes en plaque de graphite 10 cm ² polarisées à -0,3 V. Réacteurs sous barbotage continu de N ₂ | 188 |
| Figure 57: Effet de l'agitation puis du barbotage d'azote sur les performances des biofilms EA. Electrodes en plaque de graphite polarisées à -0,3 V..... | 190 |
| Figure 58: Effet des barbotages des gaz N ₂ et N ₂ /CO ₂ sur les performances des biofilms EA primaires. | 191 |
| Figure 59: Evolution du pH et de la DCO lors des expériences témoins sans polarisation sous différentes conditions opératoires..... | 194 |
| Figure 60: Formation de biofilms EA en polarisation retardée. Les réacteurs sont laissés 14 jours sans polarisation et sans barbotage continu de N ₂ (courbe rouge) ou avec barbotage continu de N ₂ (Courbe noire). Les électrodes sont ensuite polarisées à -0,3 V..... | 196 |
| Figure 61: Evolution du pH et de la DCO de l'effluent sortie méthaniseur stocké à 4°C pendant un mois. | 202 |
| Figure 62: Performances de biofilms secondaires formés pendant une semaine (du jour 0 au jour 8) en alimentation batch sous acétate. A partir du jour 6 le réacteur passe en alimentation continue avec l'effluent brut (du jour 8 au jour 23). Au jour 23 de l'acétate est ajouté dans l'effluent, toujours en alimentation continue. Les électrodes sont des plaques de graphite 10 cm ² polarisées à -0,3V. | 203 |
| Figure 63: Biofilm EA primaire formé avec l'effluent sortie méthaniseur brut sous barbotage de N ₂ en continu. Le réacteur est laissé une semaine en batch puis alimenté en continu avec un TRH de 24 h. VCx = voltammétries cycliques réalisées aux différents points indiqués sur le graphe. | 204 |
| Figure 64: Voltammétries cycliques à 1 mV/s obtenues lors de la formation du biofilm de la Figure 63 | 205 |

| | |
|---|-----|
| Figure 65: Voltammétries cycliques à différentes vitesses de balayage au jour 32 sur la CA de la Figure 63 | 207 |
| Figure 66: Biofilm EA primaire formé avec l'effluent sortie méthaniseur brut à -0,3V et sous barbotage de N ₂ continu. Le réacteur est laissé en mode batch pendant 5 jours puis mis en alimentation continue avec un TRH de 24 h. | 208 |
| Figure 67: Voltammétrie cyclique réalisée au jour 43 avant l'arrêt de l'expérience de CA de la Figure 66 | 209 |
| Figure 68: Photo au MEB de la surface de l'électrode de la Figure 66 à la fin de l'expérience. Photo réalisée par le LGC..... | 210 |
| Figure 69: Photos de microscopie à épifluorescence de la surface de l'électrode de la Figure 66 en fin d'expérience. A Micro-organismes uniquement, B) Micro-organismes + matrice. Photo réalisée par le LGC..... | 210 |
| Figure 70: Densités de courant en fonction du TRH avec l'effluent sortie méthaniseur brut. Les conditions anaérobies sont maintenues par barbotage continu de N ₂ . Les électrodes sont en plaque de graphite 10 cm ² ; potentiel imposé -0.3 V. Les expériences A et B sont réalisées à 1 an d'intervalle.. | 211 |
| Figure 71: Voltammétries cycliques (1 mV/s) réalisées à Jmax aux jours 19 pour les deux biofilms EA présentés sur la CA Figure 70 | 214 |
| Figure 72: Photos au MEB de l'électrode à la fin de l'expérience A à 2 grossissements 3,5 KX et 1,5 KX..... | 214 |
| Figure 73: Densités de courant en fonction du temps pour deux biofilms EA primaires formés en parallèle pendant 40 jours en alimentation continue, à flux de DCO constant. Les réacteurs sont sous N ₂ en continu tout au long de l'expérience. Les électrodes en plaques de graphite de 10 cm ² sont polarisées à -0.3 V. DCO _r = DCO résiduelle dans les réacteurs..... | 215 |
| Figure 74: Voltammétries cycliques (1mV/ s) réalisées au jour 12 pour les 2 expériences de la Figure 73 | 217 |
| Figure 75: Densités de courant en fonction du temps pour deux biofilms EA en fonction de la concentration de l'effluent. Les électrodes sont des plaques de graphite de 10 cm ² polarisées à -0,3 V. Les réacteurs sont laissés sous barbotage de N ₂ en continu et alimentés avec l'effluent sortie méthaniseur au TRH de 24 h..... | 218 |
| Figure 76: Voltammétries cycliques réalisées à différents jours lors de la formation des biofilms de la Figure 75 . Elles sont réalisées à 1 mV/s entre -0,6 V et 0,6 V..... | 220 |
| Figure 77: Profils DGGE des biofilms EA formés en alimentation continue avec l'effluent brut. Biofilm A = biofilm de la Figure 73 , Biofilm B = biofilm de la Figure 75-A , Biofilm C = biofilm de la Figure 70-B , Biofilm D = biofilm de la Figure 66 . Expérience réalisée par le LEMIRE..... | 221 |
| Figure 78: Formation d'un biofilm EA avec l'effluent entrée biologique en alimentation. L'électrode de graphite est polarisée à - 0,2V..... | 223 |
| Figure 79: Effet du TRH à flux de DCO variable sur les performances d'un biofilm EA formé avec l'effluent entrée biologique. | 224 |
| Figure 80: Biofilm primaire formé sous polarisation retardée de 14 jours et sous barbotage continu de N ₂ . Electrode de graphite polarisée à -0,3V..... | 226 |
| Figure 81: Voltammétries cycliques effectuées au début et à la fin de l'expérience d'alimentation Fed-batch lors de la CA Figure 80 à 1 mV/s à partir de -0,3 V/ECS et entre -0,6 V et 0,3 V..... | 227 |
| Figure 82: Biofilm primaire formé sous polarisation retardée de 14 jours. Les barbotages ou non de N ₂ sont indiqués sur le graphe. Electrode de graphite polarisée à - 0,3V..... | 228 |
| Figure 83: Voltammétries cycliques effectuées au début et à la fin de l'expérience d'alimentation batch séquentielle lors de la CA Figure 82 à 1 mV/s à partir de -0,3 V/Ref et entre -0,6 V et 0,3 V. | 229 |

| | |
|--|-----|
| Figure 84: Biofilm formé avec l'effluent sortie méthaniseur en alimentation fed batch. L'électrode de graphite est polarisée à $-0,3V$ | 230 |
| Figure 85: Effet du contrôle du pH par différentes conditions de barbotage de CO_2 sur la densité de courant. L'électrode de graphite est polarisée à $-0,3V$ | 232 |
| Figure 86: Voltammétries effectuées au début et à la fin de l'expérience d'alimentation fed-batch lors de la CA Figure 85 à 1 mV/s à partir de $-0,3\text{ V}$ et entre $-0,6\text{ V}$ et $0,6\text{ V}$ | 234 |
| Figure 87: Evolution du pH et de l'abattement de la DCO lors de l'expérience témoin sans polarisation sous différents barbotages de gaz..... | 235 |
| Figure 88: CA obtenue lors de l'étude de l'effet des nutriments: effluent sans nutriments du jour 0 au jour 24, puis avec nutriments ($DCO/N/P = 200/5/1$) à partir du jour 24..... | 238 |
| Figure 89: Voltammétrie cyclique à 1 mV/s à partir de $-0,3\text{ V}$ et entre $-0,6\text{ V}$ et $0,6\text{ V}$, effectuée sur l'électrode à la fin de l'expérience d'alimentation Fed-batch présentée Figure 88 | 239 |
| Figure 90: CAs enregistrées lors de l'étude de l'effet des nutriments. Du jour 0 au jour 26, effluent avec nutriments à 2 proportions différentes puis à partir du jour 26, l'effluent sans nutriments est utilisé..... | 240 |
| Figure 91: Voltammétries cycliques effectuées sur les électrodes à la fin des expériences d'alimentation fed-batch lors des CA de la Figure 90 à 1 mV/s à partir de $-0,3\text{ V/Ref}$ et entre $-0,6\text{ V}$ et $0,6\text{ V}$ | 241 |
| Figure 92: Caractérisation de la pile et des deux électrodes à la fin des 45 jours de formation du biofilm (verte), juste après le changement de la cathode (rouge), 24h après le changement de la cathode (bleu), 48h après le changement de la cathode (marron). La pile est alimentée en continu avec l'effluent sortie méthaniseur(SM) brut. Expérience réalisée au LGC..... | 250 |
| Figure 93: Photos représentant l'état d'encrassement de la cathode après 24h (A) et 45 jours (B) d'alimentation en continu de la pile avec l'effluent sortie méthaniseur brut. Photos réalisées au LGC..... | 251 |
| Figure 94: Photos MEB de l'anode colonisée à la fin de la caractérisation à 2 grossissements différents. Photos réalisées par le LGC..... | 252 |
| Figure 95: Caractérisations intensité-potential de l'anode et de la cathode réalisées lorsque la pile génère les puissances maximales..... | 254 |
| Figure 96: Performances des cathodes à air en fonction de la charge en Pt dans des piles à hydrogène. Expérience réalisée par PaxiTech..... | 255 |
| Figure 97: Courbes de puissance et de polarisation aux jours 1 (noir) et 10 (rouge) des piles alimentées avec l'effluent sortie méthaniseur (SM) avec ou sans ajout de nutriments. Les biofilms ont été préalablement formés dans les mêmes conditions d'alimentations. Les cathodes standard avec ou sans membrane polyoléfine (PO) sont utilisées..... | 258 |
| Figure 98: Biofilm formé en alimentation continue avec l'effluent entrée biologique brut (TRH 5h). L'électrode en tissu de carbone 25 cm^2 est polarisée à $-0,3V$ et le réacteur est sous un barbotage de N_2 en continu..... | 259 |
| Figure 99: Caractérisation de la pile à la fin de la formation du biofilm sous polarisation en alimentation continue avec l'effluent entrée biologique brut avec 2 cathodes différentes. Courbe bleu: cathode ayant servi pendant un mois à la formation du biofilm EA ($1,5\text{ mg/cm}^2$ en Pt et 60% PTFE, sans membrane). Courbe rouge: cathode standard neuve au jour 1; courbe noire: cathode standard au jour 3; courbe marron: cathode standard au jour 8..... | 260 |
| Figure 100: Vue des deux faces du prototype pour la formation des bioanodes..... | 262 |
| Figure 101: Vue de la deuxième version du prototype de pile complète..... | 262 |
| Figure 102: Différents biofilms EA formés avec l'effluent sortie méthaniseur (SM) en alimentation batch avec acétate ou fed batch avec l'effluent brut dans les prototypes en duplicats (courbes noires | |

en traits pleins et pointillés) ou dans les réacteurs électrochimiques (courbes rouges). Les électrodes de travail en tissu de carbone 25 cm² sont polarisées à -0,3 V et les réacteurs sous N₂ en continu... 265

Figure 103: Duplicats de biofilms formés dans les prototypes en alimentation batch séquentielle (TRH 48h) avec l'effluent sortie méthaniseur (SM). Les conditions anaérobies sont maintenues avec les barbotages des gaz N₂ ou CO₂. 268

Figure 104: Evolutions au cours du temps de la différence de potentiel (ddp) des piles sous différents barbotages de gaz en fonction de la résistance externe et courbes de caractérisations des électrodes après trois semaines de fonctionnement en pile. 271

Figure 105: CAs et VCs des biofilms primaires sur plaque de graphite 10 cm² et secondaires sur tissu de carbone 25 cm² dans des réacteurs de 500 mL en alimentation batch séquentielle (TRH 48h) avec l'effluent sortie méthaniseur. Les CAs sont effectuées à -0,3V, les VCs à 1 mV/s et les réacteurs placés sous N₂ en continu. 273

Figure 106: Courbes de puissance de la pile constituée du biofilm 2' et d'une cathode à air de type standard..... 274

Figure 107: Evolutions avec le temps de la différence de potentiel (ddp) des piles sous une résistance externe de 100 ohms et en circuit ouvert..... 277

Figure 108: Evolution de la différence de potentiel en inoculant la pile avec le biofilm de la **Figure 106**; la pile est connectée à une résistance de 330 ohms. 278

LISTE DES ABREVIATIONS

Abat DCO : abattement de DCO de l'effluent

Acier 254 SMO : acier inoxydable, marque déposée de la société Suédoise OUTOKUMPU de composition : Cr 19,9%, Ni 17,8%, N 0,2%, Fe : complément

AEM N°1 : anion exchange membrane N°1 ; membrane de conduction anionique N°1

AEM N°2 : anion exchange membrane N°2 ; membrane de conduction anionique N°2

AFC: Alkaline Fuel Cell (Pile à combustible alcaline)

AGV: acides gras volatils : acides gras à courte chaîne, jusqu'à six atomes de carbone

Anolyte : Electrolyte placé à l'anode

Analyte : substance à analyser

Biofilm R0 : biofilm primaire

Biofilm R1 : biofilm secondaire

Biofilm R2 : biofilm tertiaire

CA : chronoampérométrie : mesure de la densité de courant en fonction du temps à un potentiel donné

Catholyte : Electrolyte placé à la cathode

CO: circuit ouvert

COT : carbone organique total

CI : carbone inorganique

CT : carbone total

DBO : demande biologique en oxygène

DCO : demande chimique en oxygène

DCOr : demande chimique en oxygène résiduelle dans le réacteur

DCOe : demande chimique en oxygène en entrée du réacteur

DCOs : demande chimique en oxygène en sortie de réacteur

DGGE : Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

ddp : différence de potentiel

E^0 Potentiel théorique dans les conditions standards [V]

EA : électro-actif

EB : entrée biologique

ECS: électrode au calomel saturé

EL: entrée lagune

ESH : électrode standard à hydrogène

Ean : potentiel de l'anode

Ecath : potentiel de la cathode

Gram- : définit une bactérie négative à la coloration de Gram qui permet de mettre en évidence les propriétés de parois bactérienne en vue de leur classement

Ian : courant anodique

Icath : courant cathodique

J : densité de courant: rapport du courant produit sur la surface projetée de l'électrode

Jmax : densité de courant maximale

kW: kilowatts

MCFC: Molten Carbonate Fuel Cell (Pile à Carbonates Fondus)

MEB : microscopie électronique à balayage

MW: Mégawatts Rf: rendement faradique

N-STAT : dispositif électronique qui permet de connecter plusieurs électrodes de travail pour une seule électrode de référence et une seule électrode auxiliaire.

P : puissance de la pile

PAC: piles à combustible classique

PACMs: piles à combustible microbiennes

PAFC: Phosphoric Acid Fuel Cell (Pile à Acide Phosphorique)

PEMFC: Proton Exchange Membrane Fuel Cell (Pile à Membrane Echangeuse de Protons)

Pmax: densité de puissance maximale [W/m²]

PO : polyoléfine : membrane de filtration en acétate de cellulose

Pt: platine

PTFE: polytétrafluoroéthylène: membrane polymère hydrophobe

Rext : résistance externe

Rf: rendement faradique : rapport de la quantité d'électricité totale transférée à l'anode sur la quantité d'électricité disponible dans le substrat

SM : sortie méthaniseur

SOFC: Solid Oxide Fuel Cell (Pile à oxydes solides)

SS : sortie STEP

STEP : station d'épuration

SL: sortie lagune

TRH: Temps de rétention hydraulique : temps de séjour de l'effluent dans le réacteur

Upile : tension d'une pile (V)

UFC : Unité Faisant Colonie. mesure de la concentration de micro-organismes dans un prélèvement.

Vb: vitesse de balayage

V C: voltammétrie cyclique

W : watt

Introduction générale

La concentration des gaz à effet de serre (CO₂, CH₄, NO_x...) ne cesse d'augmenter dans l'atmosphère depuis le début de l'ère industrielle. Ces émissions, générées principalement par la combustion des sources énergétiques fossiles, entraînent des changements climatiques qui perturbent les écosystèmes à l'équilibre fragile de notre planète. La disponibilité de plus en plus réduite de ces sources d'énergie causée par leur exploitation massive pour satisfaire l'explosion démographique de ces dernières décennies, les catastrophes naturelles avec dégâts industriels (ouragans Yvan en 2004 et Katrina en 2005), ainsi que le développement des pays émergents (Chine, Brésil...) entraîne une augmentation des coûts de production et des inégalités d'accès qui imposent de rechercher des technologies alternatives de production d'énergie, basées sur l'utilisation de combustibles renouvelables. Le développement des énergies renouvelables paraît incontournable à moyen terme compte tenu du potentiel considérable qu'elles offrent et de leurs qualités écologiques intrinsèques.

Le développement des piles à combustible (PAC) est une composante majeure des nombreuses technologies mises en œuvre ces dernières années dans le domaine des énergies renouvelables. Les piles à combustible à haute température commencent à être exploitées dans de petites unités de production électrique. Cependant, le développement des piles fonctionnant à une température proche de la température ambiante est freiné par plusieurs problèmes dont leur durée de vie encore insuffisante et le coût souvent excessif des composants. En effet, ces technologies dépendent en grande partie de la filière hydrogène, de sa production à son utilisation finale et du coût du platine qui est généralement utilisé comme catalyseur aux électrodes.

De nombreux travaux de recherche se sont en conséquence orientés ces dernières années vers le remplacement du platine par des catalyseurs moins onéreux et l'utilisation de nouveaux combustibles. Parmi les processus étudiés, on peut citer les piles à combustible microbiennes (PACMs), dans lesquelles des micro-organismes présents naturellement dans les milieux naturels sont utilisés comme catalyseurs aux électrodes. La matière organique contenue dans les résidus agricoles ou les eaux usées peut être valorisée comme substrat combustible par ces micro-organismes dits électro-actifs (EA). Cette technologie permettrait ainsi de coupler la production d'énergie au traitement et à la valorisation des déchets ou des effluents. Il convient néanmoins de noter dès à présent que le terme catalyseur est abusivement utilisé dans le cas de cette technologie puisque les bactéries conservent une partie de l'énergie générée par la dégradation des composés organiques pour combler leurs propres besoins (Schroder 2007).

C'est dans ce contexte que s'inscrit ce travail de thèse réalisé dans le cadre du projet «*Agri-Elec*» du programme ANR/Bioénergie, mis en place en 2008 et dont l'objectif global est la conception de piles à combustible microbiennes, pour la production d'électricité à partir

de résidus des filières agricole et forestière. L'objectif du Centre Technique du Papier, qui est l'un des sept partenaires de ce projet multidisciplinaire, est d'évaluer la faisabilité de la technologie des piles à combustible microbiennes pour la production d'électricité couplée au traitement des effluents des industries papetières.

La démarche scientifique est présentée en six chapitres dans ce mémoire. Une synthèse bibliographique sur la technologie des piles à combustible microbiennes fait l'objet du premier chapitre. Les différents aspects microbiologiques et électrochimiques ainsi que les avantages et limitations sont présentés. Les détails sur les réactions bio-électrochimiques siégeant à l'anode et à la cathode sont décrits ainsi que l'effet de plusieurs facteurs agissant sur ces réactions et par conséquent sur les performances générales des piles microbiennes.

Le deuxième chapitre détaille les matériels et méthodes électrochimiques et microbiologiques utilisés pour la caractérisation des électrodes modifiées par des biofilms électro-actifs et des systèmes de PACMs associés.

Le troisième chapitre est consacré au criblage de différents effluents issus d'unités de production papetière pour rechercher des bactéries capables de former des biofilms électro-actifs dans des conditions de laboratoire favorables. La première partie présente un état de l'art sur l'approche expérimentale choisie, en l'occurrence le système à trois électrodes et le choix des conditions opératoires à l'exemple du potentiel imposé. Dans la seconde partie, les résultats du criblage pour chaque site papetier sélectionné sont présentés et discutés. Les résultats essentiels sont synthétisés à la fin du chapitre.

Le quatrième chapitre est dédié à l'optimisation de différents paramètres opératoires : le matériau d'électrode, le potentiel imposé, les conditions anaérobies en fonction du pH, le repiquage avec stérilisation ou non de l'effluent, la polarisation retardée. L'effet de ces paramètres est étudié pour former des bioanode à partir de deux effluents de référence. Ces deux effluents ont été sélectionnés à partir des résultats du chapitre précédent et en raison de leur représentativité des effluents de papeteries françaises.

Dans les chapitres précédents les biofilms EA étaient formés en ajoutant de l'acétate comme substrat à l'effluent. Au contraire, dans le cinquième chapitre la formation des biofilms est réalisée dans des conditions très proches des conditions industrielles. L'effluent industriel est utilisé comme seul substrat en alimentation continue ou en mode batch séquentielle. Les résultats essentiels sur l'optimisation des biofilms dégagés dans les chapitres précédents sont exploités et d'autres paramètres d'optimisation sont étudiés dans les nouvelles conditions d'expérience. La difficulté d'adapter à l'effluent industriel des biofilms formés

sous acétate est mise en lumière. Les résultats ne sont plus présentés uniquement sous l'angle des densités de courants et rendements faradiques mais aussi en termes de taux d'abatteurs de la demande chimique en oxygène (DCO). L'influence du débit, de la concentration de l'effluent et du flux de DCO est présentée pour les réacteurs alimentés en continu. En alimentation batch séquentielle, des anodes formées par polarisation immédiate ou retardée sont comparées et le contrôle du pH des effluents par barbotages d'azote ou de dioxyde de carbone est également abordé. Des expériences témoins sans polarisation permettent d'évaluer la contribution de l'électrochimie dans la dégradation de la DCO de l'effluent. Enfin, par analogie avec les procédés conventionnels de traitement des effluents, l'effet de l'ajout de nutriments azotés et phosphorés est testé.

Dans le sixième et dernier chapitre, les biofilms EA formés dans les conditions optimales dégagées dans les chapitres précédents sont testés en piles semi-microbiennes équipées de cathodes à air. Deux versions de prototype de PACMs conçues en collaboration avec la société PaxiTech, partenaire du projet, sont utilisées à cet effet. Ces prototypes permettent d'évaluer l'effet de différents types de cathodes à air, de l'insertion d'une membrane, de l'ajout de nutriments, du design du réacteur, de la sélection des biofilms par repiquage et de la formation des biofilms EA en systèmes à 2 ou 3 électrodes.

La conclusion générale propose une mise en lumière des résultats essentiels et trace les perspectives qui ont été ouvertes par ce travail de thèse

Chapitre I

Contexte scientifique

I.1. Introduction

I.1.1. Besoin énergétique

Le réchauffement climatique ainsi que la pollution environnementale sont des phénomènes anthropiques dont les empreintes sont de plus en plus visibles et marquées sur le fonctionnement de notre planète: augmentation de la température de l'air, diminution de la couverture neigeuse, augmentation des inondations, des sécheresses... Aujourd'hui presque tous les scientifiques s'accordent à imputer cette évolution du climat aux gaz à effet de serre produits par l'activité humaine, le principal responsable étant le gaz carbonique qui représente près de 70% des émissions. Pour remédier à ce problème de nombreuses nations se sont engagées à réduire de près de 20% leurs émissions de gaz à effet de serre d'ici 2020 et à développer le secteur des énergies renouvelables (protocole de Kyoto ratifié en 1997, modifié en 2010 au sommet de Copenhague et dont les engagements ont été réitérés récemment en 2012 au sommet de Rio de Janeiro).

L'énergie, quelle que soit sa forme, joue un rôle essentiel dans le monde moderne. La production d'énergie est ainsi devenue un indicateur de progrès à l'échelle des nations (Mohan *et al.* 2008). Nous avons été longtemps totalement dépendants des sources d'énergie traditionnelles telles que le pétrole, le charbon, le gaz. Ces sources d'énergie conventionnelles fossiles non renouvelables ne vont bien sûr pas subitement s'épuiser, mais nous approchons du stade où ces combustibles vont rapidement devenir rares et ceci pour plusieurs raisons, comme l'explosion démographique ou le boom économique des pays émergents (Chine, Brésil...) qui entraînent une consommation croissante d'énergie ou encore les tensions géopolitiques au Moyen-Orient. Ce secteur du globe possède des réserves importantes de pétrole qu'il est difficile d'exploiter, ce qui entraîne un épuisement des réserves d'accès plus facile. Ces problèmes ont conduit à plusieurs chocs pétroliers amenant le prix des hydrocarbures à être multiplié par quatre ces dernières années. Les principaux chocs pétroliers ayant eu lieu en 1973, 1979 et plus récemment en 2008.

Dans le souci de réduire l'impact de la consommation des sources d'énergie fossiles sur notre planète, l'exploitation des sources renouvelables a été relancée.

I.1.2. Energies alternatives

Une énergie alternative ou renouvelable peut être définie comme une énergie dont le mode de production utilise des forces ou ressources illimitées et peu polluantes. Il existe ainsi cinq grandes familles d'énergies renouvelables: l'énergie solaire, l'énergie éolienne, l'énergie

hydraulique, l'énergie géothermique et les bioénergies (biogaz, biocarburants, effluents, valorisation des déchets...)¹

❖ L'énergie solaire peut être exploitée directement par son effet thermique ou par transformation photovoltaïque. Dans ce cas la lumière du soleil est convertie en électricité au sein de matériaux semi-conducteurs, à l'exemple du silicium, ou recouverts d'une mince couche métallique. Sous irradiation, les photons heurtent et libèrent les électrons de ces matériaux photosensibles induisant ainsi un courant électrique.

❖ Les éoliennes ou aérogénérateurs captent l'énergie cinétique du vent et entraînent un générateur électrique. Une éolienne de nouvelle génération développe en général une puissance d'environ 2 MW capable d'alimenter environ 2 000 foyers (hors chauffage). Aujourd'hui la France compte plus de 5729 MW installés².

❖ L'hydroélectricité peut être définie comme la production d'électricité par écoulement de l'eau. L'eau fait tourner une turbine entraînant un générateur électrique qui injecte des kilowattheures dans le réseau. L'énergie hydraulique représente 19% de la production totale d'électricité dans le monde et 13% en France. C'est la source d'énergie renouvelable la plus utilisée dans le monde.

❖ La géothermie consiste en l'exploitation de la chaleur stockée dans le sous-sol pour la production d'électricité ou de chaleur. En fonction de la ressource, de la technique utilisée et des besoins, les applications sont multiples.

❖ Les bioénergies concernent toutes les formes de production d'énergie qui utilisent des matières d'origine biologique comme combustibles pour la production de chaleur, d'électricité ou de carburants. Un exemple de bioénergie abondante, renouvelable, polyvalente et d'utilisation quasiment neutre en termes d'effet de serre sous certaines conditions est la biomasse. Elle résulte du stockage de l'énergie solaire et du dioxyde de carbone (CO₂) atmosphérique sous forme de molécules organiques, grâce au processus naturel de photosynthèse (bois). Les déchets organiques sous forme solide (boues) ou liquide (effluents) constituent une autre source de bioénergie.

Un gain net en termes d'émissions de gaz à effet de serre, la disponibilité des ressources en quantités suffisantes et la maîtrise du risque de compétition avec les usages alimentaires, comptent parmi les critères déterminants pour le développement raisonné de ces filières (Lee *et al.* 2008).

Le travail de thèse présenté dans ce mémoire entre dans le domaine des bioénergies et, plus spécifiquement, il porte sur la technologie de la pile à combustible microbienne.

¹ Tiré de l'observatoire français des énergies renouvelables : <http://www.energies-renouvelables.org>

² Tiré de l'observatoire français des énergies renouvelables: <http://www.energies-renouvelables.org>

I.1.3. Piles à combustible classiques (PAC)

Le principe de la pile à combustible fût découvert en 1839 par Sir William Groove. Rapidement oublié après sa découverte, ce principe fût repris en 1935 par F.T.Bacon pour aboutir au premier prototype de 1 kW qui servit de modèle en 1961 à la pile hydrogène/oxygène de la mission spatiale Apollo.

Une pile à combustible peut être définie comme un dispositif électrochimique dans lequel l'énergie chimique d'un combustible et d'un comburant est transformée en énergie électrique, chaleur et autres produits de réactions lorsqu'il y'a un apport continu des réactifs. La production d'électricité est possible grâce à l'échange d'électrons issus des réactions électrochimiques spontanées aux électrodes. Le combustible réducteur s'oxyde à l'anode et les électrons issus de cette oxydation circulent à travers un circuit électrique externe vers la cathode où ils se combinent à un comburant, généralement l'oxygène, qui est réduit. Des catalyseurs sont généralement nécessaires aux électrodes pour assurer la vitesse des réactions électrochimiques.

Il existe six types de piles à combustibles (PAC) classiques qui se différencient par leur électrolyte dont la nature définit la température de fonctionnement et de ce fait l'application de la pile.

Les combustibles utilisés doivent être initialement produits à partir d'autres sources d'énergie d'origine fossiles ou par bio-transformation de biomasse naturellement produite. C'est pour cela que l'on considère les PACs comme sources d'énergie électrique secondaires.

Les principales caractéristiques des différentes PAC sont présentées dans le *Tableau 1*.

| Type PAC | Combustible | Electrolyte | Porteur de charge | Temperature operationnelle | Rendement systeme | Cathode | Gamme puissance | Domaines d'application |
|--|--|---|--|----------------------------|-------------------|--|-----------------|---|
| Alcaline (AFC) | H ₂ | KOH | OH ⁻ | 50 – 200°C | 35 – 60% | O ₂ (air) | 100 kW | Aérospatial militaire |
| Acide phosphorique (PAFC) | H ₂ | H ₃ PO ₄ | H ⁺ (à partir d'hydrocarbures et de méthanol) | 150 – 250°C | 40% | O ₂ (air) | 200 kW – 11 MW | Electricité distribuée, installations stationnaires |
| Carbonate fondu (MCFC) | H ₂ , CO, CH ₄ et autres hydrocarbures | Sels carbonates (Li ₂ CO ₃ , K ₂ CO ₃ ...) mélangés dans une matrice LiAlO ₂ | CO ₃ ²⁻ | 500 – 750°C | 54% | O ₂ (air) + CO ₂ | 25-100 kW | Centrales terrestres de cogénération de chaleur Alimentation électrique des navires en mer. Une centrale stationnaire produit 2 MW dans la ville de Santa Clara en Californie |
| Méthanol direct (DMFC) | Méthanol ou H ₂ SO ₄ | Polymère solide | H ⁺ | 20-100°C | 45% | O ₂ (air) | 5 kW | Systèmes électroniques portables de faible puissance. Longue période de fonctionnement |
| Oxyde solide (SOFC) | H ₂ , CO, CH ₄ et autres hydrocarbures | Céramique: oxyde de zircon (ZrO ₂) et yttrium (Y ₂ O ₃) | O ²⁻ | 500 - 1100°C | 45-55% | O ₂ (air) | 2 kW – multi MW | Electricité distribuée et cogénération dans les autobus |
| Membrane échangeuse de protons (PEMFC) | H ₂ produit à partir d'hydrocarbures et de méthanol | Polymère solide (membrane échangeuse de protons) | H ⁺ | 30 – 100°C | 35 – 50% | O ₂ (air) | 5 – 250 kW | Véhicules, source de puissance portable |

Tableau 1: Principales caractéristiques des différents types de piles à combustibles classiques. AFC: Alkaline Fuel cell, PEMFC: Proton Exchange Membrane Fuel Cell, PAFC: Phosphoric Acid Fuel Cell, MCFC: Molten Carbonate Fuel Cell, SOFC: Solid Oxide Fuel Cell (Larminie et Dicks 2003; Miachon 1995; Mainka 2011).

De façon plus schématique, les différentes gammes de puissance et domaines d'applications des piles à combustible classiques sont regroupés sur la **Figure 1**.

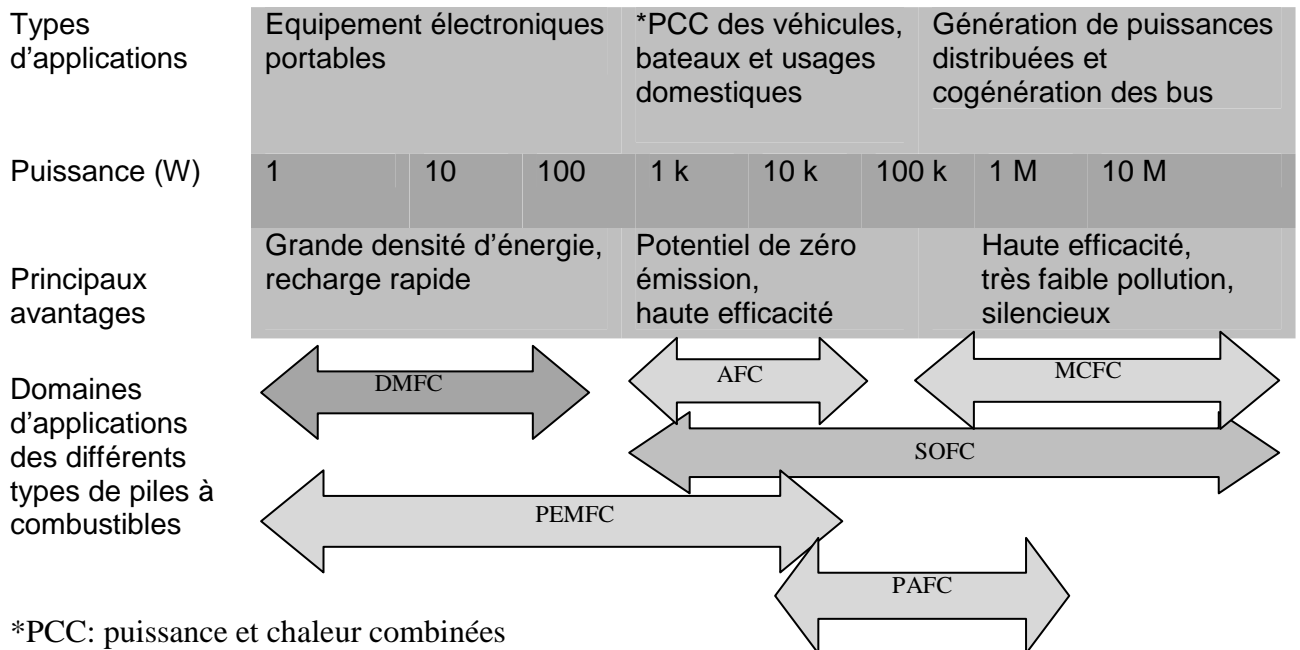


Figure 1: Récapitulatif des applications et avantages majeurs des principales piles à combustible classiques. Adapté de (Larminie et Dicks 2003).

Parmi les PACs présentées dans le **Tableau 1**, celle à membrane échangeuse de protons est la plus répandue car elle présente plusieurs avantages tels qu'une basse température de fonctionnement, un démarrage rapide et l'utilisation de l'hydrogène comme combustible. De plus, sa densité de puissance élevée permet son application dans de nombreux domaines, comme les systèmes portables (appareils de musique, téléphones, micro-ordinateurs...), stationnaires (cogénération de petite et moyenne puissance en électricité domestique) et les transports. Le principe de cette pile est représenté sur la **Figure 2**.

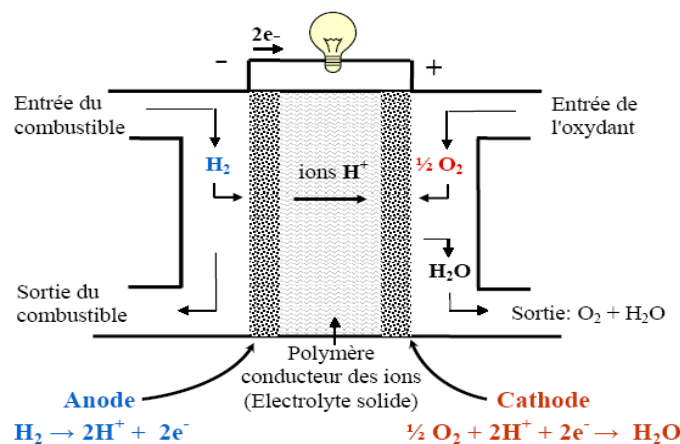


Figure 2: Principe de fonctionnement d'une pile à membrane échangeuse de protons.

Une PAC à membrane échangeuse de protons présente deux compartiments: un compartiment anodique alimenté en hydrogène (combustible) et un compartiment cathodique alimenté en oxygène (comburant). Les électrons issus de l'oxydation de l'hydrogène à la surface de l'anode circulent à travers le circuit électrique externe en produisant un courant et arrivent sur la cathode où ils sont consommés par la réduction de l'oxygène. Simultanément, les protons issus de la réaction d'oxydation traversent l'électrolyte ou la membrane vers la cathode. La membrane la plus souvent utilisée est une membrane de type Nafion® qui est une membrane échangeuse de protons constituée d'un réseau polymérique incluant des groupes fonctionnels chargés négativement.

Pour faciliter les réactions aux électrodes et augmenter les performances de la pile, un catalyseur est nécessaire. Le platine est le catalyseur idéal pour chacune des demi-réactions car il est compatible avec l'électrolyte acide et permet d'obtenir des densités de courant importantes (200 – 400 A/cm² avec une tension de l'ordre de 0,7 V) (Hottinen *et al.* 2004). Des particules de 2 à 4 nm de diamètre sont déposées à raison de 0,1 à 1 mg/cm² sur un support de carbone finement divisé pour assurer l'évacuation des électrons à l'anode et leur redistribution à la cathode. La réaction globale de la pile est identique à la combustion de l'hydrogène:



Cette réaction fournit de l'énergie électrique et de la chaleur. L'énergie totale disponible aux bornes de la pile en fonctionnement réversible à une température donnée est évaluée à partir de l'enthalpie et de l'entropie des réactifs et produits de la réaction d'après l'équation:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad \text{Équation 2}$$

Avec

- ΔG : variation de l'enthalpie libre qui correspond à l'énergie électrique produite
- ΔH : variation d'enthalpie
- ΔS : variation d'entropie (Chaleur)
- T: température

Afin de remplacer le platine comme catalyseur aux électrodes, la recherche s'est tournée ces dernières années vers les piles à combustible microbiennes.

I.2. Les biofilms

La technologie des piles à combustible microbiennes fait intervenir des micro-organismes qui forment des biofilms électrocatalytiques à la surface des électrodes. Il est donc utile de rappeler quelques notions de base sur les biofilms.

I.2.1. Définition

Les micro-organismes vivent généralement au sein de communautés microbiennes organisées sur des surfaces ou à des interfaces appelées biofilms. Il a été montré que plus de 99% des bactéries se développent en biofilms sur une grande variété de surfaces telles que les métaux, les plastiques, les tissus vivants (tissus humains, feuilles, racines des végétaux...) et les surfaces minérales (pierres, bétons...) (Donlan et Costeron 2002). Tous les systèmes dans lesquels l'eau est en contact avec une surface solide sont susceptibles de servir de support à la formation de biofilms (Patching et Fleming 2003). D'une manière générale, un biofilm peut être défini comme une communauté microbienne sessile caractérisée par des cellules attachées de manière irréversible à une couche, une interface ou les unes aux autres, enrobées dans une matrice de biopolymères extracellulaires auto-produits (Donlan et Costeron 2002). Un biofilm est constitué d'environ 15% en volume de cellules microbiennes contenues dans 85% d'une matrice d'exopolymères hydratée. Cette matrice est responsable des propriétés physiques et physico-chimiques du biofilm (Flemming et al. 2000).

I.2.2. Formation des biofilms

La formation et le développement d'un biofilm se déroulent en cinq étapes successives (*Figure 3*): (Bellon-Fontaine et Cerf 1991)

❖ Durant les phases préliminaires de transport et d'adhésion primaire, les bactéries, sous forme planctonique se déplacent sous l'effet de l'hydrodynamique ou par nage dirigée, grâce à leur appendice de mobilité appelée flagelle, pour adhérer à une surface. Les liaisons mises en jeu à ce stade sont non covalentes (liaisons de type Van der Waals ou électrostatiques) donc fragiles. Cette adhésion primaire des bactéries peut être réversible.

❖ La deuxième étape constitue l'installation des micro-organismes. Les bactéries sécrètent des polysaccharides et des protéines possédant des propriétés adhésives. L'adhésion devient irréversible avec la production de ces macromolécules appelées glycocalyx ou glycolemmes et la formation de nombreuses liaisons de faible énergie de nature ioniques, hydrophobes ou hydrogènes entre les bactéries et le substrat.

❖ Pendant la troisième étape qui concerne la colonisation et la croissance, les micro-organismes se divisent pour former des micro-colonies qui vont recouvrir toute ou une partie de la surface. Le taux de recouvrement dépend de la nature et des propriétés de surface ainsi

que de la nature des bactéries. Les bactéries adhérentes produisent des exopolymères qui forment la matrice du biofilm, favorisant son maintien et sa plasticité.

❖ Le biofilm entre ensuite dans la phase de maturation. Il en résulte la formation de canaux qui permettent la circulation des nutriments et de l'oxygène dans les régions profondes du biofilm, ainsi que l'évacuation des produits issus de l'activité métabolique. Le biofilm à cette étape s'étend et s'épaissit jusqu'à une structure macroscopique tridimensionnelle. Lors de cette étape s'établissent des gradients de nutriments et d'accepteurs d'électrons (oxygène, nitrates, sulfates...) qui déterminent les métabolismes des différentes communautés microbiennes du biofilm.

❖ La dernière étape est le détachement ou la dispersion du biofilm, dû au vieillissement, à des carences ou stress liés à l'environnement. Il en résulte un relargage de matières inertes et de bactéries qui retrouvent leur état planctonique, prêtes pour une nouvelle colonisation.

Les bactéries dans les biofilms (bactéries sessiles) développent des caractéristiques différentes de leurs homologues libres ou en suspension (bactéries planctoniques) (Donlan et Costeron 2002). Ces différences incluent une augmentation de la résistance aux agents antimicrobiens (désinfectants ou antibiotiques) et aux stress environnementaux (déshydratation, privation nutritionnelle, rayonnements ultra-violets...) qui peuvent provoquer divers problèmes dans de nombreux secteurs d'activités et sont, par exemple, la source de dégradations de matériaux ou de graves problèmes sanitaires (Donlan et Costeron 2002; Patching et Fleming 2003).

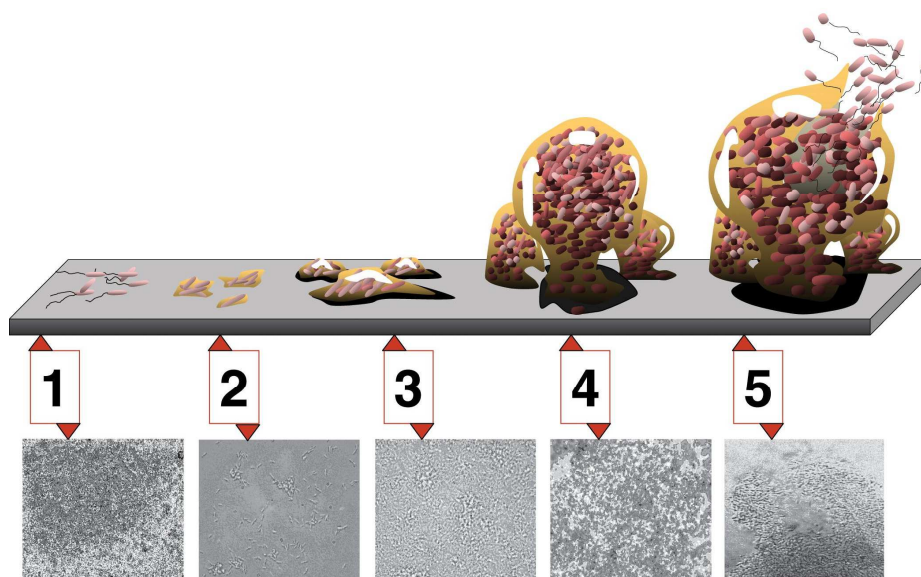


Figure 3: Les 5 étapes de maturation d'un biofilm. 1: attachement initial; 2: attachement irréversible; 3: colonisation et croissance; 4 maturation ; 5: dispersion. Les photomicrographies (toutes à même échelle) sont celles d'un biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* en développement (Davis, 2008)

I.2.3. Problèmes liés aux biofilms

Il a été établi que les biofilms sont impliqués dans 65% des infections bactériennes chez l'homme (Chicurel 2000). Lutter contre leur développement est un enjeu important dans le domaine médical. Le problème le plus commun concerne la formation de la plaque dentaire à l'origine des caries. Les biofilms peuvent aussi être responsables de problèmes plus sérieux lorsqu'ils se forment sur le matériel médical (seringues, cathéters, prothèses, implants...) ou sur les tissus corporels (yeux, oreilles, poumons...) (Donlan et Costeron 2002). La bactérie la plus étudiée dans le domaine médical est *Pseudomonas aeruginosa*, responsable d'infections pulmonaires chroniques lorsqu'elle est organisée en biofilms chez les patients atteints de mucoviscidose (Vilain *et al.* 2004).

Le domaine alimentaire est confronté à la contamination des produits par les biofilms dans divers secteurs tels que les laiteries, les sucreries, les brasseries... En gros, tout équipement non stérilisé abrite des micro-organismes qui peuvent s'organiser en biofilms en quelques heures, permettant ainsi aux bactéries de devenir résistantes aux agents extérieurs.

Le domaine industriel n'est pas épargné par les problèmes induits par les biofilms qui se forment sur toute sorte de matériaux (métaux, polymères, bétons...). Dans l'industrie papetière par exemple, la formation de biofilms dans les circuits d'eau et sur les machines a de multiples conséquences parmi lesquelles la dégradation de la qualité du produit et les baisses des taux de production liées aux décrochages des biofilms qui vont contaminer la pâte et le papier. Lorsque le développement des biofilms s'effectue sur de longues périodes, il peut causer un encrassement important des surfaces. Le phénomène dit de «biofouling» gagne encore en complexité dans la mesure où de très nombreux micro-organismes et organismes peuvent être impliqués. Les biofilms sont aussi capables d'induire de multiples mécanismes de corrosion directs ou indirects en fonction des conditions du milieu, de la nature du support et de l'écologie des populations microbiennes. On parle alors de corrosion microbienne ou biocorrosion (Patching et Fleming 2003). Le biofouling et la biocorrosion entraînent non seulement des pertes économiques importantes mais aussi des problèmes environnementaux liés aux traitements anti-biofilms (biocides, anti-adhésifs...) nécessaires pour limiter ces phénomènes microbiologiques indésirables.

I.2.4. Rôles positifs des biofilms

Tous les biofilms ne sont pas néfastes pour l'homme, ils peuvent même jouer des rôles positifs dans plusieurs domaines. Dans la nature, les biofilms apportent des contributions essentielles au recyclage des nutriments dans le sol. Ils sont également importants dans la fixation de l'azote et du carbone mais aussi dans des processus de biominéralisation de l'eau accumulée dans les nappes souterraines. Dans ce dernier cas, l'eau subit une épuration naturelle par l'action des biofilms lors de son passage dans les sous-sols (Banwart *et al.* 2007).

Les biofilms peuvent aussi assurer des processus de biorémediation en transformant les matières organiques et inorganiques toxiques en sous-produits inoffensifs. Ce phénomène est exploité dans des sites naturels contaminés à la suite d'une pollution chimique. A cet effet, la population bactérienne doit s'adapter à la nouvelle composition du milieu et utilise comme substrats les contaminants du milieu. Il est ainsi possible d'injecter dans un site contaminé des micro-organismes adaptés à la dégradation biologique de ces polluants (Cunningham *et al.* 2003). On peut citer comme exemple la réduction ou l'oxydation des contaminants de l'eau. Ainsi, les nitrates (NO_3^-) et nitrites (NO_2^-) peuvent être réduits biologiquement en azote (N_2), le perchlorate en H_2O et Cl^- , les solvants chlorés en éthène et Cl^- . La matière organique dissoute et parfois nocive présente dans les effluents peut être convertie par différents micro-organismes en produits utiles pour la société tels que méthane, hydrogène, électricité, éthanol et biodiesel (Rittman 2007).

Les biofilms fluviaux sont souvent utilisés comme indicateurs de pollution car ils sont capables d'accumuler des polluants sur de longues périodes donnant ainsi une indication sur le degré de pollution chronique de leur habitat (Sabater *et al.* 2007).

Dans l'industrie, les biofilms sont utilisés dans différents procédés. Dans l'agroalimentaire par exemple, les bactéries lactiques interviennent dans la fabrication du vin des yaourts et de certains fromages. Les biofilms sont aussi utilisés pour la biolixiviation des minerais. Ce procédé consiste à attaquer une structure solide par des consortiaux bactériens afin de faciliter l'extraction des composés d'intérêt. Il est aujourd'hui utilisé à grande échelle (Sand et Gehrke 2006)

Un des meilleurs exemples pour mettre en évidence l'effet bénéfique des biofilms est leur utilisation dans le domaine du traitement des effluents et de la production d'eau potable grâce à leur capacité à dégrader les polluants contenus dans ces effluents (Rittman 2007). Les biofilms se développant par exemple sur des filtres à sable sont utilisés pour éliminer la matière organique ou les métaux lourds dans divers milieux aqueux; la biomasse immobilisée sur le filtre est ensuite évacuée durant le cycle de rétro-lavage (Davis et Higson 2007).

I.2.5. Les biofilms électro-actifs (EA)

La découverte de la capacité de certains biofilms à échanger des électrons avec les surfaces conductrices sur lesquelles ils se développent a ouvert de nouvelles perspectives technologiques pour la catalyse aux électrodes des piles à combustible. En principe, la procédure de formation d'un biofilm électroactif est très simple: une électrode inerte, le plus souvent en graphite ou carbone est immergée dans une solution anoxique contenant un substrat, souvent de l'acétate, et inoculée par un échantillon de milieu possédant une flore microbienne riche, par exemple des boues activées. L'électrode est polarisée à un potentiel constant ou simplement reliée à une cathode au-travers d'une connexion électrique. On observe ainsi la formation d'un consortium de micro-organismes capables d'utiliser l'électrode comme accepteur d'électrons c'est-à-dire de véritablement «respirer» une

électrode (Liu *et al.* 2008). Au début de la formation du biofilm, l'activité électrocatalytique augmente avec le temps en corrélation avec l'augmentation de la densité des cellules à la surface de l'électrode et/ou du fait de l'amélioration des capacités individuelles de transfert d'électrons de chaque cellule (Fricke *et al.* 2008).

I.3. Les piles à combustible microbiennes (PACMs)

I.3.1. Historique (Schroder 2007; Davis et Higson 2007).

Luigi Galvani fut le premier, en 1790, à noter que les pattes de grenouille étaient capables de se crispier sous l'action d'une excitation électrique. Cette découverte a mis en évidence le fait que certains processus biologiques présentaient des facettes bio-électrochimiques ou encore qu'une action électrique était capable d'induire une réaction biologique. Le botaniste Michael Cresse Potter a découvert en 1911 qu'une électrode de platine placée dans des cultures de levures ou d'*Escherichia coli* était capable de générer une force électromotrice ou une différence de potentiel (Potter 1911). Dans cette communication, Potter arrive à la conclusion que de l'énergie électrique peut être libérée de la désintégration microbienne des composés organiques. Cette observation a été confirmée 20 ans plus tard en 1931 par l'équipe de Cohen à Cambridge qui a développé des batteries à combustible microbiennes en série capables de générer des tensions de plus de 35 V. Bien que ces publications puissent être considérées comme pionnières de la naissance des PACMs, ce n'est que dans les années 60 que le développement des piles à combustible microbiennes s'est accentué lorsque la NASA s'est intéressée à la transformation des déchets organiques en électricité pour ses vols spatiaux. En 1963 les premières piles à combustibles microbiennes furent commercialisées en tant que sources d'énergie dans des radios et appareils en mer, mais les puissances obtenues restaient faibles. Elles furent donc abandonnées car le coût des énergies fossiles était faible et la complexité des processus bio-électrochimiques mis en jeu fut un frein à la compréhension des phénomènes. Pendant ce temps, d'autres technologies de production d'énergies alternatives telles que le photovoltaïque avançaient rapidement.

Au début des années 2000, la pile microbienne a connu un nouvel essor avec les travaux de chercheurs de l'Université du Massachusetts qui ont utilisé un dispositif constitué d'une électrode immergée connectée à une seconde enfouie dans les sédiments marins (Reimers *et al.* 2001). Ils se sont rendu compte au bout de quelques semaines qu'un courant électrique était créé entre les deux électrodes. Leur ingéniosité a consisté à démontrer que le flux d'électrons était généré par la présence de micro-organismes formant un biofilm sur l'anode. Ces derniers étaient capables d'oxyder des déchets organiques contenus dans les sédiments en évacuant les électrons à l'électrode. En d'autres termes, ces micro-organismes réalisaient une catalyse semblable à celle qui exige dans les piles à combustibles classiques la présence de métaux très coûteux (Tender *et al.* 2002). De nombreuses recherches se sont dès

lors orientées vers l'utilisation des bactéries sous forme de biofilms pour la catalyse des réactions aux anodes (Shukla *et al.* 2004; Rabaey et Verstraete 2005; Logan et Regan 2006b; Lovley 2006a; He et Angenent 2006; Watanabe 2008)

Dans le même temps, au sein du Laboratoire de Génie Chimique (CNRS – Université de Toulouse) en collaboration avec le Commissariat pour l'Energie Atomique (CEA) de Saclay, des chercheurs étudiaient la bio-corrosion d'aciers inoxydables en mer. Ils se sont aperçu qu'en favorisant les phénomènes de corrosion induits par les micro-organismes, ils arrivaient à catalyser cette fois une réaction de cathode: la réduction de l'oxygène (Bergel et Féron 2002)

Dans les deux cas, les recherches menées de façon totalement indépendante ont abouti à une véritable avancée scientifique: la découverte que des micro-organismes adhérents à des surfaces conductrices sont capables de connecter leur métabolisme à ces surfaces.

Ces micro-organismes peuvent oxyder une grande variété de molécules organiques, en produisant de l'énergie utile pour leur croissance et le maintien de leur métabolisme. Leur utilisation dans les piles à combustible microbiennes (PACMs) transforme une partie de cette énergie en électricité. On peut par conséquent utiliser comme combustible des PACMs toute sorte de matières organiques des plus simples (glucose, acétate, carbohydrates...) aux plus complexes (cellulose, mélasses...) mais aussi des déchets organiques contenus dans les eaux des stations d'épuration, des déchets agricoles (laiteries, lisiers...), des déchets domestiques et tout type de substrats fermentescibles. Les PACMs permettraient d'assurer une double fonction: produire de l'électricité tout en intensifiant les procédés de traitement des effluents par accélération de la dégradation de la matière organique.

Les PACMs présentent en outre plusieurs intérêts:

- ❖ les micro-organismes contenus dans l'inoculum remplacent les catalyseurs minéraux aux électrodes souvent relativement chers;
- ❖ le rendement de conversion de l'énergie chimique contenue dans le substrat en électricité peut être élevé;
- ❖ les réactions aux électrodes ont lieu à température ambiante;
- ❖ l'énergie est obtenue en une seule étape avec si la conversion est totale et le rendement se rapproche de 100%, production du dioxyde de carbone à la fin de la réaction de dégradation du substrat. Ce qui n'est pas le cas avec par exemple la méthanogénèse pour laquelle l'énergie est obtenue en deux étapes. En effet, une étape supplémentaire de combustion du méthane produit à la fin de la dégradation du substrat est nécessaire;
- ❖ la cathode pouvant être passivement aérée dans le cas des piles à oxygène, cette technologie ne nécessite pas d'apport d'énergie pour l'aération;
- ❖ cette technologie permet l'utilisation de divers substrats comme combustibles allant des composés purs aux substrats plus complexes.

I.3.2. Principe de fonctionnement des PACMs

Le principe de fonctionnement des PACMs offre une nouvelle opportunité pour la production durable d'énergie. Les PACMs peuvent être définies comme des dispositifs électrochimiques qui utilisent l'action catalytique des bactéries organisées en biofilms pour réaliser l'oxydation de composés organiques ou inorganiques en produisant du courant électrique (Manohar *et al.* 2008; Logan *et al.* 2006; Schroder 2007). Ces bactéries sont qualifiées d'exo-électrogènes car elles sont capables de transférer des électrons hors de leurs cellules (Oh *et al.* 2009).

Les PACMs peuvent être complètement microbiennes lorsque la catalyse des réactions aux deux électrodes se fait grâce à des micro-organismes (**Figure 4-A**) ou semi-microbienne dans le cas où la catalyse à la cathode est réalisée par des catalyseurs minéraux (**Figure 4-B**).

Très souvent une membrane échangeuse de protons est utilisée (Nafion®) pour séparer l'anolyte ³du catholyte et pour servir de barrière à toute autre substance que les protons (Rabaey *et al.* 2006). A la surface de la cathode les électrons et les protons se combinent à l'oxygène pour former de l'eau. Souvent une cathode abiotique est mise en œuvre avec des particules de platine comme catalyseur (Mathuriya et Sharma 2009b). D'autres accepteurs finaux d'électrons que l'oxygène tels que l'hexacyanoferrate ou le manganèse (IV) peuvent être utilisés (Logan *et al.* 2006).

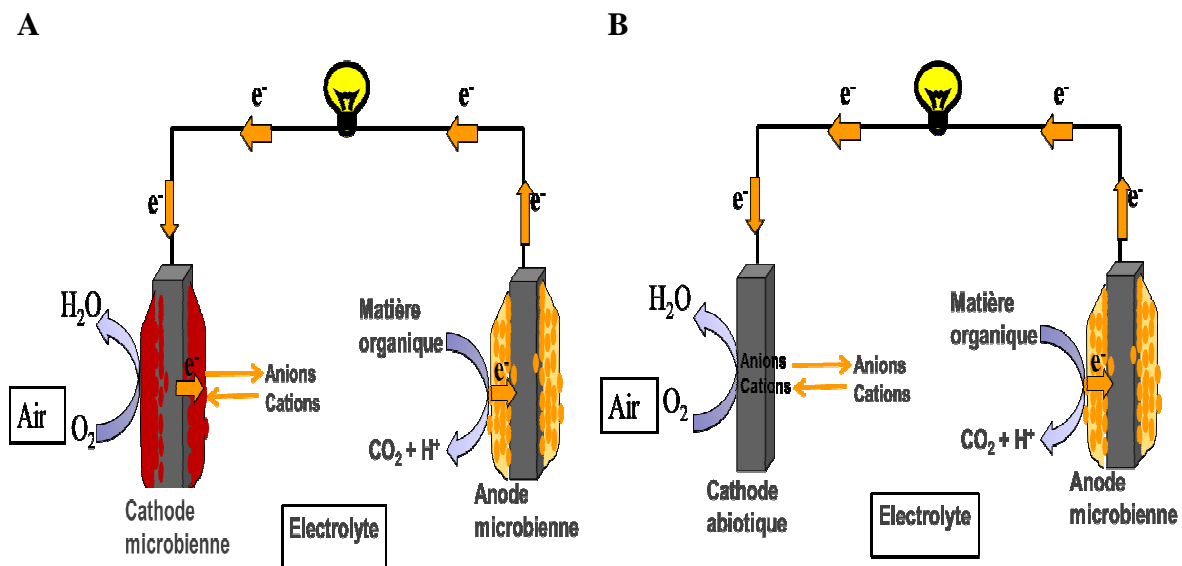


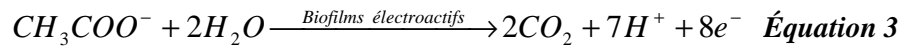
Figure 4: Schémas de piles à combustible. A: totalement microbienne, B: semi-microbienne anodique.

³ Anolyte : électrolyte placé à l'anode ; catholyte : électrolyte placé à la cathode

Dans les paragraphes qui suivent, nous présentons le principe et les différents mécanismes associés à l'anode microbienne (bioanode) ainsi que le principe des différentes cathodes microbiennes (biocathodes) ou abiotiques qui sont utilisées.

I.3.3. Les bioanodes

La dégradation d'un substrat organique à l'anode entraîne la libération de protons et d'électrons. Par exemple, en considérant l'acétate comme substrat:



Les électrons sont transférés à la surface de l'anode puis circulent à travers le matériau conducteur jusqu'à la cathode *via* le circuit électrique externe.

I.3.3.1. Mécanismes de transfert d'électrons vers l'anode (Lovley 2006a; Schroder 2007)

Les micro-organismes oxydent différents substrats en produisant des électrons à l'intérieur de leurs cellules. Ces électrons sont ensuite utilisés dans une cascade de réactions *via* la chaîne de respiration jusqu'au dernier échange avec l'accepteur final d'électrons extracellulaire. Communément il est admis que cet accepteur d'électrons est une molécule soluble comme peut l'être l'oxygène, mais également des acides organiques, des ions minéraux tels que les nitrates, les sulfates ou encore des oxydes métalliques.

I.3.3.1.1. Oxydation abiotique de composés issus du métabolisme bactérien

C'est un mécanisme surtout évoqué dans les premières études avant la découverte des propriétés électroactives des biofilms (*Figure 5*). La fermentation bactérienne donne lieu à des produits métaboliques riches en énergie tels que l'hydrogène, l'éthanol, le formate, ou l'ammonium capables de s'oxyder abiotiquement à l'anode (Karube *et al.* 1977).

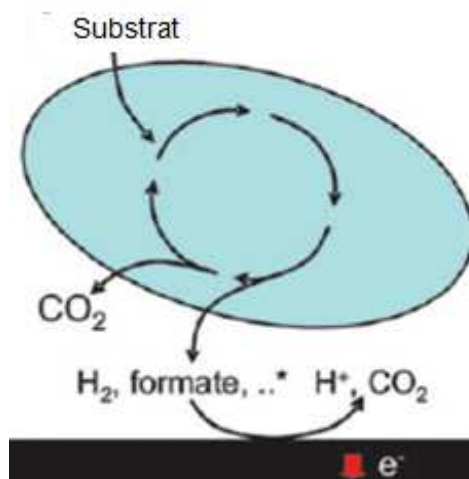
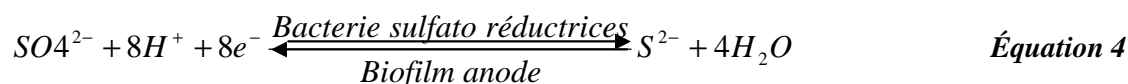


Figure 5: Transfert d'électrons à l'anode via l'oxydation des produits de la fermentation (Schroder 2007)

Pour éviter la récupération de ces métabolites par d'autres processus et en particulier les processus biologiques aérobie, les réactions sont généralement effectuées en milieu anaérobie. La réaction d'oxydation sur la surface de l'anode est abiotique et exige donc la présence d'un catalyseur minéral comme le platine. Les problèmes d'empoisonnement et de désactivation de ces catalyseurs par l'adsorption de toute sorte de composés réduisent considérablement les densités de courant obtenues (Schröder *et al.* 2003). Des progrès significatifs ont été réalisés lorsque les électrodes à base de platine ont été recouvertes par des polymères conducteurs à l'exemple de la polyaniline. Des densités de courant de l'ordre de $1,5 \text{ mA/cm}^2$ ont été obtenues (Schröder *et al.* 2003). Les résultats ont encore été améliorés jusqu'à 3 mA/cm^2 en utilisant des électrodes recouvertes par du carbure de tungstène qui est en outre un électrocatalyseur moins coûteux (Rosenbaum *et al.* 2006).

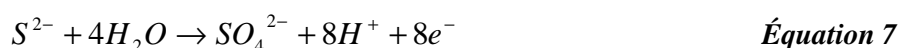
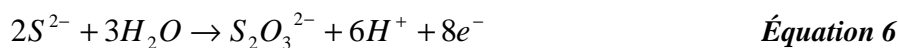
Des composés autres que l'hydrogène ou les acides organiques peuvent être utilisés comme donneurs d'électrons. D'un point de vue thermodynamique, tout couple redox ayant un potentiel redox suffisamment négatif par rapport à celui du couple oxygène/eau ($0,82 \text{ V/ESH}$ à pH 7) et qui est soluble dans l'eau sous ses formes oxydées et réduites pourrait être utilisé pour établir le transfert électronique à l'anode. A titre d'exemple, le couple sulfate/sulfure ($E^0 = -0,22 \text{ V/ESH}$ à pH 7) serait un système parmi les plus appropriés d'un point de vue thermodynamique:



Les bactéries sulfato-réductrices, présentes généralement dans les sédiments, réduisent le sulfate en sulfure qui s'oxyde abiotiquement en soufre S^0 à l'anode (Schroder 2007; Rabaey *et al.* 2006; Ryckelynck *et al.* 2005; Zhao *et al.* 2009):



Si les potentiels redox sont suffisamment élevés, les produits de l'oxydation du sulfure S^{2-} peuvent être des sulfites ou sulfates (Shukla *et al.* 2004; Sun *et al.* 2009)



D'après l'Équation 4, la réduction du sulfate en sulfure nécessite huit électrons. L'oxydation du sulfure en soufre S^0 qui a été suggérée comme étant majoritaire aux électrodes (Schroder 2007; Rabaey *et al.* 2006; Ryckelynck *et al.* 2005; Zhao *et al.* 2009) ne libère que deux électrons (Équation 5) sur les 8 qui seraient nécessaires pour recommencer le cycle (Équations 6 et 7), soit une perte de six électrons. Ce mécanisme n'est donc pas très efficace (Lovley 2006a).

I.3.3.1.2. Transfert électronique par médiateurs

Il existe des bactéries non fermentaires qui ont besoin de médiateurs électrochimiques pour réaliser le transfert électronique à l'électrode. Un médiateur électrochimique est une molécule capable de s'oxyder et de se réduire en cycles successifs. Sous sa forme oxydée le médiateur est capable de pénétrer dans la cellule bactérienne en traversant la membrane cellulaire, d'accepter des électrons d'un ou plusieurs porteurs d'électrons à l'intérieur de la cellule, de sortir de cette dernière sous forme réduite pour se réoxyder à la surface de l'anode en lui transférant les électrons (Lovley 2006a) (Figure 6).

I.3.3.1.2.1. Médiateurs redox artificiels (médiateurs exogènes)

Une large variété de composés a été testée comme médiateurs dans les PACMs, tels que des phénazines, phenothiazines, phenoxazines, flavines, l'anthraquinone-2,6-disulfonate (AQDS), le rouge neutre et les quinones (Lovley 2006a). Ces médiateurs sont employés par les bactéries comme accepteurs finaux d'électrons sous leur forme oxydée. La forme réduite s'oxyde ensuite à l'anode permettant de maintenir le cycle.

Pour qu'une molécule soit utilisée comme médiateur, elle doit satisfaire les critères suivants: sa forme oxydée doit facilement pénétrer à travers la membrane; les cinétiques des réactions d'oxydation à l'électrode doivent être rapides; son potentiel d'oxydo-réduction doit être proche de celui du métabolite réducteur; aucune de ses formes oxydées ne doit interférer avec d'autres processus métaboliques; enfin ses formes oxydées et réduites doivent être

chimiquement stables dans l'électrolyte, facilement solubles et ne doivent s'adsorber ni sur la membrane bactérienne ni à la surface de l'électrode (Shukla *et al.* 2004).

Ce mode de transfert *via* des médiateurs artificiels (**Figure 6**) a montré de nombreux inconvénients qui font qu'aujourd'hui, à l'exception de quelques recherches fondamentales, les travaux dans ce domaine ont été abandonnés. Parmi ces inconvénients on peut citer les faibles densités de courant produites par ces systèmes ($10\text{-}100\ \mu\text{A}/\text{m}^2$) et leur instabilité qui induit la nécessité d'en rajouter régulièrement dans le milieu. De plus, ces médiateurs sont le plus souvent toxiques (Lovley 2006a).

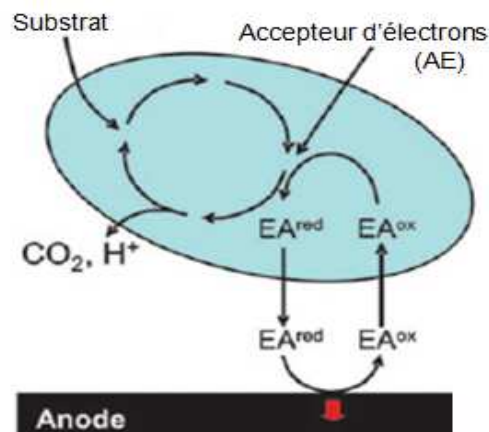


Figure 6: Transfert d'électrons à l'anode via les médiateurs artificiels (Schroder 2007)

I.3.3.1.2.2. Bactéries qui produisent leurs propres médiateurs (médiateurs endogènes)

Certaines bactéries sont capables de produire elles-mêmes leurs médiateurs électrochimiques. Il s'agit de bactéries qui croissent dans des conditions où elles n'ont pas d'accepteurs d'électrons solubles, par exemple des bactéries vivant au cœur de biofilms épais où la diffusion de l'oxygène est limitée. Le mécanisme de transfert est identique à celui des médiateurs artificiels (Rabaey *et al.* 2004).

La biosynthèse de ces transporteurs d'électrons est coûteuse énergiquement pour la bactérie. Une molécule doit donc servir à des centaines de cycles redox pour permettre à la bactérie de récupérer l'investissement énergétique engagé lors de sa fabrication (Lovley 2006a).

L'identification de ces médiateurs transporteurs d'électrons reste un challenge. La pyocyanine et le 2-amino-3-carboxy-1,4-naphtho-quinone (ACNQ) sont des exemples de médiateurs endogènes dont l'implication a été démontrée dans les processus de transfert d'électrons (Hernandez et Newman 2001). Il a été proposé deux stratégies en ce qui concerne le transfert d'électrons dans les PACMs par ce type de médiateurs, soit le médiateur pénètre à

l'intérieur de la cellule, soit les électrons sont transférés au-travers d'un composé membranaire et le médiateur reste à l'extérieur de la cellule (*Figure 7*).

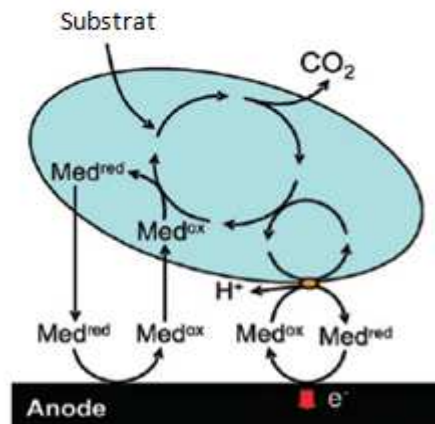


Figure 7: Transfert électronique via des médiateurs endogènes. Deux mécanismes redox possibles: via les protéines externes membranaires (cytochromes) ou via les couples redox du périplasma ou du cytoplasme (Schroder 2007).

I.3.3.1.3. Transfert électronique direct

Ce mode de transfert implique un contact direct entre la membrane de la cellule bactérienne et l'anode, sans qu'il n'y ait besoin d'espèces redox dissoutes pour le transport d'électrons, comme dans les cas précédents. Il a été démontré par des études génétiques que les cellules de certaines bactéries possèdent à leur surface des protéines redox, de type cytochrome C, capables de transférer les électrons de l'intérieur de la cellule bactérienne à l'extérieur, au niveau d'un accepteur solide d'électrons qui peut être un oxyde métallique ou une anode (Schroder 2007; Lovley 2008; Logan et Regan 2006b).

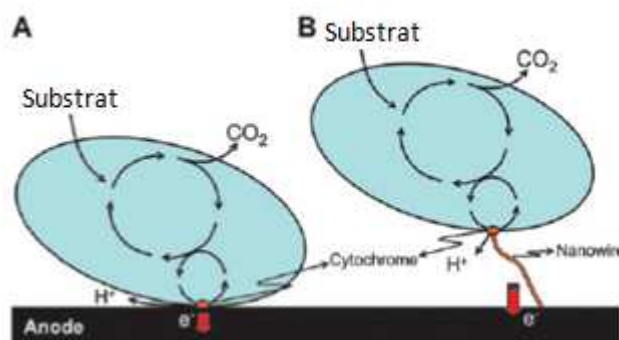


Figure 8: Deux mécanismes de transfert possibles: A= via les cytochromes membranaires; B= via les pilis ou «nanowires» conducteurs (Schroder 2007).

Ce mode de transfert qui requiert l'adhésion des bactéries à l'électrode ne peut fonctionner qu'avec la première couche de bactéries. Un calcul effectué en considérant : qu'une couche de cellules électroactives recouvre 100% de la surface d'une électrode avec un rendement typique de croissance bactérienne anaérobie donne une puissance maximale de 2,2 W/m² (Liu et Logan 2004). Cette puissance étant dépassée dans plusieurs études dans lesquelles aucun ajout de médiateur artificiel n'est effectué (Fan *et al.* 2008; Borole *et al.* 2009), le calcul a mis en évidence la capacité de certaines bactéries à transférer des électrons à des surfaces non contiguës.

Certaines bactéries sont capables de produire des pilis conducteurs. Ces pilis sont des nano-fils ou nano-câbles (nano-wires) capables de se connecter électriquement aux bactéries primo-adhérentes (Schroder 2007; Logan et Regan 2006a; Lovley 2006a; Gorby *et al.* 2006; Reguera *et al.* 2005) ou directement à l'électrode elle-même (He et Angenent 2006). La formation de ces nano-fils permet le développement de biofilms électro-actifs épais capables d'utiliser un accepteur même distant, ce qui conduit à de grandes performances anodiques. Reguera *et al.* (2006) ont montré une augmentation de la production d'électricité d'un facteur supérieur à 10 attribuée à la formation de pilis dans un biofilm EA issu d'une culture pure de *Geobacter sulfurreducens*. (Reguera *et al.* 2006).

Tous les mécanismes présentés ci-dessus sont encore discutés car les espèces redox mises en jeu sont difficiles à identifier. Quelques-uns des obstacles rencontrés résident dans la complexité des métabolismes microbiens, la faible concentration des espèces redox mises en jeu, la présence de multiples espèces microbiennes dans les biofilms naturels et la diversité des membranes cellulaires qui peuvent contenir plusieurs espèces redox ne contribuant pas nécessairement à la génération de courant (Fricke *et al.* 2008).

I.3.3.2. Constitution des biofilms électro-actifs: cultures pures ou communautés mixtes

Il est généralement admis que des communautés mixtes produisent plus de densités de puissance dans les PACMs que les cultures pures (Nevin *et al.* 2008; Logan *et al.* 2006). Les cultures pures ont plusieurs inconvénients:

- ❖ les bioanodes obtenues métabolisent une gamme assez limitée de composés organiques;
- ❖ ces bioanodes ne sont pas pratiques pour des applications industrielles car elles nécessitent des conditions opératoires stériles;
- ❖ elles sont plus coûteuses que les biofilms naturels.

Les cultures pures sont donc généralement utilisées pour la recherche à l'échelle du laboratoire plutôt que pour un développement industriel. Les résultats obtenus sont plus facilement interprétables (Pham *et al.* 2009; Pham *et al.* 2006; Jiang *et al.* 2010b; Kim *et al.*

2007) et elles permettent d'exploiter les outils du génie génétique pour avancer dans la compréhension des mécanismes de transfert d'électrons.

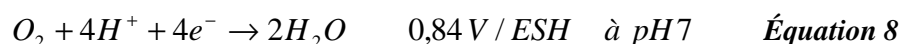
Les biofilms issus des communautés mixtes peuvent être obtenus à partir de divers environnements naturels tels que les eaux usées, les sols, les sédiments, les boues provenant d'usines de traitement des déchets... Ces cultures contiennent un nombre important de bactéries électroactives. Elles peuvent s'adapter spontanément aux changements de conditions environnementales et de ce fait sont considérées comme robustes dans les systèmes de PACMs. Elles offrent en plus l'accès à une large gamme de substrats pouvant provenir d'environnements dont les caractéristiques sont variables (Niessen *et al.* 2004; Liu *et al.* 2008). Les bioanodes constituées de communautés mixtes sont ainsi des systèmes non stériles, plus adéquats pour l'utilisation d'une large gamme de combustibles complexes tels que les matières organiques contenues dans les eaux usées et plus proches du domaine d'application industriel.

Il est néanmoins difficile d'étudier les mécanismes qui sont responsables de la production de courant dans les communautés mixtes à cause de la difficulté à reproduire et stabiliser leur composition microbienne. De plus, les analyses fonctionnelles qui ont recours à la manipulation des expressions génétiques, faciles à réaliser avec les cultures pures, sont beaucoup plus difficiles techniquement avec les cultures mixtes. La composition de la communauté mixte dans les PACMs est faiblement définie et peut évoluer avec le fonctionnement de la pile. On a ainsi peu d'informations pour distinguer les micro-organismes qui contribuent réellement à la production de courant de ceux qui jouent des rôles mineurs de support dans la communauté (Nevin *et al.* 2008).

Dans une communauté mixte, plusieurs voies métaboliques peuvent être disponibles dues à des interactions synergiques entre micro-organismes, incluant des mécanismes inconnus et une grande diversité de substrats organiques. De plus, la communauté est capable de maximiser l'efficacité énergétique et de réduire les surtensions extracellulaires pour s'adapter au potentiel de l'anode (Chae *et al.* 2009; Torres *et al.* 2009).

I.3.4. Les cathodes abiotiques (He et Angenent 2006; Du *et al.* 2007; Watanabe 2008).

Dans la majorité des PACMs l'oxygène est utilisé comme oxydant à la cathode car il est gratuit (surtout facilement disponible dans l'air), il conduit à un produit final non toxique (H₂O) et son potentiel d'oxydation est élevé (Franks et Nevin 2010)



Pour améliorer le transport de l'oxygène vers la surface de la cathode, de l'air peut être barboté dans l'électrolyte d'un compartiment cathodique aqueux. Toutefois la solubilité de l'oxygène dans l'eau est faible (1 mM à température ambiante sous 1 atm d'oxygène et 0.28 mM à l'équilibre avec l'air) et le transport de l'oxygène reste une étape limitant les

performances des piles (Logan et Regan 2006a). Pour pallier ce problème, les cathodes dites à air exposent l'une de leurs faces à l'air (Fan *et al.* 2007b; Lefebvre *et al.* 2009; Zhang *et al.* 2011). Toutefois, la cinétique de réduction de l'oxygène reste faible aux surfaces des électrodes de carbone, ce qui conduit à de fortes surtensions. Il est donc nécessaire de recouvrir les cathodes d'une couche de catalyseur comme le platine, le plus utilisé. Le platine est cher et, confronté au problème d'empoisonnement lié aux nombreux composés présents dans les eaux usées, son activité catalytique baisse considérablement. De plus, il n'est pas un catalyseur de réduction de l'oxygène très efficace aux valeurs de pH neutres ou alcalines qui sont utilisées dans les PACMs.

La recherche s'est tournée ces dernières années vers des catalyseurs alternatifs tels que les ions ferriques. Lorsqu'une électrode est imprégnée par le Fe(III), il est réduit en Fe(II) par les électrons issus de la réaction anodique, le Fe(II) est ensuite réoxydé en Fe(III) par l'oxygène (Heijne *et al.* 2006). Ce mécanisme à la cathode combiné à une anode dopée au Mn(IV) a conduit à des performances plus élevées ($1,75 \text{ A/m}^2$ et 788 mW/m^2) (Park et Zeikus 2003) que celle obtenues avec les électrodes non traitées dans les mêmes conditions ($0,27 \text{ A/m}^2$ et $0,17 \text{ mW/m}^2$) (Park et Zeikus 2000).

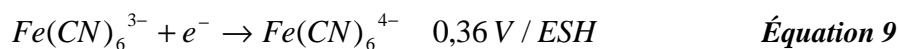
Etant donné leur faible coût, différents oxydes de métaux ont été testés comme catalyseurs cathodiques: des oxydes de manganèse (MnO_2) (Scott et Roche 2008; Jiang *et al.* 2011), des oxydes de cobalt (CoO_2) (Li *et al.* 2011; Mahmoud *et al.* 2011) et des oxydes de plombs (PbO_2). Dans le dernier cas, malgré des performances supérieures à celles du platine, le plomb étant un agent très toxique pour les organismes vivants, il est indispensable d'utiliser un système à deux compartiments (Morris *et al.* 2007).

Le rutile (TiO_2) a aussi été évalué comme catalyseur cathodique. Des densités de courant supérieures ont été obtenues avec ce matériau par rapport au platine mais des puissances plus faibles. Néanmoins, lorsque la cathode est exposée à la lumière la puissance produite passe à 12 W/m^3 (220 mW/m^2) par rapport à 7 W/m^3 (128 mW/m^2) obtenue dans le noir (Lu *et al.* 2011).

Différents autres catalyseurs ont été testés: à base de phtalocyanine de fer (FePc) (Zhao *et al.* 2006; Cheng *et al.* 2006a; Zhuang *et al.* 2010), de cobalt (CoPc), de manganèse (MnPc) et de fer-cuivre (FeCuPc) avec une meilleure performance dans le cas du FePc (Haoyu *et al.* 2008). On retrouve également des tests avec des catalyseurs à base de tétraméthoxyphénylporphyrine (TMPP) ou de cobalt (CoTMPP) (Cheng *et al.* 2006a; Zhao *et al.* 2006) ou de fer-cobalt (FeCoTMPP). Les performances obtenues avec le CoTMPP montrent une réactivité similaire avec le platine mais inférieure à celle du FePc. (Haoyu *et al.* 2008). Une étude a récemment montré des performances intéressantes bien qu'inférieures à celles de FePc avec le ClFeTMPP (Birry *et al.* 2011).

Ces différents catalyseurs sont liés aux surfaces des électrodes grâce à des liants polymères tels que le Nafion® ou le polytetrafluoroéthylène (PTFE).

Pour contourner la lenteur des cinétiques de réduction de l'oxygène, des systèmes cathodiques basés sur la réduction de l'hexacyanoferrate (III) ont été proposés (Borole *et al.* 2009; Yuan *et al.* 2011).



L'avantage majeur de l'hexacyanoferrate est sa cinétique de réduction rapide qui permet à la cathode de travailler à un potentiel proche du potentiel à circuit ouvert. Les PACMs peuvent alors fournir des densités de puissance significatives du fait du potentiel constant et élevé à la cathode (Lee *et al.* 2008). Toutefois, l'implémentation de ce système hors d'un laboratoire n'est pas pratique car la régénération par l'oxygène de l'hexacyanoferrate (III) produit est lente et nécessite que le catholyte soit régulièrement renouvelé (Zhao *et al.* 2006; Lee *et al.* 2008; Franks et Nevin 2010).

I.3.5. Les biocathodes (He et Angenent 2006)

Dans la quête d'un catalyseur adéquat pour la réduction de l'oxygène, la recherche s'est tournée vers l'utilisation des biocathodes. Il existe des bactéries qui organisées en biofilms sur la surface d'une cathode sont capables d'en extraire des électrons pour assurer la réduction de l'oxygène ou de composés organiques ou minéraux dissous dans le milieu tel que les nitrates ou les sulfates. On parle dans ce cas de biocathodes (Hong *et al.* 2009).

Les biocathodes présentent plusieurs avantages par rapport aux cathodes abiotiques à savoir:

- ❖ les coûts de conception et d'opération réduits: la présence de catalyseurs métalliques ou de médiateurs artificiels est inutile puisque les micro-organismes jouent ce rôle;
- ❖ la durabilité des PACMs améliorée: les problèmes d'empoisonnement du catalyseur platine ou de consommation et de réapprovisionnement de médiateurs artificiels sont éliminés;
- ❖ certains micro-organismes, à l'exemple des algues, peuvent aussi être utilisés pour produire de l'oxygène grâce aux réactions de photosynthèse, permettant ainsi d'éviter l'approvisionnement externe en oxygène (Lewis 1966);
- ❖ dans certains cas, les biocathodes permettent de réaliser des réactions d'intérêts telles que:
 - les processus de nitrification/dénitrification : les bactéries éliminent l'azote des eaux usées par deux processus biologiques successifs à savoir la nitrification au cours de laquelle l'ammonium (NH_4^+) est transformé en nitrates (NO_3^-) et la dénitrification qui consiste à la réduction du nitrate en azote gazeux (N_2) (Puig *et al.* 2011; Zhang et He 2012);

- les processus de biorémediation : les micro-organismes sont utilisés pour éliminer ou neutraliser des contaminants spécifiques dans l'environnement (Banwart *et al.* 2007; Strycharz *et al.* 2010; Aulenta *et al.* 2012);
- les processus de biominéralisation : les micro-organismes favorisent la précipitation de certains minéraux à la surface des électrodes (Rhoads *et al.* 2005; Nguyen *et al.* 2007). Par exemple, l'extraction des minerais du fer et du manganèse par réduction microbienne du Fe(III) ou du Mn(IV) (Lovley 1991);
- les processus de synthèse: les micro-organismes sont utilisés pour synthétiser des produits d'intérêt dans les cellules électrochimiques *via* de l'énergie électrique fournie au système (Flynn *et al.* 2010; Steinbusch *et al.* 2012).

Dans tous ces exemples les bioréacteurs travaillent en mode électrolyseur. Nous ne nous appesantirons donc pas sur cet aspect des biocathodes car nous choisissons de ne décrire que celles utilisables dans les PACMs.

Généralement, les biocathodes utilisées dans les PACMs sont classées en aérobies ou anaérobies en fonction de l'accepteur terminal d'électrons.

I.3.5.1. Biocathodes en milieux aérobies (Lovley 2006a; He et Angenent 2006; Schamphelaire *et al.* 2008)

Les premières biocathodes aérobies sont issues des travaux effectués dans le domaine de la corrosion marine où la catalyse de la réduction de l'oxygène était étudiée depuis de nombreuses années. Lorsque des électrodes en acier inoxydable sont immergées dans des eaux de mer aérobies, le biofilm développé à la surface augmente la vitesse de réduction de l'oxygène. Les électrons nécessaires à cette réaction proviennent de la surface du métal, causant ainsi une augmentation du potentiel libre de celui-ci. La conséquence peut être une rupture de la couche d'oxydes protectrice de l'acier et finalement une augmentation des phénomènes de corrosion (Bergel *et al.* 2005). Le concept a été testé dans l'élaboration d'une pile totalement microbienne en milieu marin dans laquelle la flore microbienne anaérobie des sédiments marins est exploitée à l'anode et un biofilm microbien aérobie développé à la cathode sert de catalyseur de la réduction de l'oxygène. La PACM est capable de produire en laboratoire une densité de courant supérieure à 140 mA.m^{-2} et une densité de puissance de 23 mW.m^{-2} (Dumas *et al.* 2007). Il a été prouvé que seul le biofilm est responsable de la réaction catalytique car l'élimination du biofilm de la surface de l'électrode entraîne la disparition totale du courant (Dumas *et al.* 2008b.). La puissance de la pile est passée à 100 mW.m^{-2} lorsque l'anode qui était précédemment en acier inoxydable a été remplacée par du graphite (Dumas *et al.* 2008d).

D'autres études sur des biocathodes catalysant la réduction de l'oxygène ont été réalisées dans des milieux pauvres en sel avec des électrodes autres que l'acier inoxydable (Schamphelaire *et al.* 2008).

Les mécanismes qui expliquent la corrosion bactérienne aérobie sont variés. Certaines études concernant les piles microbiennes mettent à profit des mécanismes faisant intervenir le manganèse ou le fer. Dans le premier cas, des bactéries mangano-oxydantes oxydent les ions manganèse Mn^{2+} en MnO_2 (**Figure 9**), qui se réduisent ensuite à la cathode pour donner Mn^{2+} (Rhoads *et al.* 2005). De même, dans le cas du fer, des bactéries ferro-oxydantes oxydent les ions ferreux Fe^{2+} en ions ferriques Fe^{3+} qui se réduisent ensuite à la cathode (Heijne *et al.* 2006). Dans les deux cas les ions métalliques sont biologiquement recyclés en donnant leurs électrons à la cellule bactérienne. Ces électrons sont ensuite transférés à l'oxygène.

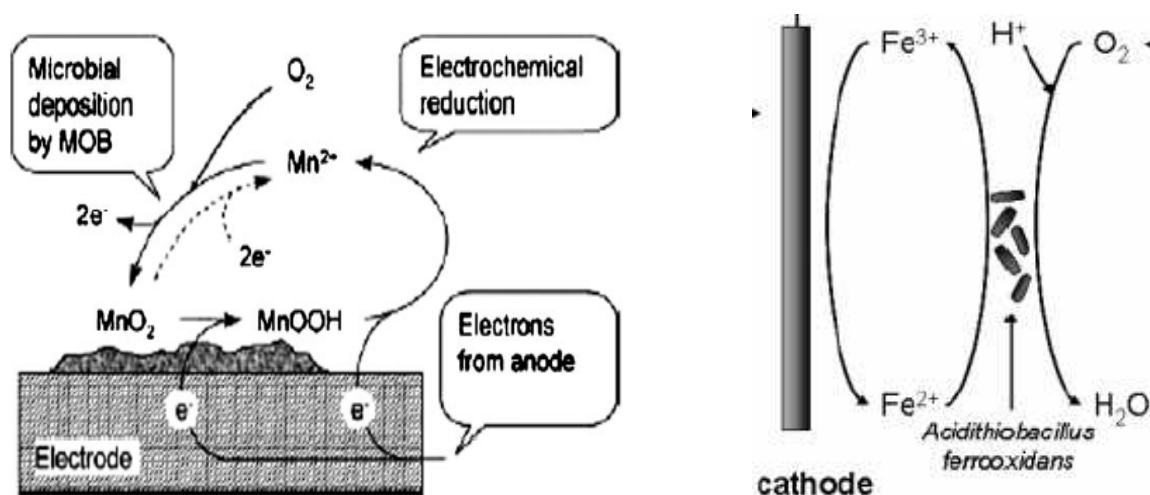


Figure 9: Mécanisme de transfert indirect entre les bactéries (A) mangano-oxydantes (Rhoads *et al.* 2005) et (B) ferro-oxydantes (Heijne *et al.* 2006)

I.3.5.2. Biocathodes en milieux anaérobies

En l'absence d'oxygène, d'autres composés tel que les nitrates, les sulfates, le fer, le manganèse, le selenate, l'arsenate, l'urate, le fumarate et le dioxyde de carbone peuvent être réduits et fonctionner comme accepteurs terminaux d'électrons. Sur la base des potentiels redox, le fer, le nitrate et le manganèse ont des propriétés électrochimiques proches de celles de l'oxygène. Ils sont donc des accepteurs terminaux d'électrons intéressants dans les PACMs (He et Angenent 2006).

Le **Tableau 2** présente quelques couples redox, leur potentiel standard ainsi que les réactions possibles au niveau de biocathodes.

| Couples redox | Potentiels redox (V/ESH) | Reactions redox |
|--|--------------------------|--|
| CO ₂ /glucose | -0,43 | 6CO ₂ + 24H ⁺ + 24e ⁻ → C ₆ H ₁₂ O ₆ + 6H ₂ O |
| CO ₂ /formate | - 0,43 | CO ₂ + 4H ⁺ + 4e ⁻ → CH ₂ O ₂ + H ₂ O |
| H ⁺ /H ₂ | - 0,42 | 2H ⁺ + 2 e ⁻ → H ₂ |
| Ferredoxin ox/red | -0,42 | Ferredoxin(Fe ³⁺) + e ⁻ → Ferredoxin (Fe ²⁺) |
| NaD ⁺ /NaDH | -0,32 | NaD ⁺ + H ⁺ + 2 e ⁻ → NaDH |
| CO ₂ /acétate | -0,28 | 2CO ₂ + 8H ⁺ + 8e ⁻ → C ₂ H ₄ O ₂ + 2H ₂ O |
| S ⁰ /H ₂ S | -0,274 | S + 2H ⁺ + 2 e ⁻ → H ₂ S |
| CO ₂ /CH ₄ | -0,22 | CO ₂ + 8H ⁺ + 8e ⁻ → CH ₄ + 2H ₂ O |
| SO ₄ ²⁻ /H ₂ S | -0,22 | SO ₄ ²⁻ + 10 H ⁺ + 8e ⁻ → H ₂ S + 4 H ₂ O |
| Pyruvate/Lactate | -0,185 | Pyruvate ²⁻ + 2H ⁺ + 2e ⁻ → Lactate ²⁻ |
| Fumarate/Succinate | +0,033 | Fumarate ²⁻ + 2H ⁺ + 2e ⁻ → Succinate ²⁻ |
| Cytochrome b _{ox/red} | +0,075 | Cytochrome b(Fe ³⁺) + e ⁻ → Cytochrome b(Fe ²⁺) |
| Ubiquinone/UbiquinoneH ₂ | +0,1 | Ubiquinone + 2H ⁺ + 2 e ⁻ → Ubiquinone H ₂ |
| Cytochrome C _{ox/red} | +0,254 | Cytochrome b(Fe ³⁺) + e ⁻ → Cytochrome b(Fe ²⁺) |
| Fe(CN) ₆ ³⁻ /Fe(CN) ₆ ⁴⁻ | +0,36 | Fe(CN) ₆ ³⁻ + e ⁻ → Fe(CN) ₆ ⁴⁻ |
| NO ₃ ⁻ /NO ₂ ⁻ | +0,43 | NO ₃ ⁻ + 2H ⁺ + 2 e ⁻ → NO ₂ ⁻ + H ₂ O |
| NO ₂ ⁻ /NH ₄ ⁺ | +0,44 | NO ₂ ⁻ + 8H ⁺ + 6 e ⁻ → NH ₄ ⁺ + 2H ₂ O |
| MnO ₂ /Mn ²⁺ | +0,60 | MnO _{2(s)} + 4H ⁺ + 3e ⁻ → Mn ²⁺ + 2H ₂ O |
| Fe ³⁺ /Fe ²⁺ | +0,771 | Fe ³⁺ + e ⁻ → Fe ²⁺ |
| 1/2O ₂ /H ₂ O | +0,84 | O ₂ + 4H ⁺ + 4 e ⁻ → 2H ₂ O |

Tableau 2: Quelques couples, potentiels standards et réactions redox pouvant avoir lieu aux électrodes de PACMs à pH 7 (Rabaey et Verstraete 2005; He et Angenent 2006; Schroder 2007).

Bien que l'utilisation de sulfate comme accepteur final d'électrons soit moins avantageuse d'après les valeurs de potentiels redox, des recherches sur les biocathodes à base de sulfate ont été effectuées (Lovley 2006a; Ryckelynck *et al.* 2005). Généralement, dans ces biocathodes le sulfate n'accepte pas directement les électrons de la cathode car il y'a une étape intermédiaire qui est la réduction en sulfure. D'autres composés ont été réduits dans des biocathodes anaérobies à l'exemple du nitrate en di-azote (Ho Il Park *et al.* 2005) et du dioxyde de carbone en méthane (Park *et al.* 1999).

I.3.6. Les constituants d'une PACM

La bibliographie propose, pour former les électrodes de PACMs, des matériaux à base d'acier inoxydable, d'or et de carbone sous différentes formes avec l'objectif final d'obtenir une électrode ayant une surface active la plus grande possible.

I.3.6.1. Les matériaux d'anode

Les matériaux d'électrodes utilisés à l'anode doivent être biocompatibles et chimiquement stables dans l'électrolyte (Logan *et al.* 2006). Bien que leur résistivité au transfert d'électrons soit près de 1000 fois supérieure à celle des métaux, ce sont les matériaux à base de carbone disponibles sous forme de plaques, barres, granules ou encore sous forme de matériaux fibreux (feutre, tissu, papier, fibre, mousse) qui sont les plus fréquemment utilisés comme anodes (Pham *et al.* 2009). En effet, ils sont non seulement stables dans les cultures microbiennes, peu chers, faciles à utiliser, mais ils possèdent en outre de grandes surfaces actives qui permettent d'obtenir de meilleurs rendements pour les piles (Logan *et al.* 2006; Watanabe 2008). La morphologie complexe des matériaux rend les surfaces spécifiques difficiles à évaluer. Les densités de courant sont donc exprimées le plus souvent par rapport à leur surface projetée. Il a été démontré que la modification de la surface des anodes à base de carbone avec des polymères organiques conducteurs (la polyaniline étant le plus fréquemment utilisé) permet d'augmenter les densités de courant. Qiao *et al.* (2007) ont montré que des nanotubes de carbones modifiés avec de la polyaniline permettent d'obtenir une puissance de 42 mW/m^2 avec des cultures pures d'*Escherichia coli* (Qiao *et al.* 2007) alors que les études précédentes n'offraient que des puissances beaucoup plus faibles. Lorsque ces nanotubes de carbone sont de plus dopés par du TiO_2 (matériau organique mésoporeux dont les pores ont une distribution uniforme), la surface spécifique de l'électrode est augmentée et la densité de puissance de la pile passe à 1495 mW/m^2 dans les mêmes conditions expérimentales (Qiao *et al.* 2008).

Parmi les matériaux cités ci-dessus, certains semblent toutefois moins adéquats pour une mise en œuvre dans une PACM à cause de leur manque implicite de durabilité (papiers de carbone) ou de leur coût (barres de graphite), le prix des matériaux étant un facteur clé pour une application prospère à grande échelle. (Logan et Regan 2006a).

I.3.6.2. Les matériaux de cathode

L'efficacité des réactions à la cathode dépend de la concentration de l'accepteur d'électrons, de la disponibilité des protons qui proviennent de l'anode, de la performance du catalyseur et de la structure de l'électrode. Comme avec les anodes, les matériaux à base de carbone et graphite sont les plus utilisés comme cathodes étant donné leurs prix et performances, mais ils doivent être enrichis de métaux nobles nécessaires à la catalyse de la réaction électrochimique (Cf paragraphe I.3.4.).

I.3.6.3. Le séparateur, la membrane échangeuse d'ions

Dans le cas des PACMs avec cathode à air (*Cf Figure 4-B*), une membrane spécifique doit être utilisée comme séparateur entre l'anode et la cathode. Elle doit être non conductrice, avoir une forte perméabilité aux ions et une faible perméabilité à l'oxygène. Les protons doivent facilement la traverser et elle doit limiter la diffusion de l'oxygène vers l'anode sans trop affecter la résistance interne de la pile (Fan *et al.* 2007b).

Dans la plupart des PACMs, le transfert ionique entre anode et cathode est un phénomène limitant. En effet, pendant que les électrons se déplacent rapidement de l'anode vers la cathode par conduction électronique dans le circuit externe, les ions sont plus lents à équilibrer les charges par migration dans l'électrolyte. Ce transfert ionique est la cause majeure de la résistance interne. De plus, le transfert lent des protons, qui sont en faible concentration aux pH proches de la neutralité, crée des gradients de pH aux électrodes qui affectent les vitesses de réactions. L'accumulation des protons à l'anode provoque une acidification locale qui ralentit l'activité microbienne d'oxydation. Inversement, la faible disponibilité des protons au voisinage de la cathode réduit la vitesse de la réaction cathodique. L'utilisation de membranes échangeuse de protons (le plus souvent la membrane Nafion®) par analogie avec les piles à combustible chimiques constitue une barrière supplémentaire. L'utilisation de membrane échangeuse d'anions s'est révélée plus judicieuse (Kim *et al.* 2012).

La nature de l'électrolyte est évidemment très importante. La chute ohmique au sein de la cellule dépend de la concentration ionique de l'électrolyte et de la distance entre les électrodes. Généralement une solution tamponnée de phosphate à 50 mM est utilisée dans les dispositifs de laboratoire et la distance entre les électrodes est inférieure à 4 cm (Wang *et al.* 2010).

I.3.6.4. Les substrats

L'anolyte est souvent complété par un substrat (donneur d'électrons) lorsque le milieu n'est pas suffisamment riche en matières organiques oxydables. Le substrat sert de combustible à la pile, mais aussi de source d'énergie et/ou de carbone pour les micro-organismes. Il influence la composition de la communauté bactérienne qui compose le biofilm et par incidence les performances de la PACM (densité de puissance et rendement faradique) (Pant *et al.* 2009).

A l'anode des PACMs plusieurs substrats ont déjà été testés mais l'acétate est le plus souvent utilisé comme combustible modèle car il est rapidement biodégradable (Kim *et al.* 2005) et non fermentescible. Il n'est donc pas consommé par d'autres voies métaboliques que la respiration de l'anode (Torres *et al.* 2009; Pant *et al.* 2009; Chae *et al.* 2009).

A la cathode, les substrats généralement utilisés hormis l'oxygène sont les sulfates et les nitrates.

I.3.7. Différentes architectures de PACMs

Les architectures de pile sont présentées dans cette section qui ne fait pas une revue exhaustive de tous les dispositifs qui ont été décrits dans la bibliographie.

I.3.7.1. PACMs à deux compartiments

Un système à deux compartiments consiste en un compartiment anodique et un compartiment cathodique séparés par un séparateur, par exemple une membrane échangeuse d'ions ou un pont salin. Outre la migration ionique, le séparateur doit aussi éviter la diffusion de l'oxygène vers l'anode. Du *et al.* (2007) dans une revue ont listé cinq formes de PACMs à deux compartiments (Du *et al* 2007).

Le premier système de PACM a été présenté en 1993 par Allen et Benetto. Il comporte deux électrodes de carbone séparées par une membrane comme schématisé sur la *Figure 10*.

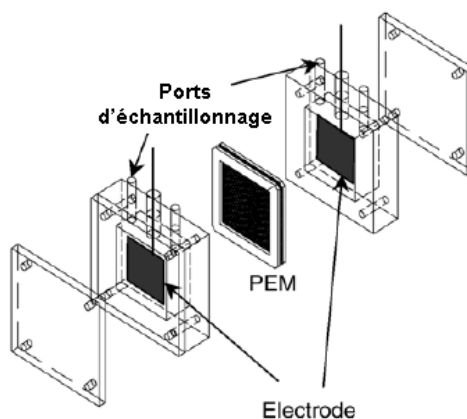


Figure10: PACM à deux compartiments de forme rectangulaire schématisé par Du *et al*, 2007 et adapté de Allen et Benetto, 1993.

Ringeisen *et al* ont présenté une pile à deux compartiments avec un design miniaturisé (*Figure 11*) ayant permis d'atteindre de fortes densités de puissance jusqu'à 3 W/m² ou 500 W/m³. Cette pile est constituée d'électrodes de carbone vitreux de 2 cm² de surface avec 2 cm³ de volume utile pour chaque compartiment. Elle est inoculée à l'anode par une culture pure de *S. oneidensis* et utilise du lactate comme substrat. La cathode utilise une solution de 100 mM de ferricyanure. Les auteurs pensent que ces systèmes peuvent être utiles pour l'alimentation des capteurs autonomes pendant des opérations longues dans des régions peu accessibles (Ringeisen *et al.* 2006).

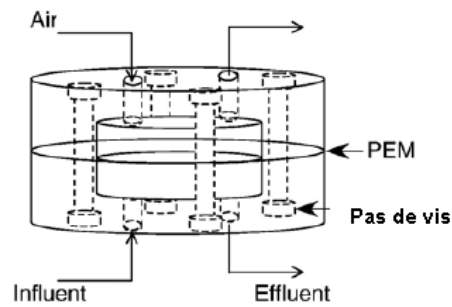


Figure 11: PACM miniaturisée à deux compartiments (Ringeisen et al. 2006).

Une PACM à deux compartiments en forme de H a été présentée pour la première fois par Min *et al.* (Min et Logan 2004; Min *et al.* 2005a). Elle consiste en deux flacons en verre connectés par un tube équipé en son milieu d'un séparateur (**Figure 12**).

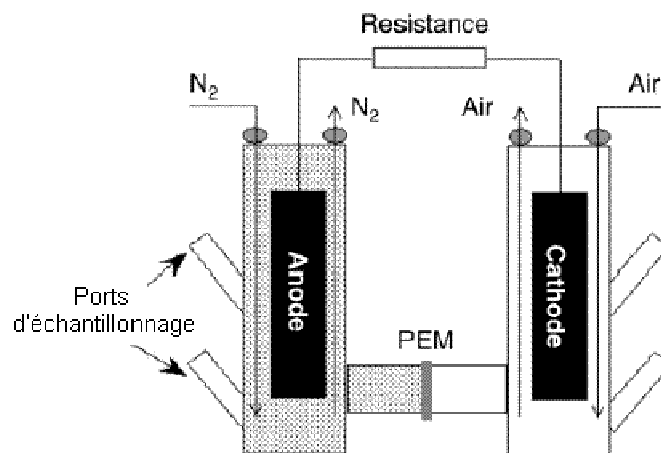
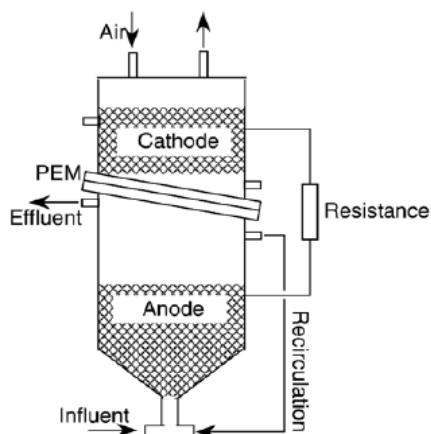


Figure 12: PACM à deux compartiments en forme de H (Min et Logan 2004; Min *et al.* 2005a).

Ces systèmes ne sont acceptables que pour une recherche basique sur les paramètres des PACMs comme par exemple pour tester la puissance produite par de nouveaux matériaux ou de nouvelles communautés microbiennes car si la surface des électrodes est trop importante, la puissance délivrée par la pile est limitée par la faible surface de la membrane séparatrice (Logan *et al.* 2006).

He *et al.* ont présenté deux designs de PACMs à deux compartiments (2 tubes en plexiglass) adaptés pour la recirculation et donc pour le traitement d'effluents (**Figure 13**).

A



B

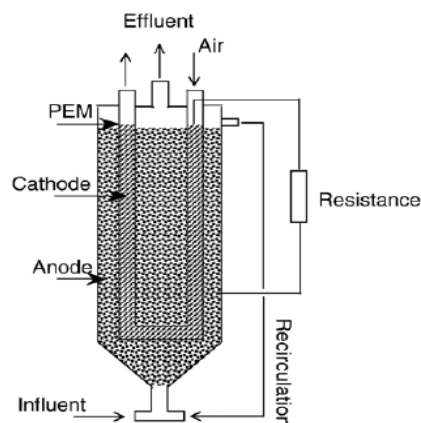


Figure 13: PACMs à deux compartiments de formes cylindriques configurées pour la recirculation A: membrane inclinée à 15° (He et al. 2005), B: cathode en U (He et al. 2006)

Dans le cas du design A, les électrodes sont en carbone vitreux avec un degré de vide élevé pour éviter l'encrassement. La membrane est placée entre les 2 compartiments avec un angle de 15° par rapport à l'horizontale pour prévenir l'accumulation des bulles de gaz. Le bioréacteur est alimenté en continu avec un débit de 0,37 mL/min donc un temps de rétention hydraulique (TRH) de 24 h avec une solution de sucrose (0,25 à 1 g/L) à l'anode et une solution de 100 mM d'hexacyanoferrate à la cathode. Ce système a atteint des densités de puissance de 170 mW/m² avec un maximum de rendement faradique de 8,1%. Le rendement faradique est la proportion de substrat qui est intervenu dans la production de courant par rapport à la quantité de substrat totale présente dans le milieu.

Dans le cas du design B, une cathode en forme de U est incorporée dans l'anode. Les deux électrodes sont en granules de carbone activées. Des boues anaérobies issues d'une usine de traitement d'effluent de brasserie sont utilisées comme inoculum. Le bioréacteur est alimenté en continu à 0,5 mL/min donc un TRH de 6 h avec du sucrose (0,125 à 0,833 g/L) comme substrat. Des densités de puissance maximales de 29,2 W/m³ ont été atteintes avec un rendement faradique variant de 5,1 à 10,6 % en fonction du débit d'alimentation.

Ces deux systèmes sont dits adéquats pour le traitement d'effluents car ils sont faciles à mettre en œuvre. L'énergie nécessaire pour pomper les effluents étant plus grande que la puissance qu'ils produisent, leur fonction primaire est donc le traitement d'effluents plutôt que la production d'énergie (Du et al. 2007). Toutefois, vu la faiblesse des rendements faradiques on peut s'interroger sur l'efficacité du système. Les auteurs ne donnent pas d'explications à ces faibles rendements faradiques mais nous pouvons supposer que la complexité du substrat et de l'inoculum peuvent le justifier. La majorité du substrat

facilement biodégradable intervenant alors dans l'anabolisme⁴ et une autre grande proportion étant non facilement biodégradable. On peut en outre craindre que la croissance du biofilm autour des granules qui constituent les électrodes ne finisse par diminuer drastiquement la conductivité de l'électrode. Enfin, il est peu probable qu'une grande profondeur d'électrode soit utile de part et d'autre de la membrane vu la faible conductivité des effluents.

I.3.7.2. PACMs à un compartiment

Du fait de la difficulté de mise en œuvre des PACMs à deux compartiments, les PACMs avec cathode à air présentent de nombreux avantages sur le plan pratique:

- ❖ aucune énergie n'est nécessaire pour l'aération à la cathode;
- ❖ aucun recyclage ou régénération chimique des produits du catholyte n'est utile puisque la réduction de l'oxygène produit de l'eau;
- ❖ ce système permet des designs de piles simples donc à bas coût;
- ❖ enfin, des cellules de petit volume permettent d'atteindre facilement des valeurs élevées de puissances volumiques.

Ces deux derniers avantages, cités dans la bibliographie (Fan *et al.* 2007b), sont toutefois discutables. D'une part le coût de la cathode peut être élevé, d'autre part on sait que en extrapolant un procédé à grande échelle, l'on pourrait perdre en performances.

I.3.7.2.1. Systèmes de PACM à un compartiment avec membrane

La PACM avec cathode à air ne possède que le seul compartiment anodique. La forme la plus simple, présentée par Liu et Logan en 2004 (*Figure 14*), consiste en une anode en papier de carbone ($25 \text{ m}^2/\text{m}^3$) et une cathode en tissu de carbone recouverte de $0,5 \text{ mg}/\text{cm}^2$ de platine et fixée sur une membrane Nafion®. La pile est alimentée par des eaux usées domestiques comme inoculum et du glucose comme substrat. Les auteurs comparent ce système avec et sans membrane, ils obtiennent des densités de puissance de $262 \text{ mW}/\text{m}^2$ et des rendements faradiques de 40-55% lorsqu'ils utilisent la membrane contre $494 \text{ mW}/\text{m}^2$ et 9-12% sans membrane. Ils concluent que la membrane diminue l'efficacité de la pile (Liu et Logan 2004).

⁴ Anabolisme = Croissance de nouvelles cellules

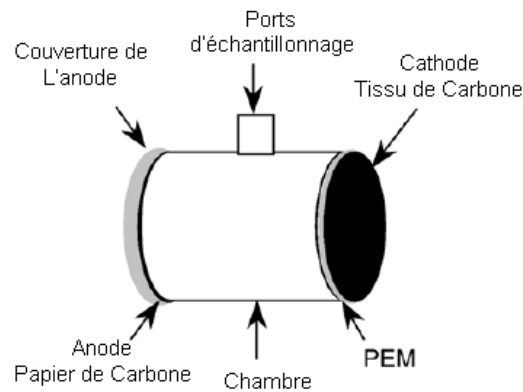


Figure 14: PACM avec cathode à air présentée par (Liu et Logan 2004). Schéma adapté par (Du et al. 2007)

Le schéma A de la **Figure 15** présente une PACM sous forme de tube avec une anode interne constituée de granules de graphite et une cathode en tissu de graphite continuellement imprégnée par une solution de 50 mM $K_3Fe(CN)_6$ et 100 mM KH_2PO_4 . Les performances atteintes par ce système sont de 90, 66, 59 et 48 W/m^3 pour l'acétate, le glucose, les effluents hospitaliers et domestiques qui alimentent en continu l'anode (Rabaey et al. 2005).

Les schémas B et B' proposés par Liu et al en 2004 comportent un compartiment cylindrique en plexiglas qui contient huit barreaux de graphite jouant le rôle d'anode en forme concentrique autour de la cathode au centre du cylindre. La cathode est un mélange de carbone, platine et membrane échangeuse de protons fondu sur un tube en plastique poreux et pressé sur un tissu de carbone. Le système fonctionne en alimentation continue avec un effluent domestique comme inoculum et différents substrats: acétate, lactate et glucose. Le prototype génère une densité maximale de puissance de 26 mW/m^2 (Liu et al 2004)

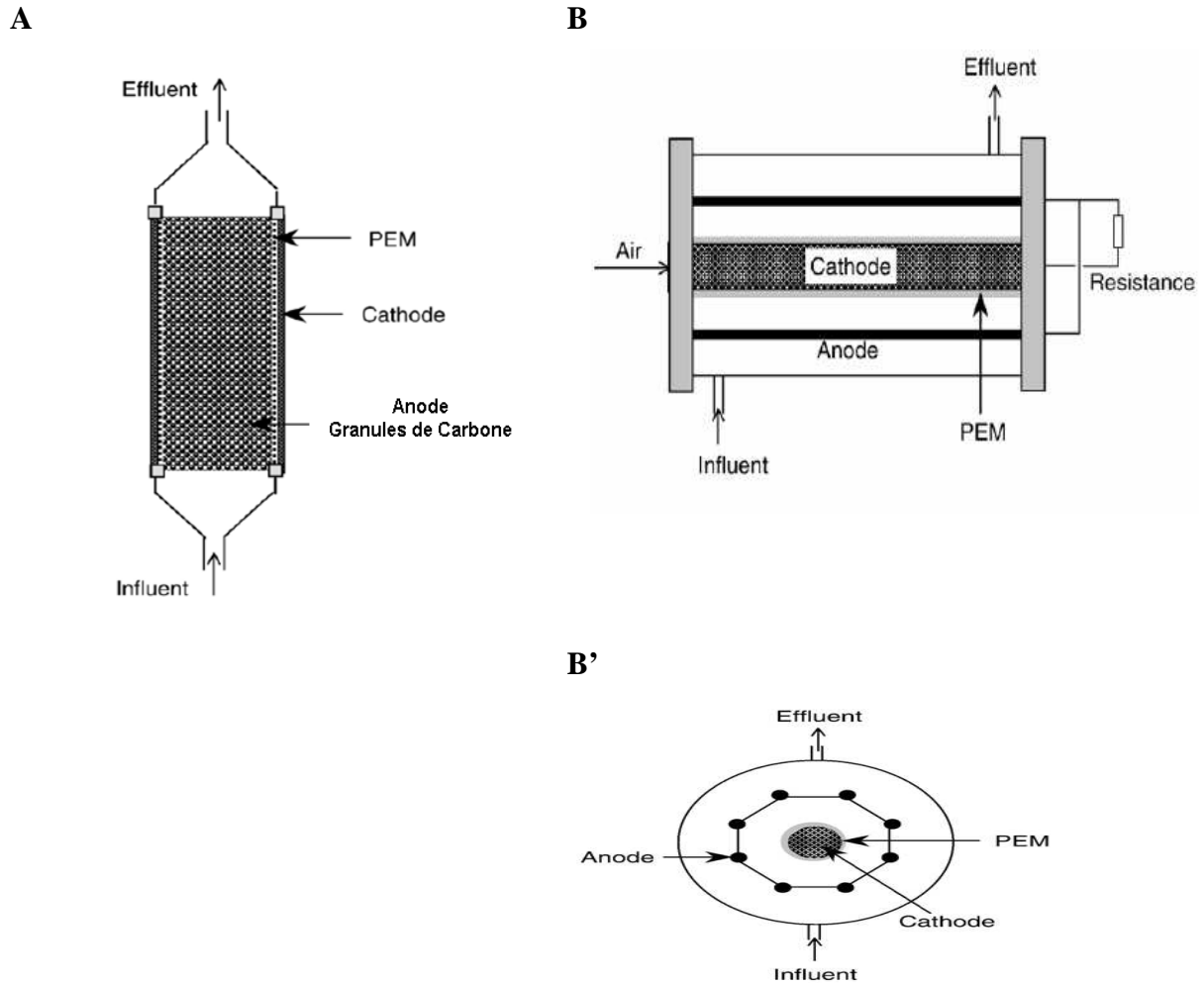


Figure 15: Systèmes cylindriques de PACMs avec cathodes à air. A: La cathode se situe à l'extérieur du tube cylindrique B: La pile comporte 8 anodes en série avec une cathode interne; B': illustration de l'emplacement des constituants de la pile représentée en B. Source (Du et al. 2007)

I.3.7.2.2. Systèmes de PACM à un compartiment sans membrane

L'intérêt des PACMs sans membrane réside dans leur faible coût, leur configuration simple et leur potentiel à fournir des densités de puissance relativement élevées. Cependant ces designs présentent deux inconvénients majeurs:

- ❖ des rendements faradiques faibles par rapport à ceux obtenus avec des systèmes à membrane lorsque des cultures mixtes sont utilisées. Ceci est dû à la consommation du substrat par les bactéries aérobies grâce à l'oxygène qui diffuse vers l'anode à travers la cathode;

- ❖ la distance entre les électrodes qui est diminuée pour éviter les chutes ohmiques mais qui doit néanmoins rester relativement importante, de l'ordre de 1 à 2 cm, pour éviter l'effet

négligeable de l'oxygène sur l'activité des bactéries anaérobies dans le compartiment anodique (Fan *et al.* 2007b).

Un exemple de système de PACM sans membrane a été proposé par Cheng *et al.* (2006) avec des électrodes en tissu de carbone de 7 cm^2 de surface projetée. La cathode est recouverte de platine à $0,5 \text{ mg/cm}^2$ (*Figure 16*).

L'électrolyte circule en continu de l'anode vers la cathode. Avec des eaux usées domestiques utilisées comme inoculum la densité de puissance de la pile est de 464 mW/m^2 et le rendement faradique de 27%. Dans le cas où le glucose est utilisé comme substrat, la puissance maximale délivrée est de 1540 mW/m^2 avec 60% de rendement faradique. (Cheng *et al.* 2006b).

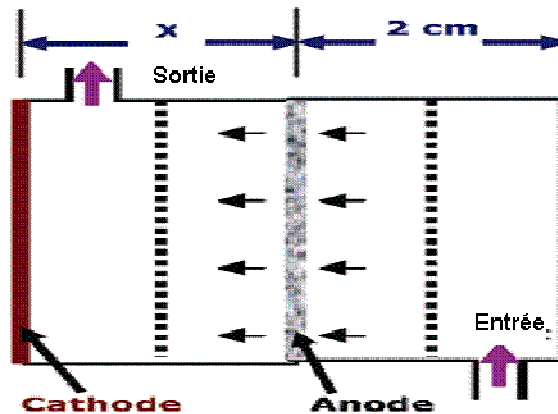


Figure 16: PACM sans membrane avec un flux continu de l'électrolyte de l'anode vers la cathode (Cheng *et al.* 2006b).

I.3.8. Piles à combustible en série ou en parallèle

L'utilisation de modules de PACMs connectés en série ou en parallèle est essentielle pour augmenter la tension ou le courant produits. Les PACMs connectées en série assurent l'augmentation de la tension avec un même courant qui circule à travers chaque module. Dans le cas où les modules sont connectés en parallèle les courants s'additionnent. Ces systèmes sont donc dépendant des performances de chaque module (Kim *et al.* 2007).

Aelterman *et al.* (2006) ont présenté le premier système de PACMs connectées en parallèle. Ce système a été schématisé par Du *et al.* (2007) sur la base de la photo présentée par Aelterman dans sa publication (*Figure 17*).

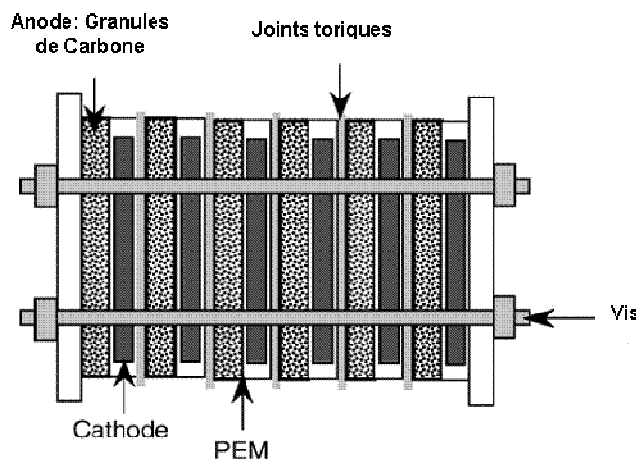


Figure 17: 6 unités individuelles de PACMs en mode continu empilées en parallèle ou en série avec des électrodes en granules de graphite (Du *et al.* 2007).

Les électrodes sont séparées entre elles par une membrane échangeuse de protons (Ultrax®) et les différentes piles par des feuilles de caoutchouc. Une solution synthétique d'acétate baigne les anodes et de l'hexacyanoferrate est utilisé aux cathodes. Lorsque les différents modules sont connectés en série, les performances maximales sont de: 2,02 V en tension, 50 mA de courant et une puissance volumique de 228 W/m³. Les modules connectés en parallèle donnent une tension de 0,3 V, un courant de 255 mA et une puissance volumique de 248 W/m³ (Aelterman *et al.* 2006b).

On observe avec ce système une variation énorme des valeurs du rendement faradique selon que les modules sont connectés en série ou en parallèle. La connexion en parallèle permet d'obtenir un rendement faradique près de 6 fois supérieur à celui obtenu avec la connexion en série dans les mêmes conditions opératoires. Dans le cas de traitement d'effluents une connexion en parallèle est donc préférable pour maximiser les abattements de la demande chimique en oxygène (DCO).

I.3.9. Pilotes de PACMs

Il n'existe pas de publication ou de rapport sur des tests réalisés avec des pilotes de PACMs comme le relève Logan dans une revue de 2010, mais des informations tirées d'internet ou lors des conférences scientifiques indiquent qu'il existe au moins deux PACMs réalisées à l'échelle pilote (Logan 2010). Le premier pilote a été construit en Australie dans une brasserie (Foster). Le réacteur consiste en 12 modules tubulaires de 3 mètres de hauteur avec un volume total d'environ un mètre cube. Des brosses de carbone sont utilisées comme électrodes (Rabaey *et al.* 2005). Il existe très peu d'informations sur les performances de ce pilote mais les auteurs rapportent qu'une conductivité faible de l'effluent limite la production d'électricité et une très forte charge en DCO résulte en l'entartrage de la cathode.

Un second pilote a été conçu par des chercheurs du Connecticut sur la base d'un design de prototype présenté par Jiang et Li en 2009 (Li et Jiang 2009). Le système traite des eaux usées (DCO 300-600 mg/L) avec des performances de 80% d'abattement de DCO (Jiang *et al.* 2011).

I.3.10. Grandeurs caractéristiques des PACMs

I.3.10.1. Caractéristiques thermodynamiques (Logan et Regan 2006a)

Une pile génère un courant électrique si la réaction globale composée des deux demi-réactions aux électrodes est thermodynamiquement favorable. L'enthalpie libre (Joule) exprime la quantité maximale de travail utile capable d'être délivrée par la réaction. Elle est calculée à partir des énergies de formation des différents composés impliqués et s'exprime comme:

$$\Delta G = \Delta G^0 + RT \ln \pi \quad \text{Équation 10}$$

Avec ΔG : enthalpie libre dans des conditions spécifiques
 ΔG^0 : enthalpie libre dans les conditions standards (T= 25°C, fugacité des espèces gazeuses et activité des espèces dissoutes égales à 1)
 R: constante des gaz parfaits (8,31447 J/mole/K)
 π : rapport des activités et fugacités des produits sur les réactifs

Lorsque l'enthalpie libre est positive, il est nécessaire d'apporter de l'énergie électrique pour que la réaction ait lieu. Si elle est négative, la réaction est spontanée et peut produire de l'énergie électrique dans une PACM à condition que les cinétiques soient suffisamment rapides. Dans le cas des PACMs, l'énergie produite peut être évaluée en terme de force électromotrice de la cellule, qui est la différence de potentiel entre l'anode et la cathode:

$$E_{emf} = E_{cathode} - E_{anode} \quad \text{Équation 11}$$

La force électromotrice est reliée au travail W (Joule) produit par la cellule:

$$W = E_{emf} \times Q = -\Delta G_r \quad \text{Équation 12}$$

Avec Q : charge transférée dans la réaction exprimée en Coulomb déterminée par

le nombre de moles d'électrons échangées:

$$Q = nF \quad \text{Équation 13}$$

Avec n : nombre d'électrons par mole de réactif
 F : constante de Faraday (96500 C/mole)

D'après l'Équation 11, la force électromotrice de la pile dépend à la fois du potentiel de l'anode et de celui de la cathode. Elle peut aussi être exprimée comme suit:

$$E_{emf} = -\frac{\Delta G_r}{nF} \quad \text{Équation 14}$$

Dans les conditions standards, la force électromotrice standard est exprimée par:

$$E_{emf}^0 = -\frac{\Delta G_r^0}{nF} \quad \text{Équation 15}$$

L'expression de la force électromotrice en conditions données devient :

$$E_{emf} = E_{emf}^0 - \frac{RT}{nF} \ln \pi \quad \text{Équation 16}$$

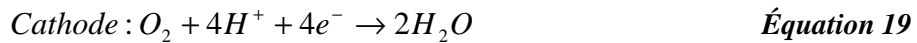
La valeur de la force électromotrice donne la limite supérieure de la tension que la pile peut fournir dans des conditions données. La force électromotrice de la cellule est une grandeur thermodynamique E_{emf} qui ne tient pas compte des pertes énergétiques internes qui surviennent lorsque la pile débite. On ne doit pas confondre la force électromotrice avec la tension en circuit ouvert, qui est la différence de potentiel de la cellule mesurée lorsque les électrodes ne sont pas connectées entre elles. Remarquons que le cas du circuit ouvert est équivalent à une connexion au-travers d'une résistance infinie. Théoriquement la force électromotrice et la tension en circuit ouvert seraient équivalentes si chaque électrode était idéale et contrôlée par un système rédox unique et réversible. C'est rarement le cas dans les piles microbiennes et les potentiels en circuit ouvert de chaque électrode sont généralement des potentiels mixtes résultant de plusieurs contributions. La tension en circuit ouvert est donc pratiquement toujours inférieure à la force électromotrice.

I.3.10.2. Différentes surtensions (Logan et Regan 2006a; Lee *et al.* 2008)

Si nous prenons l'exemple de l'oxydation de l'acétate à l'anode associée à la réduction de l'oxygène à la cathode, les équations de Nernst qui, selon la convention de l'IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) s'écrivent dans le sens de la réduction, sont représentées comme suit:



$$E_{\text{Anode}} = E^0_{\text{Anode}} - \frac{RT}{8F} \ln \frac{[\text{CH}_3\text{COO}^-]}{[\text{HCO}_3^-]^2 [\text{H}^+]^9} = -0,28 \text{ V} \quad \text{Équation 18}$$



$$E_{\text{Cathode}} = E^0_{\text{Cathode}} - \frac{RT}{4F} \ln \frac{1}{P_{\text{O}_2} [\text{H}^+]^4} = 0,84 \text{ V} \quad \text{Équation 20}$$

Le potentiel apparent de l'anode par rapport à l'électrode standard à hydrogène (ESH) est donné par l'Équation 18. Le calcul a été fait lorsque la concentration en acétate est de 1 g/L (pour une concentration de départ de 1,5 g/L). A pH 7, les concentrations supposées en solution sont de: $[\text{CH}_3\text{COO}^-] = 2[\text{HCO}_3^-] = 0,017 \text{ M}$, et $[\text{H}^+] = 10^{-7} \text{ M}$. A la température de 298 K, avec $n = 8$ électrons libérés par l'oxydation de l'acétate et un potentiel standard E^0_{anode} égal à 0,187 V.

De la même façon, le potentiel apparent de la cathode est déterminé par l'Équation 20 pour l'oxygène avec $E^0_{\text{cathode}} = 1,229 \text{ V}$ en faisant le calcul à pH 7 avec $n = 4$, et une pression partielle de 0,2 atm. (Logan *et al.* 2006)

La tension maximale que la pile pourra assurer, c'est-à-dire la force électromotrice est donnée par:

$$E_{\text{emf}} (\text{V}) = E_{\text{cathode}} - E_{\text{anode}} = 1,12 \text{ V.} \quad \text{Équation 21}$$

Les pertes en opération sont le fait de trois causes principales identifiées sur la courbe de polarisation d'une pile en fonctionnement (Oh *et al.* 2009) (*Figure 18*). Cette courbe directement tirée des piles chimiques conventionnelles est toutefois discutable dans le cas des PACMs.

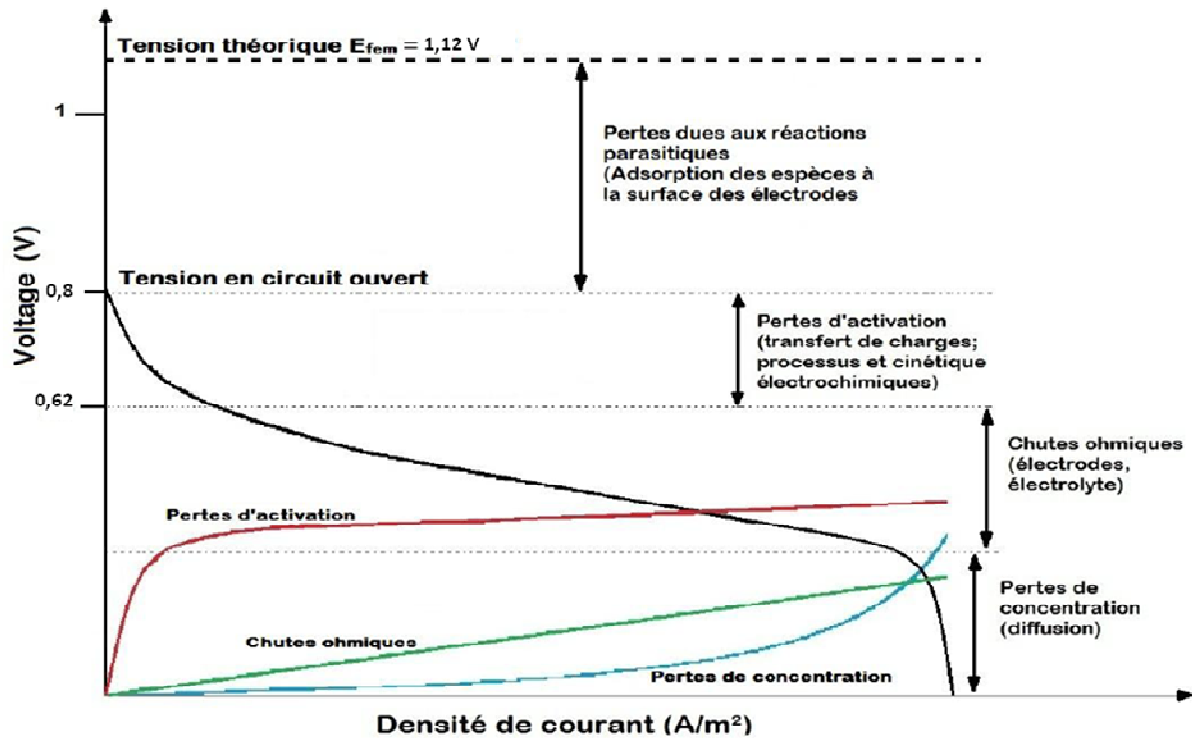


Figure 18: Courbe de polarisation d'une pile indiquant les surtensions prépondérantes dans chaque zone de densité de courant. Adapté de (EG&G Technical Services, Inc. 2004, vol. 880).

I.3.10.2.1. Surtension d'activation

La surtension d'activation, liée aux cinétiques des réactions électrochimiques aux électrodes, est la seule qui apparaisse aux faibles densités de courant. Elle peut être diminuée en améliorant la catalyse des réactions électrochimiques ou en augmentant la température opératoire. Pour les PACMs, améliorer la catalyse passe par exemple par une meilleure colonisation de la surface par le biofilm électro-actif ou par l'accroissement de ses propriétés électrocatalytiques. Cette surtension est décrite par la loi de Tafel:

$$\eta_{act} = \frac{RT}{\alpha nF} \ln \frac{i}{i^0} \quad \text{Équation 22}$$

Avec: η_{act} : surtension d'activation

α : coefficient de transfert électronique

i : courant produit

i_0 : courant d'échange

I.3.10.2.2. Chutes ohmiques

La deuxième zone de la courbe de polarisation qui correspond aux densités de courant moyennes est affectée par les pertes ohmiques. Ces pertes apparaissent du fait:

❖ soit de la résistance au flux d'électrons à travers les électrodes et les interconnexions du circuit;

❖ soit de la résistance du transfert des ions à travers la membrane échangeuse si elle existe ou à travers l'anolyte et le catholyte (Logan *et al.* 2006).

Toutes ces pertes obéissent à la loi d'Ohm:

$$\eta_{ohm} = RI \quad \text{Équation 23}$$

Avec

R: résistance totale du système, somme des résistances électronique, ionique et de contact

I: intensité du courant généré par le système.

Ces pertes peuvent être réduites en diminuant la distance entre les électrodes qui constitue un paramètre essentiel pour les PACMs. Par exemple pour des solutions couramment utilisées de conductivité égale à 1 mS/cm, si nous considérons 10 A/m² comme la valeur maximale de densité de courant espérée pour une PACM, la perte ohmique peut être estimée à 1 V par centimètre de distance entre l'anode et la cathode à partir de la formule :

$$\Delta V = \frac{dj}{\sigma} \quad \text{Équation 24}$$

Avec:

ΔV : chute ohmique (V)

d: distance entre l'anode et la cathode (m)

J: densité de courant (A/m²)

σ : conductivité de l'électrolyte (S/m)

A partir de cette formule, Rozendal *et al.* (2008) ont calculé pour des valeurs de densités de courant de 1 à 50 A/m² et des conductivités de 1 à 10 mS/cm, les valeurs de chutes

ohmiques pour 1 cm de distance entre l'anode et la cathode (**Figure 19**) (Rozendal *et al.* 2008b).

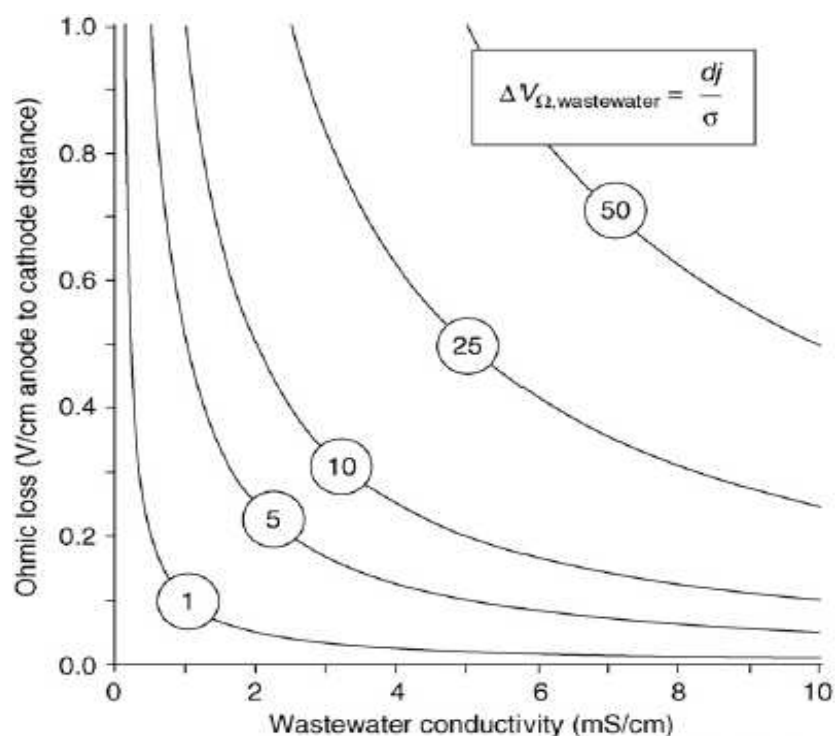


Figure 19: Chutes ohmiques dans des systèmes bio-électrochimiques. Valeurs calculées pour 1 cm de distance entre l'anode à la cathode, en fonction de la conductivité des effluents et à différentes densités de courant (1, 5, 10, 25 et 50 A/m² de surface d'anode) (Rozendal *et al.* 2008b).

Lorsque c'est possible, la conductivité de la solution doit donc être portée à la valeur maximale tolérée par les bactéries. Les contacts électriques, surtout lorsque des matériaux à fort degré de vide sont utilisés comme électrode, peuvent aussi causer des chutes ohmiques significatives. Dans le cas des systèmes avec membrane, celle-ci doit être de faible résistivité.

I.3.10.2.3. Surtension de concentration

La surtension de concentration apparaît aux densités de courant relativement élevées, lorsque les vitesses de transfert de masse des espèces depuis ou vers les électrodes limitent la production du courant. L'oxydation du combustible à l'anode ou la réduction du comburant à la cathode deviennent plus rapides que les vitesses de transfert de ces composés aux électrodes.

I.3.10.2.4. Cas des PACMs

Dans les PACMs, les pertes énergétiques associées à l'anode ne sont pas uniquement associées aux pertes énergétiques conventionnelles car la formation du biofilm à la surface de

l'anode conduit à un environnement différent de celui des piles à combustible classiques sur trois points :

- ❖ le biofilm qui doit acheminer les électrons vers l'électrode par divers mécanismes (Cf paragraphe I.3.3.1.) possède sa propre résistance à la conduction électronique;
- ❖ le métabolisme bactérien est responsable de pertes de potentiel puisque la bactérie tire son énergie de la différence de potentiel entre combustible et son dernier relais vers l'extérieur de la cellule, par exemple les cytochromes qui sont souvent évoqués pour assurer cette fonction;
- ❖ on peut observer un gradient de concentration important au sein du biofilm, c'est-à-dire entre sa surface externe exposée à la solution et la surface interne au contact de l'électrode.

La surtension d'activation apparaît ainsi pour les PACMs comme le facteur limitant majeur. Elle dépend largement de la densité de courant, des propriétés électrochimiques des électrodes, de la présence ou non de médiateurs et de la température opératoire (Rabaey et Verstraete 2005). De plus, on peut généralement négliger la surtension de concentration dans le bilan de la tension globale de la pile car pour l'instant les PACMs ne génèrent pas suffisamment de courant pour que cette surtension soit significative. Elle pourrait avoir un effet dans des cas extrêmes pour lesquels le biofilm deviendrait très épais ou si de la biomasse inerte s'accumulait avec le temps.

Dans le cas où la surtension de concentration est négligée, la tension aux bornes de la pile devient :

$$U = (E_{cathode} - \eta_{act,cathode}) - (E_{anode} - \eta_{act,anode}) - RI \quad \text{Équation 25}$$

I.3.11. Méthodes de caractérisation des PACMs

I.3.11.1. La puissance

La puissance (P) délivrée par une PACM s'exprime classiquement:

$$P = UI \quad \text{Équation 26}$$

Avec: U: tension de la cellule ;

I: courant

Dans le cas où la pile débite au-travers d'une résistance électrique externe (R_{ext}):

$$I = \frac{U}{R_{ext}}$$

Équation 27

En combinant les *Équations 26* et *27*,

$$P = \frac{U^2}{R_{ext}}$$

Équation 28

La puissance peut être exprimée par unité de surface projetée d'électrode (anode ou cathode), on parle alors de densité surfacique de puissance exprimée en W/m^2 .

Afin de comparer la valeur obtenue par une PACM avec celles obtenues par d'autres systèmes non électrochimiques, la puissance est parfois normalisée par rapport au volume total du réacteur, on parle dans ce cas de densité volumique de puissance exprimée en W/m^3 . Cette démarche n'a aucune valeur scientifique, dans la mesure où les procédés électrochimiques sont par essence des procédés hétérogènes. Les vitesses sont proportionnelles aux surfaces d'électrode (sauf dans le cas extrême des ultra-microélectrodes) et n'ont aucune corrélation directe avec le volume du réacteur. L'utilisation de puissances volumiques doit être réservée aux travaux de génie électrochimique qui veulent comparer la compacité de différentes architectures de réacteurs. Dans le cas des PACMs, utiliser une puissance volumique avec des cellules de laboratoire de quelques centaines de millilitres, dans lesquelles trempent des électrodes de quelques centimètres carrés, n'a pas de justification.

Le tracé de la puissance et de la tension délivrée par une pile en fonction du courant permet d'évaluer la valeur maximale de la puissance que peut atteindre une pile (*Figure 20*). Ce tracé est effectué en connectant les électrodes de la PACM au-travers d'une résistance externe dont la valeur varie. Plus la résistance est élevée, plus la résistance au transport des électrons de l'anode à la cathode est grande (Li *et al.* 2010). Un nombre important d'études utilisent une résistance de 1000 ohm pour faire débiter la pile sur de longues périodes (Wang *et al.* 2010).

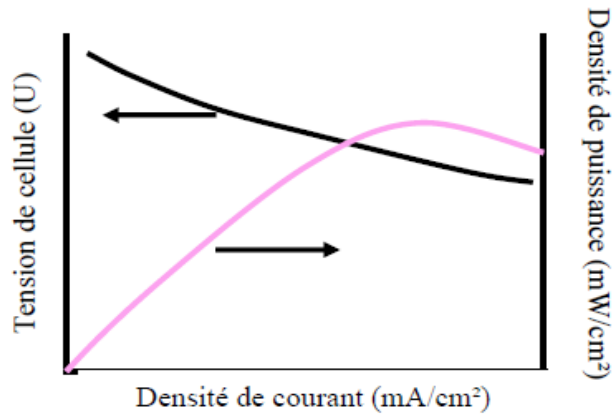


Figure 20: Courbes de densité de puissance et de tension en fonction du courant (EG&G Technical Services, Inc. 2004, vol. 880)

I.3.11.2. Les courbes de polarisation

Les courbes de polarisation tracées pour chacune des électrodes permettent de corréler le fonctionnement de la PACM à la cinétique des électrodes. On trace à faible vitesse de balayage le courant qui traverse la pile en fonction du potentiel de chaque électrode mesuré par rapport à une électrode de référence (**Figure 21**). Ce tracé peut être effectué à l'aide d'un potentiostat ou simplement en faisant débiter la pile à travers des résistances électriques externes de différentes valeurs. Les valeurs de potentiels et de courant sont enregistrées pour chaque résistance lorsque le système atteint un état pseudo-stationnaire, état qui s'établit généralement après quelques minutes en fonction du système et de la valeur de la résistance utilisée.

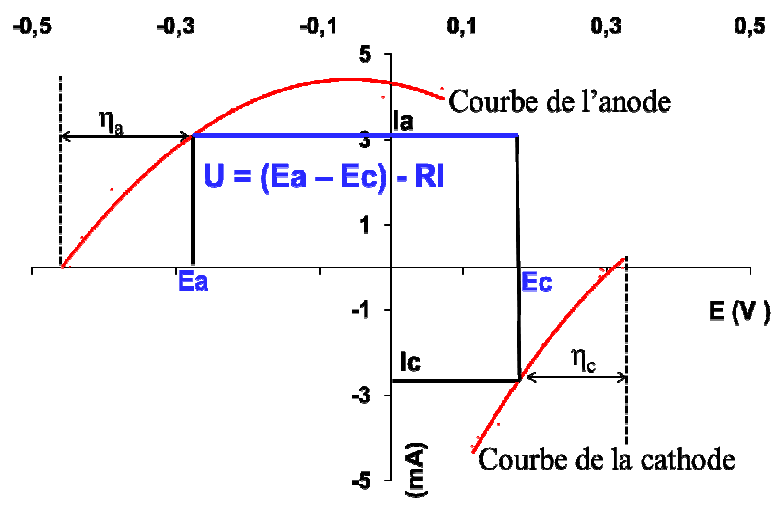


Figure 21: Allure des courbes de polarisation des électrodes d'une PACM.

I.3.11.3. Le rendement faradique

Le rendement faradique est défini comme le rapport de la quantité d'électricité totale (Coulomb) transférée à l'anode (Q_p), calculée en intégrant le courant par rapport au temps, sur la quantité d'électricité disponible dans le substrat (Q_t). Le rendement faradique d'une PACM dépend des micro-organismes responsables de l'oxydation, de la nature du carbone organique servant de combustible et de toutes les réactions alternatives qui consomment ce carbone organique (Franks et Nevin 2010). Des processus tels que la respiration aérobie et anaérobie, la croissance de la biomasse ou la formation d'intermédiaires réactionnels issus de la fermentation peuvent réduire le rendement faradique (Huang et Logan 2008b).

$$Rf(\%) = \frac{Q_p}{Q_t} \times 100 \quad \text{Équation 29}$$

$$\text{Avec: } Q_p = \int_0^t i dt \quad \text{Équation 30}$$

$$\text{et } Q_t = \frac{nFCV}{M_i} \quad \text{Équation 31}$$

Dans le cas d'un substrat simple

$$Rf = \frac{M_i \int_0^t i dt}{nFCV} \quad \text{Équation 32}$$

Dans le cas du traitement d'effluent la matière organique disponible est mesurée en termes de demande chimique en oxygène (DCO) et le rendement faradique est calculé à partir de la DCO éliminée:

$$Rf = \frac{M_i \int_0^t i dt}{nFV\Delta DCO} \quad \text{Équation 33}$$

Avec

M_i : masse molaire du substrat (g/mol)

n : nombre d'électrons échangés au cours de la réaction (mol e^- /mol)

F : constante de Faraday (C/mol e^-)

V : volume de l'effluent mis en jeu (L)

Δ DCO: variation de la DCO en entrée et à la sortie du réacteur (g/L)

Dans le cas du traitement d'effluent, $M_i = 32$ g/mol d' O_2 , et donc Δ DCO s'exprime en g équivalent O_2/L .

I.3.11.4. La relation entre le potentiel d'anode et le métabolisme microbien (Schroder 2007; Aelterman *et al.* 2008; Pham *et al.* 2009).

L'anode d'une PACM est l'accepteur final d'électrons issus de l'oxydation microbienne des substrats organiques. Son potentiel détermine l'énergie théorique disponible pour les bactéries (Aelterman *et al.* 2008). Le potentiel de l'anode est un facteur important qui contrôle la croissance des micro-organismes et leur activité électrochimique. D'un point de vue thermodynamique, le potentiel de l'anode détermine le potentiel minimal auquel les transporteurs finaux d'électrons de la bactérie pourront évacuer les électrons, il peut donc déterminer la voie métabolique qui sera utilisée pour le transfert des électrons par la bactérie. En effet, les micro-organismes sont souvent capables d'ajuster leur système redox pour l'adapter au potentiel disponible à l'anode ou encore la communauté microbienne peut changer en s'enrichissant en espèces capables d'évacuer leurs électrons au potentiel de l'anode. Les communautés microbiennes des bioanodes sont dynamiques et les réactions électrochimiques en partie contrôlées par le potentiel anodique.

L'énergie théorique gagnée de l'oxydation de la matière organique par les micro-organismes peut être calculée par:

$$\Delta G^0 = -nF(E^0_{\text{donneur}} - E^0_{\text{accepteur}}) \quad \text{Équation 34}$$

Avec ΔG^0 : variation d'enthalpie libre dans les conditions standards,
 n: nombre d'électrons échangés au cours de la réaction,
 F: constante de Faraday
 E^0 : potentiels standards dont les valeurs de quelques couples redox sont données dans le **Tableau 2**.

Cette énergie est donc fonction de la nature du substrat mais aussi du potentiel de l'anode. Plus la différence entre le potentiel redox du substrat et celui de l'anode est importante, plus le gain d'énergie possible pour les bactéries est grand. Lorsque le potentiel imposé à l'anode devient trop faible en présence d'autres accepteurs d'électrons tels que les sulfates ou les nitrates, les électrons sont évacués préférentiellement vers ces molécules. Par contre, si aucun autre accepteur d'électrons n'est présent dans le milieu, le processus prépondérant d'évacuation des électrons devient la fermentation. Dans l'un ou l'autre cas, les électrons ne sont plus injectés vers l'anode (Rabaey et Verstraete 2005; Logan *et al.* 2006).

Les micro-organismes qui composent les biofilms électro-actifs sont souvent appelés «biocatalyseurs» dans le domaine des PACMs. C'est un abus de langage car la définition rigoureuse d'un catalyseur indique qu'il n'intervient pas dans le bilan global de la réaction qu'il catalyse. Cette caractéristique n'est pas vérifiée dans les PACMs car les micro-organismes interviennent dans le bilan énergétique. Ils facilitent la conversion de l'énergie chimique issue du substrat en énergie électrique mais ils retiennent une partie de cette énergie pour leur propre survie et croissance ($\Delta G^0_{\text{biologique}}$) comme le montre le schéma de la *Figure 22* qui porte sur l'exemple de l'oxydation complète du glucose en CO_2 .

$$\Delta G^0_{\text{total}} = \Delta G^0_{\text{électrique}} + \Delta G^0_{\text{biologique}} \quad \text{Équation 35}$$

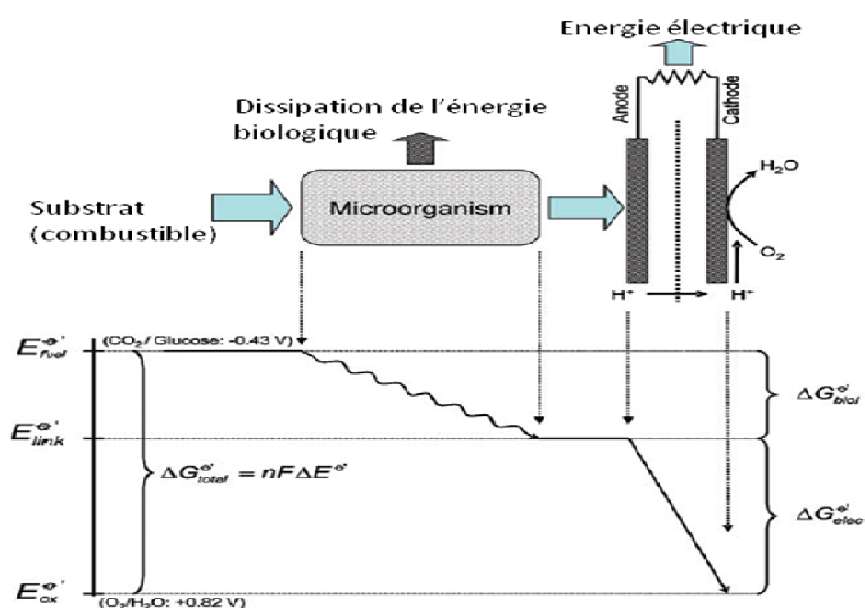


Figure 22: Schéma du flux énergétique dans les PACMs. Adapté de (Schroder 2007)

I.3.12. Applications

Les PACMs sont susceptibles de développer des applications jugées prometteuses dans de nombreux domaines.

I.3.12.1. La production d'hydrogène

A l'heure actuelle l'hydrogène est majoritairement produit à partir de combustibles fossiles; l'hydrolyse de l'eau ou la fermentation biologique de différentes formes de biomasse restent des filières minoritaires. La production d'hydrogène est donc encore largement dépendante des ressources fossiles. Les PACMs ont parfois été présentées comme un moyen de produire de l'hydrogène à partir de biomasse, de façon indirecte, en utilisant l'électricité dans un procédé d'électrolyse de l'eau. Avec cette approche multi-étapes tout substrat

biodégradable qui produit de l'électricité dans une PACM pourrait être utilisé pour produire de l'hydrogène (Logan et Regan 2006a). De façon plus directe, au début des années 2000, certains chercheurs ont montré qu'il était possible d'inverser une PACM et de la faire travailler en électrolyseur (Liu *et al.* 2005b; Rozendal *et al.* 2006b). L'hydrogène est formé à la cathode par la réduction des protons ou de l'eau, alors que la dégradation du substrat a lieu à l'anode. Les demi-réactions aux électrodes dans le cas de l'oxydation de l'acétate sont :



D'après les potentiels redox (*Tableau 2*) il faut appliquer une différence de potentiel (ddp) d'au moins 130 mV. En pratique, les auteurs observent une production d'hydrogène à partir d'une tension appliquée de 250 mV, à cause des surtensions aux électrodes. A la fin du cycle, plus de 95% de l'acétate est dégradé avec plus de 90% des électrons récupérés pour la production d'hydrogène (Liu *et al.* 2005b). Le glucose peut aussi être utilisé comme substrat (Liu *et al.* 2005b; Liu et Logan 2004).

Pour pallier au besoin de platine comme catalyseur aux électrodes, Call *et al.* (2009) proposent d'utiliser des électrodes en forme de brosse d'acier (cathode) ou de graphite (anode) afin de compenser la lenteur des cinétiques sur ces matériaux par l'augmentation de la surface spécifique. On observe ainsi une amélioration des rendements en courant et en production d'hydrogène par rapport aux électrodes recouvertes de platine (Call *et al.* 2009).

I.3.12.2. Le traitement d'effluents

Actuellement les méthodes les plus utilisées pour le traitement de la matière organique dissoute contenue dans les effluents industriels, domestiques ou issus de l'agriculture sont :

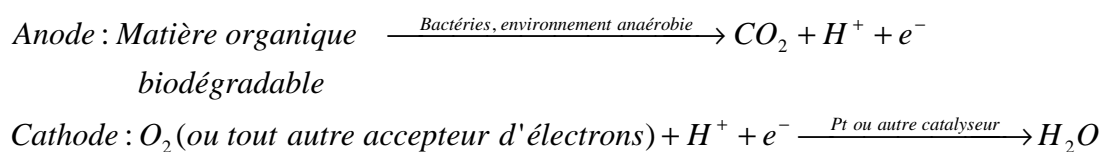
- ❖ les méthodes aérobies par boues activées qui demandent énormément d'énergie pour l'aération (1.0 à 2.0 kWh/m³) et produisent en plus d'importants volumes de boues dont le traitement secondaire coûte cher (Kim *et al.* 2007; Aelterman *et al.* 2006a; Youngho et Logan 2010).

- ❖ la digestion anaérobie ou méthanisation qui est la seule technologie jusqu'à présent permettant de récupérer de l'énergie des eaux usées à un niveau commercial. L'inconvénient majeur de cette technologie réside dans le fait qu'elle n'est applicable qu'aux effluents très concentrés (Rozendal *et al.* 2008b), de préférence entre 30 et 40°C.

La PACM est donc une technologie potentiellement intéressante pour le traitement d'eaux usées dans le domaine de faibles concentrations en substrat et à basse température (10-

20°C). Dans ce domaine de température, la méthanisation est généralement inefficace à cause des faibles vitesses de réactions et de la grande solubilité du méthane produit (Pham *et al.* 2009).

En utilisant une PACM, la matière organique dissoute serait oxydée à l'anode, intensifiant ainsi l'abattement de DCO, tout en produisant de l'énergie électrique (Kim *et al.* 2007). On limiterait ainsi l'énergie nécessaire dans le cas d'une unité de traitement aérobie tout en diminuant la production de boues (Aelterman *et al.* 2006a). Les réactions globales aux électrodes peuvent être représentées d'une manière générale par:



Équation 38

Une des méthodes d'évaluation de l'efficacité d'un procédé de traitement d'effluent consiste à mesurer l'abattement de la DCO qu'il réalise. Le taux d'abattement en DCO correspond au rapport de la DCO éliminée sur la DCO en entrée. Cette valeur indique la proportion de matière organique dégradée par les divers processus qui peuvent avoir lieu dans la pile : les productions du courant et de la biomasse (croissance de micro-organismes), les processus compétitifs lorsque le milieu contient d'autres accepteurs d'électrons que l'anode tels que l'oxygène, les nitrates, les sulfates...

Divers effluents domestiques ou industriels ont été testés comme combustibles ou biocatalyseurs dans les PACMs. Le **Tableau 3** présente quelques exemples parmi les plus significatifs.

Le **Tableau 3** n'est pas exhaustif mais il permet cependant de se rendre compte de la diversité des effluents dont le traitement a été testé avec les PACMs. La puissance maximale de 1,5 W/m² a été obtenue avec un effluent brut issu d'une chocolaterie, mais dans cette expérience la cathode utilisant le ferricyanure ne propose pas une option durable (Patil *et al.* 2009). Lorsque les cathodes à air sont utilisées, les puissances délivrées restent inférieures à 1 W/m². Les puissances délivrées restent donc faibles comparées à celles obtenues avec les effluents synthétiques. Dans ce dernier cas, la puissance maximale obtenue jusqu'à présent avec une PACM est de 6,9 W/m². La pile, inoculée avec un biofilm issu d'une autre PACM et alimentée par de l'acétate à 30 mM a fonctionné pendant un an (Fan *et al.* 2008).

| Combustible | Inoculum | Accepteur d'électrons à la cathode | Design de la PACM | Performance | Reference |
|---|---|------------------------------------|--|---|----------------------------------|
| Glucose | Effluent domestique | air | 1 compartiment | P = 262 mW/m ² avec membrane et 494 mW/m ² sans membrane. Abat DCO: 20% | (Liu et Logan 2004) |
| Effluent domestique | Effluent domestique | hexacyanoferrate | 2 compartiments | P = 18 W/m ³ | (Rabaey <i>et al.</i> 2005) |
| Effluent issu d'une usine de céréales pré-fermentés | Effluent issu d'une usine de céréales pré-fermentés | air | 2 compartiments | P = 371 mW/m ² | (Oh et Logan 2005) |
| Effluent d'une porcherie | Effluent d'une porcherie | O ₂ dissous air | 2 compartiments 1 compartiment | P = 45 mW/m ² P = 261 mW/m ² | (Min <i>et al.</i> 2005b) |
| Effluent alimentaire | sédiments | O ₂ dissous | 2 compartiments | P = 38 mW/m ² | (Oh et Logan 2005) |
| Hydrolysats de paille de maïs | Effluent urbain + milieu de culture | air | 1 compartiment | P = 367 – 371 mW/m ² lorsque $\sigma = 10$ mS/cm P = 933 – 971 mW/m ² lorsque $\sigma = 20$ mS/cm | (Zuo <i>et al.</i> 2006) |
| Effluents hospitalier et d'une usine de traitement anaérobie de déchets agricoles | Mélange de boues anaérobies et aérobies | hexacyanoferrate | 2 compartiments | P = 14 W/m ³ ; Abat DCO: 13% avec effluents hospitaliers et P = 58 W/m ³ ; Abat DCO: 20%) avec effluent du méthaniseur | (Aeltermann <i>et al.</i> 2006a) |
| Effluent issu d'une usine d'emballage de viande | Effluent issu d'une usine d'emballage de viande | air | 1 compartiment | P = 80 à 139 mW/m ² | (Heilmann et Logan 2006) |
| Eaux usées d'une brasserie | Eaux usées d'une brasserie | air | 6 PACM à 1 compartiment en série | A 30°C, P= 205 mW/m ² , Abat DCO: 98% | (Feng <i>et al.</i> 2008) |
| Xylose (hydrolysat de lignocellulose) | Effluent clarificateur | hexacyanoferrate | 2 compartiments | P = 83 mW/m ² Rf: 52%; puis jusqu'à 92% avec HA (médiateur) | (Huang et Angelidaki 2008) |
| Effluent papetier (clarificateur primaire) | Effluent papetier (clarificateur primaire) | air | 1 compartiment en alimentation fed batch | P = 144 mW/m ² avec l'effluent brut P = 501 mW/m ² avec 50 mM de tampon phosphate et P = 672 mW/m ² avec 100 mM de tampon. | (Huang et Logan 2008b) |
| Effluent papetier (clarificateur primaire) | Effluent papetier (clarificateur primaire) | air | 1 compartiment en alimentation continue | P = 210 mW/m ² à un TRH de 6 heures, P = 100 mW/m ² lorsque le TRH augmente à 25h | (Huang <i>et al.</i> 2009) |

| | | | | | |
|---|---|------------------------|-------------------------------------|---|-----------------------------|
| Effluent d'une chocolaterie | Boues anaérobies | hexacyanoferrate | 2 compartiments | $P = 1,5 \text{ W/m}^2$ | (Patil <i>et al.</i> 2009) |
| Effluent d'une station de traitement d'amidon | Effluent d'une station de traitement d'amidon | air | 1 compartiment | $P = 239,4 \text{ mW/m}^2$ | (Lu <i>et al.</i> 2009) |
| Effluent de cuisine | Effluent de cuisine | air | 1 compartiment | $P = 480 \text{ mW/m}^2$ | (Huang <i>et al.</i> 2010) |
| Effluent domestique | Boues anaérobies | air | 1 compartiment | A 30°C, $P = 422 \text{ mW/m}^2$ Abat DCO: 28% | (Youngho et Logan 2010) |
| Effluent d'une rizerie | Boues anaérobies | O ₂ dissout | 2 compartiments | $P = 48,64 \text{ mW/m}^2$ | (Behera <i>et al.</i> 2010) |
| Effluent domestique | Effluent domestique | air | 1 compartiment | $P = 220 \text{ mW/m}^2$ | (Hays <i>et al.</i> 2011) |
| Effluent vinicole + acétate | Boues activées d'une distillerie | air | 1 compartiment | $P = 81,25 \text{ mW/m}^2$ | (Han <i>et al.</i> 2011) |
| Effluent pétrolier | Effluent domestique | air | 1 compartiment | $P = 778 \text{ mW/m}^2$ cathode (Tissu de carbone + 50 mM de tampon phosphate à l'anode) $P = 1310 \text{ mW/m}^2$ (Brosse de carbone + 200 mM de tampon phosphate à l'anode) $P = 2110 \text{ mW/m}^2$ (Brosse de carbone traitée à la chaleur) | (Feng <i>et al.</i> 2011) |
| Effluent d'une porcherie | Biofilm pré formé avec le même effluent pendant un an | air | 5 modules de piles à 1 compartiment | $P = 67,5 \text{ mW/m}^2$ en série $P = 175,7 \text{ mW/m}^2$ en parallèle | (Zhuang 2012) |
| Effluent d'une usine de traitement d'huile de palme | Effluent d'une usine de traitement d'huile de palme | Air humidifié | 2 compartiments | $P = 622 \text{ mW/m}^2$ | (Jong <i>et al.</i> 2012) |

Tableau 3: Quelques PACMs liées au traitement d'effluents présentées par ordre chronologique. Abat DCO : abattement de DCO, TRH : temps de rétention hydraulique, Rf : rendement faradique.

La technologie de la PACM qui a démontré sa faisabilité au niveau du laboratoire, est une technologie qui pour être exploitée à long terme requiert des améliorations techniques en particulier pour augmenter les puissances générées, et devenir aussi compétitive par rapport aux technologies durables (solaire, éolien, hydraulique). Plusieurs étapes pourraient ainsi être optimisées pour améliorer les performances. On pourrait citer entre autres :

- ❖ les phénomènes de transfert dans le biofilm : il a été montré que le transport des protons hors du biofilm et donc de sa désacidification pouvait être optimisé en additionnant des tampons, ce qui améliorerait les performances (Torres *et al.* 2008)

- ❖ les métabolismes oxydatifs parallèles : ces mécanismes induits par la présence d'autres accepteurs d'électrons parasites tels que l'oxygène, les sulfates, les nitrates réduisent le rendement faradique ;

- ❖ le transfert de masse du substrat dans le biofilm: En fin d'expérience, les biofilms sont généralement épais car il contient des micro-organismes non électro-actifs, des polymères et des ions contenus dans l'effluent, ceci augmente la capacité de la double couche à l'interface et donc des effets capacitifs. Le substrat a du mal à rentrer à l'intérieur du biofilm. Pour améliorer ce paramètre, il faudrait former des biofilms moins épais par des phénomènes de repiquages successifs ou de filtration de l'effluent par exemple (Kim *et al.* 2005)...etc.

I.3.12.3. La biorémédiation (Cunningham *et al.* 2003; Logan et Regan 2006a; Lovley 2006a)

Pour traiter les sols et eaux souterraines pollués, il est nécessaire de mettre en œuvre des technologies qui consomment peu d'énergie pour transformer in situ les contaminants en produits non, ou moins toxiques (Banwart *et al.* 2007). La méthode la plus généralement utilisée est celle du «biofilm barrière». Elle consiste à injecter dans le milieu des cellules bactériennes, des nutriments et des donneurs ou accepteurs d'électrons (Fe^{3+} , sulfates...) pour faciliter le développement d'un biofilm uniforme qui va servir de barrière à la contamination (Cunningham *et al.* 2003). La difficulté la plus importante est la nécessité d'apporter en quantité optimale les réactifs nécessaires à la bioremédiation désirée.

Les électrodes représentent une autre possibilité de donneur ou accepteur d'électrons. Lorsque le processus permet de précipiter à leur surface les contaminants du sol elles constituent un moyen simple de retirer ces contaminants (Lovley 2006a; Lovley 2006b). Dans le cas par exemple de la contamination souterraine par de l'uranium (U(VI)), une cathode utilisée comme donneur d'électrons permet la précipitation sur sa surface de l'uranium sous forme U(IV) insoluble qui est ainsi facilement extrait du sol. L'électrode est ensuite lavée par un simple traitement au bicarbonate (Lovley 2006a). C'est ici un autre exemple (Cf paragraphe I.3.12.1.) d'application de la technologie PACM en mode électrolyseur puisqu'on doit lui fournir de l'énergie pour réaliser les réactions désirées. La même technique a été éprouvée pour la bioremédiation d'autres contaminants tels que les solvants chlorés et

perchlorés (Strycharz *et al.* 2010; Aulenta *et al.* 2012) ainsi que des nitrates (Zhang et He 2012).

I.3.12.4. Les capteurs environnementaux

La mesure de la demande biologique en oxygène (DBO) d'un effluent est le paramètre le plus utilisé pour évaluer la matière organique contenue dans cet effluent et son potentiel d'eutrophisation (modification et dégradation d'un milieu aquatique lié à un apport excessif de substances nutritives) du milieu naturel. La méthode la plus utilisée (DBO₅) nécessite 5 jours d'incubation pour mesurer l'oxygène dissous consommé par les micro-organismes pour la dégradation de la matière organique. Plusieurs designs de capteurs fiables et rapides pour mesurer la DBO₅ d'un effluent en continu sont étudiés et commercialisés. Parmi les différents designs, on retrouve ceux basés sur la technologie de la pile à combustible. Kumlanghan *et al.* (2007) ont mis au point un capteur basé sur une pile à combustible à un compartiment, capable de détecter du glucose dans une solution à très faible concentration (0,025 g/L) : les micro-organismes dégradent le glucose et transfèrent les électrons à l'anode. Le courant obtenu avec la PACM étant proportionnel à la DBO de l'effluent, le suivi en continu de la matière organique biodégradable peut ainsi être réalisé (Kumlanghan *et al.* 2007).

La corrélation linéaire entre le rendement faradique d'une PACM et la concentration de la matière organique dans l'effluent fait qu'une PACM peut être utilisée comme un capteur capable de suivre en continu l'évolution de la DBO d'un effluent. Plusieurs capteurs ont été mis en place sur ce principe (Kim *et al.* 1999; Chang *et al.* 2004; Chang *et al.* 2005).

Les capteurs environnementaux capables d'assurer la collecte de données de l'environnement pour le suivi des écosystèmes naturels nécessitent une source d'énergie. Les PACMs peuvent être utilisées pour alimenter ces dispositifs particulièrement dans des zones difficiles d'accès à l'exemple des eaux souterraines. Des systèmes de PACMs à sédiments ont été développés pour alimenter des capteurs disposés dans des zones telles que des criques, des rivières et des océans (Reimers *et al.* 2001; Tender *et al.* 2002). L'énergie nécessaire à ces appareils provient de la matière organique contenue dans les sédiments. Certes les puissances fournies par ces PACM à sédiments sont faibles (< 30 mW/m²) (Tender *et al.* 2002), mais cette faible puissance peut être compensée par des systèmes de stockage d'énergie pouvant alimenter les capteurs en discontinu (Shantaram *et al.* 2005).

I.3.13. PACM et effluents papetiers

La France est le cinquième producteur mondial de pâte à papier. Il existe en France une centaine d'usines qui produisent de la pâte à papier, ou encore diverses sortes de papiers et cartons. Parmi ces usines, 34 utilisent exclusivement des fibres vierges issues du bois, mais pour des besoins de respect de l'environnement, de plus en plus d'usines se tournent vers le

recyclage de déchets papetiers. En effet, pour produire leur pâte à papier, 34 usines en France utilisent exclusivement des fibres recyclées alors que 29 utilisent un mélange de fibres vierges et recyclées ce qui fait une moyenne de 60% de papeteries en France qui ont intégré la notion de recyclage dans leur production.

De la gestion des forêts au renforcement des normes de rejets, l'industrie papetière est l'un des secteurs les plus concernés par la préservation de l'environnement. A travers une utilisation intensive de l'eau, les impacts environnementaux des rejets par ces usines dans les milieux naturels peuvent être importants. En effet, la production du papier nécessite de grandes quantités d'eaux pour extraire des différentes matières premières (bois, fibres recyclées...), les fibres de cellulose nécessaires à la formation de la pâte à papier, mais aussi pour le processus de fabrication du papier en lui-même. On observe néanmoins en fonction du type de papier produit des disparités au niveau des consommations d'eau et de leur degré de pollution en fin de processus. Ainsi, la production du papier pour ondulé consomme 1 à 12 mètres cubes d'eau avec une forte concentration des rejets en fin de processus de 25 à 35 kg de DCO par tonne de papier. Les papiers couché, journal et emballages krafts quant-à eux consomment 10 à 20 mètres cubes d'eau avec 5 à 12 kg en DCO/tonne. Les gammes les plus élevées de 20 et 40 mètres cubes d'eau consommée avec une plus faible pollution des rejets entre 7 et 15 kg de DCO/tonne de papier produit sont observées avec les papiers tissus et pour impression. Cette DCO provient notamment de la décomposition de polysaccharides tels que l'amidon, les hémicelluloses ou la cellulose, ainsi que des additifs (liants, agents de collage et de rétention...) utilisés lors du processus de fabrication du papier. Les effluents en fin de processus vont ainsi contenir des composés organiques solubles ou insolubles plus ou moins biodégradables.

Il existe un large éventail de procédés utilisés actuellement pour le traitement des effluents papetiers: biofiltration, lagunage aéré, lit bactérien, boues activées, méthanisation... Le choix d'une méthode plutôt qu'une autre par une usine dépend de la concentration de ses effluents. Ces méthodes sont très efficaces car elles permettent des abattements en demande biochimique en oxygène (DBO) entre 90 et 99%. Les méthodes les plus répandues pour le traitement des effluents papetiers sont celles par boues activées et par méthanisation. Comme évoqué plus haut (Cf paragraphe I.3.12.2.), dans le premier cas l'aération consomme beaucoup d'énergie, entre 1 et 2 kW par mètre cubes d'effluent traité, et génère en fin de processus des volumes de boues importants qui induisent des coûts supplémentaires pour leur traitement et leur élimination. Dans ce processus, les micro-organismes contenus dans les effluents responsables de l'épuration utilisent l'essentiel de l'énergie issue de la dégradation des molécules organiques pour leur division cellulaire. Il serait intéressant de récupérer une partie de cette énergie pour d'autres utilités. La méthanisation permet d'obtenir du méthane comme biogaz réutilisable après traitement pour la production d'énergie thermique (vapeur de sécherie), mais sa conversion en électricité *via* la combustion n'est pas très efficace (He *et al.* 2008). De plus, elle n'est applicable qu'aux effluents très concentrés (Huang *et al.* 2009).

Avec le développement du recyclage de vieux papiers et la diminution de l'utilisation d'eau fraîche, les eaux de procédé sont de plus en plus concentrées en matières organiques et en micro-organismes, ce qui est propice à la formation de biofilms dans les installations. L'industrie papetière doit ainsi faire face à de sérieux problèmes de formation de biofilms sur les machines, avec comme conséquences à redouter la diminution de la qualité du papier, des taux de production et de la durée de vie des équipements due à la biocorrosion (Kolari *et al.* 2001; Kolari *et al.* 2003). Pour venir à bout de ces problèmes, les industriels sont à la recherche de méthodes plus efficaces et moins coûteuses de traitement des effluents en amont afin de réduire la formation des biofilms.

Toutes les raisons citées ci-dessus ont conduit les chercheurs à réfléchir à l'opportunité qu'offre la technologie PACM pour le traitement des effluents papetiers. Elle permettrait de réduire les besoins énergétiques nécessaires par exemple dans le cas des traitements biologiques aérobies. Huang et Logan (2008b) ont été les premiers à utiliser les effluents papetiers dans des PACMs. Ils ont obtenu pour des cycles d'alimentation fed-batch de 500 h, en utilisant le surnageant d'un effluent provenant d'un décanteur primaire comme seul inoculum et substrat, une puissance de 144 mW/m²; cette valeur passait à 672 mW/m² lorsque l'effluent était complété avec 100 mM d'une solution tamponnée de phosphate pour améliorer sa conductivité (Huang et Logan 2008b). Les mêmes auteurs, en 2009, avec le même effluent mais avec un mode d'alimentation continu, ont obtenu une densité de puissance maximale de 210 mW/m² pour un temps de rétention hydraulique (TRH) de 6 heures (Huang *et al.* 2009).

Mathuriya et Sharma en 2009 ont utilisé les effluents papetiers dans un système de PACM à deux compartiments avec de l'oxygène dissous dans une solution tamponnée de phosphate (100 mM) à la cathode. Ils ont réalisé deux études : la première utilise à l'anode, deux souches bactériennes du genre *Clostridium* (*Clostridium acetobutylicum* et *thermohydrosulfuricum*) cultivées dans des milieux très chargés avec la cellulose comme substrat. Les auteurs comparent différents scénari de complémentations de l'effluent avec différents substrats et médiateurs. Lorsque l'effluent brut dilué 4 fois avec de l'eau distillée est utilisée comme seul substrat, ils obtiennent entre 4,26 et 4,91 mA de courant (la surface des électrodes n'est pas précisée) (Mathuriya et Sharma 2009b). Dans la seconde étude, avec le même système les auteurs comparent les performances de différents effluents industriels, dont l'effluent papetier, complémentés avec 1g/L de glucose. Dans ce cas, l'effluent papetier présente les plus faibles résultats à savoir 1,6 A/m² de densité de courant et un abattement de DCO de 48%. Les auteurs attribuent cette faible performance à la présence de cellulose qui n'est pas facilement biodégradable (Mathuriya et Sharma 2009a).

Plus récemment en 2011, deux études ont été réalisées avec les effluents papetiers dans des systèmes de pile à deux compartiments utilisant de l'hexacyanoferrate à la cathode. Patil *et al* (2011a) comparent la génération d'électricité en fonction de différentes sources d'effluents dont un effluent papetier. Le biocatalyseur est une culture pure d'*Enterobacter aerogens*. Les auteurs obtiennent 22,35 mA/m² et 27 mW/m² lorsque l'effluent papetier est

utilisé seul. Les performances n'évoluent pas plus avec l'addition de différents médiateurs : 24,26 mA/m² et 34,604 mW/m² avec le rouge neutre et 28,12 mA/m² et 42,65 mW/m² avec le bleu toluidine (Patil *et al.* 2011a). Kassongo et Togo (2011), utilisent le même système avec une espèce bactérienne différente (*Enterobacter cloacae*) et obtiennent 24 mW/m² avec l'effluent papetier brut et 13 mW/m² avec l'effluent additionné de la culture bactérienne (Kassongo et Togo 2011).

Toutes ces études présentent des performances en densités de courant ou de puissance assez faibles lorsque l'effluent papetier est utilisé comme seul substrat et inoculum. Les systèmes les plus réalistes d'un point de vue de traitement d'effluent sont les systèmes de Huang et Logan dans lesquels ils utilisent une cathode à air, mais les densités de puissance restent faibles: 144 mW/m² en batch et 210 mW/m² en alimentation continue (Huang et Logan 2008a, b).

Par rapport aux mécanismes mis en jeu, les PACMs pourraient être en concurrence directe avec la méthanisation car les deux procédés permettent de récupérer de l'énergie du traitement de l'effluent, mais la PACM pourrait être appliquée aux effluents faiblement concentrés.

Conclusion

La seule application actuelle de la technologie PACM au-delà du cadre du laboratoire concerne les PACMs exploitant les sédiments marins pour alimenter en énergie des dispositifs de contrôle électronique (Lovley 2008). Les PACMs présentent des avantages opérationnels et fonctionnels par rapport aux technologies classiques car elles permettent un pourcentage de conversion élevé de l'énergie chimique contenue dans le substrat en électricité. Elles opèrent à température ambiante, n'ont pas besoin d'une aération forcée, l'apport d'O₂ étant réalisé de façon passive, ont un potentiel d'application dans des zones qui manquent d'infrastructures électriques et peuvent aussi opérer avec divers combustibles partant des carbohydrates simples tels que l'acétate ou le glucose jusqu'aux plus complexes tels que l'amidon (Mathuriya et Sharma 2009a). De nombreuses souches bactériennes ont été citées dans la littérature comme étant électro-actives, celles qui reviennent le plus souvent sont : *Geobacter*, *Schewanella* et *desulfuromonas*. Une récente revue publiée en 2009 recense les principales souches électro-actives connues (Logan 2009). Les métabolismes de ces micro-organismes ne sont pratiquement pas étudiés.

Les PACMs pourraient ouvrir des opportunités pour le traitement des effluents des usines de production de papier mais les performances obtenues jusqu'à présent dans ce cas restent faibles. Le challenge serait donc d'essayer d'améliorer ces performances.

Chapitre II

Matériels et méthodes

Ce chapitre regroupe l'ensemble des matériels, méthodes et techniques utilisés pour les expériences présentées dans ce manuscrit.

II.1. Echantillons industriels et milieu synthétique

Les circuits d'eau des usines de production de pâtes et papiers sont des environnements propices au développement de micro-organismes et de biofilms. Chaque circuit est unique du point de vue de la communauté bactérienne qui s'y développe. Les conditions de développement y varient selon la qualité et les volumes d'eau utilisés, la température, la nature de la matière première (fibres vierges ou recyclées), l'environnement immédiat de la papeterie, le type de papier produit, le procédé de fabrication et les additifs utilisés. Dans chaque papeterie, les conditions de développement des micro-organismes peuvent également varier à chaque étape du processus de fabrication du papier (Desjardins et Beaulieu 2003). Nous avons étudié des effluents prélevés à différents points des circuits d'eau sur trois sites papetiers dont les modes de production sont très différents.

Les effluents prélevés sur les sites industriels sont stockés en chambre froide à 4°C pendant quatre semaines maximum jusqu'à leur utilisation.

II.1.1. Effluents et biofilms du site N°1

Le site N°1 est un site de production de pâte chimique par procédé Kraft (cuisson au sulfure de sodium, avec récupération des réactifs) et, de papier pour impression et écriture. Les effluents y sont traités par une lagune aérée (procédé extensif d'épuration biologique aérobie). Ce mode de traitement, peu répandu en papeterie, implique des volumes plus importants des bassins d'épuration, pour des valeurs de DCO en entrée limitées, et des concentrations en bactéries épuratrices plus faibles que dans les procédés d'épuration par boues activées.

Deux échantillons ont été étudiés pour ce site:

- ❖ L'échantillon «Entrée Lagune» composé d'effluent (DCO= 945 mg/L) enrichi par un biofilm prélevé sur des tuyaux en entrée de lagune ;
- ❖ L'échantillon «Sortie Lagune» composé d'effluent (DCO= 432 mg/L) enrichi par des sédiments prélevés à 1 mètre de profondeur en sortie de lagune.

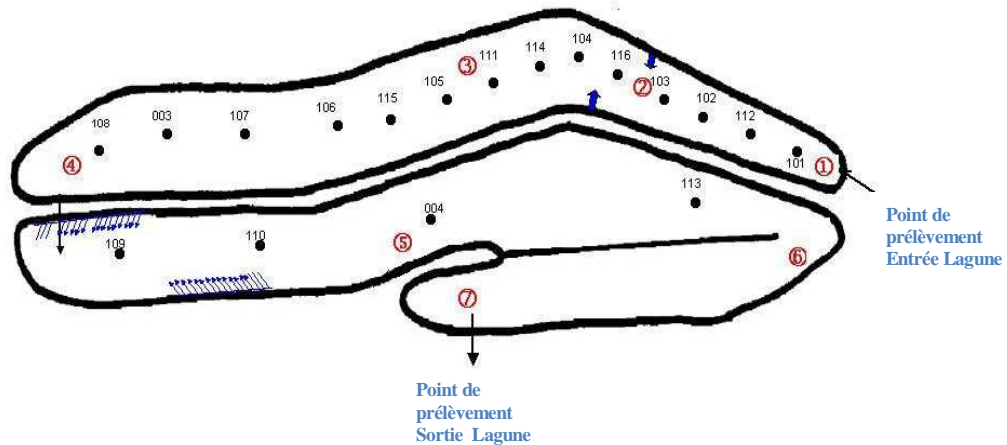


Figure 23: Schéma de la lagune (site N°1) et points de prélèvements des échantillons étudiés. Les points noirs sur le schéma représentent les turbines d'aération

A



B



Figure 24: Photos des points de prélèvements des effluents, des sédiments et des biofilms dans la lagune (Site N°1). A: entrée de lagune; B: sortie de lagune.

II.1.2. Effluents et biofilms du site N°2

Ce site produit du papier pour la fabrication de cartons ondulés à partir de 100% de fibres recyclées (papiers de récupération). Les effluents y sont traités par méthanisation. Sur ce site nous avons prélevé et étudié les échantillons suivants:

- ❖ L'échantillon «Effluent sortie méthaniseur» composé d'effluent en sortie du méthaniseur enrichi lorsque cela sera précisé de granules anaérobies prélevées à l'intérieur du

méthaniseur ou encore mélangé avec l'effluent en entrée du méthaniseur lorsque l'on souhaitera augmenter la DCO en entrée du réacteur ;

❖ L'échantillon «Rejets de la station d'épuration» constitué d'effluent et biofilm prélevés en sortie du bassin d'aération (clarificateur).

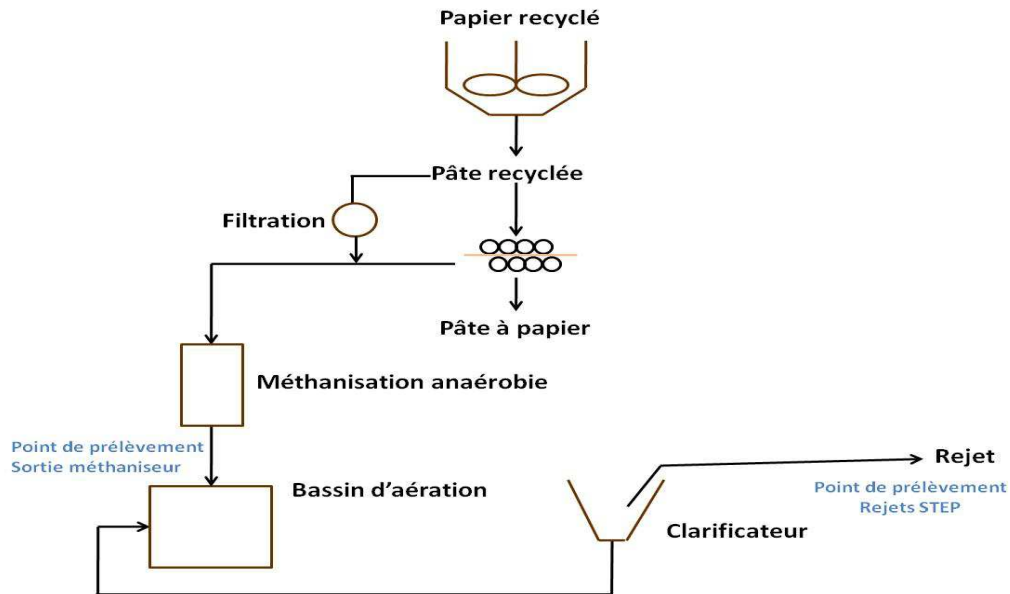


Figure 25: Points de prélèvements au sein du site N°2.

II.1.2.1. L'effluent sortie méthaniseur

La méthanisation est un procédé de dégradation biologique anaérobie de la matière organique par une flore microbienne se développant en absence d'oxygène. La matière organique contenue dans les eaux machine à papier (MaP) subit préalablement une fermentation par les micro-organismes présents dans les circuits. Dans une enceinte fermée, ces eaux préalablement filtrées ou décantées sont transformées en biogaz (méthane + CO₂) à l'aide de micro-organismes anaérobies spécifiques et une petite quantité de bio-solides. Les eaux en entrée du méthaniseur provenant directement de la machine à papier sont très concentrées en matière organique (DCO = 4000 mg/L). L'effluent à la sortie du méthaniseur ayant subi la méthanisation contient de la matière organique résiduelle non transformée en biogaz (DCO = 1500 mg/L).

Des échantillons de boues granuleuses anaérobies responsables de la dégradation de la matière organique ont été prélevés dans le méthaniseur pour enrichir les effluents en inoculum lorsque cela sera précisé.

II.1.2.2. Les rejets de la station d'épuration

Ce sont des eaux de rejets après décantation des boues biologiques dans des clarificateurs. Ces eaux contiennent donc très peu de matières organiques, mais peuvent néanmoins contenir de la matière organique non biodégradable ainsi que des sels dissous. Des échantillons de ces effluents ainsi que des biofilms issus des clarificateurs se développant sous oxygène au niveau des surverses ont été prélevés et testés lors de nos études.

II.1.3. Effluents et biofilms du site N°3

Ce site produit du papier journal à partir d'un mélange de pâte thermomécanique à haut rendement (issue du bois) et de fibres recyclées préalablement désencrées et blanchies grâce au peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et au sulfate de sodium ($NaSO_3$). Dans ces eaux, on retrouve les sous-produits du bois (lignine, acides résiniques...), et les produits de dégradation issus des papiers de récupération. Les effluents sur ce site sont traités par boues aérobie. Les prélèvements ont été effectués en 3 points différents du processus:

- ❖ L'échantillon «Effluent MaP» constitué de filtrats clairs prélevés au niveau de la machine à papier complété par le biofilm prélevé en sortie du clarificateur secondaire ;
- ❖ L'échantillon «Effluent entrée biologique» constitué d'effluent en sortie du décanteur primaire ;
- ❖ L'échantillon «Effluent sortie STEP» constitué d'effluent et biofilm prélevés en sortie du clarificateur secondaire.

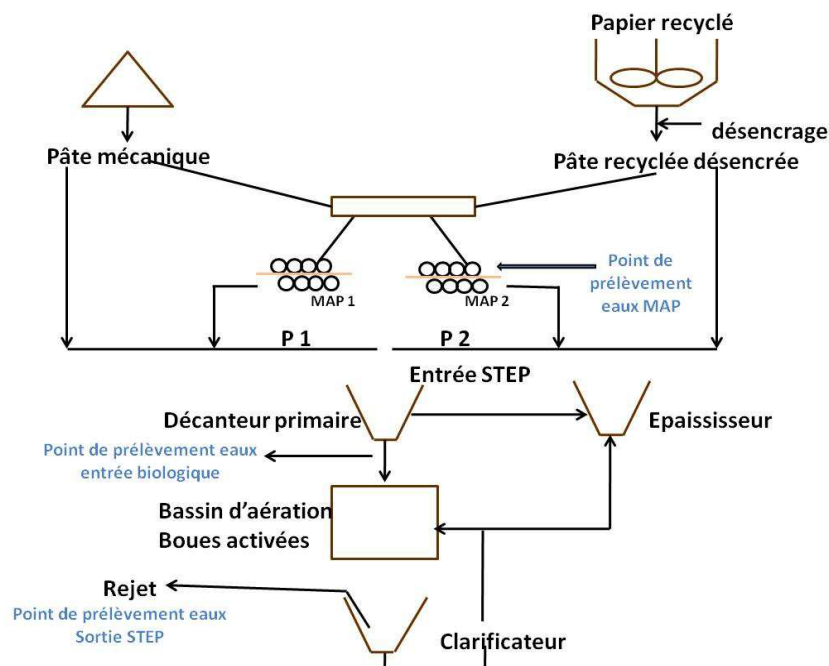


Figure 26: Points de prélèvements au sein du site N°3

II.1.3.1. L'échantillon «Effluent machine à papier» (MaP)

Le processus de fabrication du papier se déroule généralement autour de 50°C. La forte température ainsi que l'humidité favorisent la formation de biofilms sur les machines ce qui entraîne la nécessité de l'emploi fréquent de biocides. De plus, l'eau étant plusieurs fois recyclée, elle est de plus en plus concentrée en matières organiques au fur et à mesure des recyclages, avec comme conséquences la nécessité de purger une partie de cette eau pour la remplacer par de l'eau fraîche ou encore l'arrêt programmé de la machine pour des nettoyages fréquents lorsque l'encrassement devient trop important.

Les échantillons d'eau de machine à papier (MaP) sont donc des filtrats clairs des eaux sous toile issues de l'égouttage du papier. Ils contiennent de la matière organique issue de la pâte mécanique et de la pâte recyclée (DCO= 1200 mg/L).

L'effluent MaP a été enrichi par des biofilms en sortie de station d'épuration (STEP) pour constituer l'échantillon «Effluent MaP». En effet, on observe très souvent au niveau de la surverse des clarificateurs des stations d'épuration un développement de biofilms constitués d'algues qui servent de source de matières organiques aux autres micro-organismes.

Des essais d'enrichissement de cet effluent avec des biofilms prélevés au niveau de l'encrassement sur la machine à papier ont aussi été réalisés.

II.1.3.2. L'échantillon «Effluent entrée biologique» (E B)

Dans le site N°3, les effluents sont constitués de rejets d'eaux des procédés issues de la fabrication de la pâte mécanique, du désencrage des fibres recyclées et des machines à papier. Après plusieurs recyclages, lorsque les eaux de procédés ne peuvent plus être réutilisées, elles subissent plusieurs traitements avant d'être rejetées dans la nature : une décantation primaire pour enlever toutes les matières en suspension, ensuite une oxydation biologique aérobie (système de boues activées) au cours de laquelle elles sont déchargées de toutes les matières organiques biodégradables et enfin une décantation secondaire dans des clarificateurs. Les effluents prélevés en entrée du bassin biologique (point de prélèvement indiqué sur la **Figure 26** sont donc peu chargés en matières en suspension, mais contiennent encore des concentrations élevées en matières organiques (DCO = 1600 mg/L). Nous n'avons pas prélevé de biofilms à ce point car ces effluents sont suffisamment chargés en micro-organismes (10^7 à 10^8 UFC/mL).

II.1.3.3. L'échantillon «Effluent sortie de station d'épuration» (STEP)

Les effluents prêts à être rejetés dans l'environnement ont été prélevés et complétés de biofilms en sortie de des clarificateurs prélevés au niveau de la surverse des clarificateurs et décrits précédemment (*Cf* paragraphe II.1.3.3.).

| N° du site | Echantillon | Composition |
|------------|-----------------------------|--|
| Site N°1 | Effluent entrée Lagune | Effluents + biofilm prélevés en entrée de la Lagune |
| Site N°1 | Effluent sortie Lagune | Effluents + sédiments prélevés en sortie de la Lagune |
| Site N°2 | Effluent sortie méthaniseur | Les effluents à la sortie du méthaniseur Des boues granuleuses anaérobies prélevées dans le méthaniseur ont été utilisées pour enrichir les effluents en inoculum lorsque cela sera précisé. |
| Site N°2 | Rejets STEP | Effluents + biofilms issus des clarificateurs |
| Site N°3 | Effluent MaP | Eaux sous toile de la machine à papier + biofilm prélevés au niveau des clarificateurs de la STEP. Des biofilms MaP ont aussi été testés pour enrichir les effluents en inoculum lorsque cela sera précisé. |
| Site N°3 | Effluent entrée biologique | Effluents prélevés en entrée du bassin biologique |
| Site N°3 | Effluent sortie STEP | Effluents et biofilms prélevés au niveau de la surverse des clarificateurs |

Tableau 4: Récapitulatif de la composition des différents échantillons prélevés dans différents sites papetiers.

II.1.4. Milieu de culture synthétique pour les bactéries anaérobies

Lorsqu'indiqué, les effluents industriels sont complétés par un milieu synthétique à une proportion de 50-50 (volume/volume) pour favoriser la croissance bactérienne en palliant les déficits de nutriments azotés et phosphorés des effluents papetiers.

Le milieu synthétique que nous avons choisi a été inspiré du milieu utilisé pour la culture de la souche bactérienne *Geobacter sulfurreducens* décrite dans la littérature comme une souche électro-active d'excellence en présence d'acétate (Dumas *et al.* 2008a,b,c.). Pour le milieu simplifié, la concentration de NaHCO_3 passe de 2,5 à 2 g/L, l'acétate de sodium (0,82 g/L) ainsi que les vitamines (10 mL) et sels minéraux (10 mL) sont supprimés. Un litre de ce milieu simplifié contient ainsi: KCl 0,1 g (2,7 mM); NH_4Cl 1,5 g (28 mM); NaHCO_3 2 g (23,8 mM); NaH_2PO_4 0,6 g (5 mM). Avant d'être ajouté dans le réacteur, il a été stérilisé par autoclavage à 121°C pendant 20 minutes pour éviter un apport de micro-organismes supplémentaire.

Le pH de ce milieu synthétique mesuré après autoclavage s'établit à 8,6 environ. Il est ensuite ajusté à 7,0 à l'aide d'une solution de HCl 1M.

II.2. Méthodologie de formation des bioanodes sous potentiel imposé

Pour étudier la formation des biofilms EA, nous avons essentiellement utilisé un système à 3 électrodes.

II.2.1. Montage expérimental en système 3 électrodes

Quelque soit le design du réacteur ou le mode d'alimentation utilisés, les expérimentations en système à 3 électrodes sont représentées schématiquement sur la *Figure 27*.

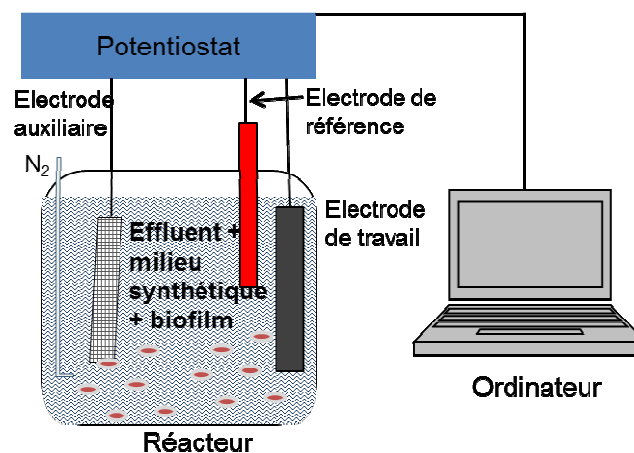


Figure 27: Dispositif expérimental du montage à 3 électrodes.

Nous avons utilisé un multipotentiostat modèle VMP3, piloté par un logiciel EC-LAB V.10, 1 (Bio-Logic SA. France). Un dispositif N-STAT (Bio-Logic SA. France) a permis de faire fonctionner 8 électrodes de travail disposées dans un même réacteur (1,5 L) de telle sorte qu'elles puissent fonctionner dans des conditions rigoureusement identiques avec une seule électrode de référence et une seule électrode auxiliaire.

Sauf précision, les électrodes de travail sont des plaques de graphite polarisées entre -0,4 V/ECS et +0,4 V/ECS.

II.2.1.1. Les réacteurs

Les réacteurs utilisés sont des cuves en verre de 500 mL ou 1500 mL de volume. Ils sont fermés par un couvercle qui comporte des orifices permettant le passage des électrodes et le maintien d'un tube de verre à embout fritté pour le barbotage des gaz. Les orifices inutilisés sont fermés par des bouchons en butyl sertis et sont utilisés comme ports de prélèvement ou pour les différents modes d'alimentation. Sur le corps du réacteur un orifice permet l'évacuation du milieu lors de l'alimentation en continu. La jonction entre le réacteur et le

couverture est scellée hermétiquement grâce à un joint torique et un collier de serrage en acier. Les réacteurs sont placés dans un local climatisé à 25°C.

A



B

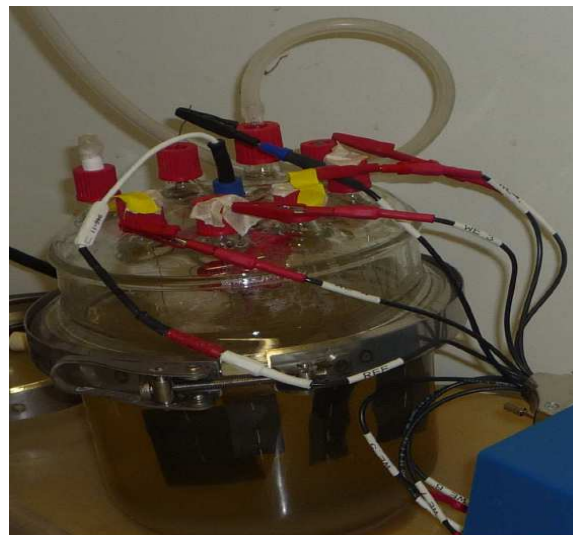


Figure 28: Photos du montage expérimental. A) montage simple à 3 électrodes, B) montage avec dispositif N-STAT.

Un barbotage d'azote pur ou d'un mélange CO₂ 20% - Azote 80% permet d'établir des conditions anaérobies strictes dans les réacteurs. Ce barbotage est assuré à partir de bouteilles de gaz industriel (Air Liquide) avec un débit contrôlé de 100 mL/minute. Le barbotage avec du CO₂ pur induit en plus des conditions anaérobies une acidification du milieu (pH 6,0 à 6,5).

II.2.1.2. Electrodes et prétraitements

Plusieurs matériaux ont été testés comme électrodes de travail:

- ❖ plaques de graphite Goodfellow (C000350) de dimensions 5 x 2 x 0,5 cm³ ;
- ❖ tissus de carbone avec fibres tissées traitées avec 10wt% de PTFE de dimensions 5 x 2 x 0,340 cm³ ;
- ❖ feutres de carbone avec fibres non tissées traitées avec 10% de PTFE de dimensions (5 x 2 x 0,2 cm³ ou 5 x 4 x 0,2 cm³ lorsque précisé), fournis par PaxiTech ;
- ❖ plaques en acier inoxydable 254 SMO brutes ou microstructurées (Ra = 5μm) de dimensions 9 x 2 x 0,5 cm³ fournies par le CEA Saclay. Des dimensions différentes ont parfois été utilisées, dans ce cas, cela sera alors précisé dans le texte.

Avant leur utilisation, les différentes électrodes sont nettoyées par une immersion d'une heure dans une solution 1M de HCl, et une heure supplémentaire dans une solution 1M

de NaOH pour les débarrasser de toute matière organique. Entre chaque étape l'électrode est rincée abondamment sous l'eau courante pendant 20 minutes. Les électrodes en graphite et en aciers sont percées, taraudées et vissées à une tige de titane filetée (diamètre 2 mm, Alfa Aesar) qui assure le contact électrique. Les parties de la tige de titane servant à la connexion sont nettoyées à l'aide d'un papier abrasif afin d'éliminer la couche d'oxydes peu conductrice qui peut les recouvrir. Le contact électrique dans le cas des électrodes de tissu et feutre de carbone est assuré par un fil de platine (diamètre 0,5 mm) qui est tressé à travers l'électrode.

Pour des systèmes à 3 électrodes, des grilles de platine (Heraeus) composées de fils de 0,12 mm de diamètre (90% Platine-10% Iridium) ont été utilisées comme contre-électrodes. Elles ont été au préalable nettoyées par chauffage à la flamme d'un bec Bunsen pendant plusieurs minutes.

Nous avons utilisé comme référence, pour toutes les expériences, des électrodes au calomel saturées (ECS, Hg/Hg₂Cl₂/Cl⁻, Copenhagen, Radiometer). La valeur du potentiel de cette électrode par rapport à l'électrode standard à hydrogène ESH à 25°C est de +0,241 V. il faut donc ajouter 0,241 V à un potentiel mesuré par rapport à ECS pour l'exprimer par rapport à ESH.

II.2.2. Sélection et repiquage des biofilms anodiques

Pour la détection des micro-organismes électro-actifs, un premier biofilm dit «primaire» est formé à partir d'effluents et de biofilms «sauvages» prélevés sur les différents sites industriels (Cf paragraphe II.1.). Lorsqu'indiqué, 250 mL de ce milieu sont complétés par 200 mL de milieu synthétique décrit au paragraphe II.1.4. Le milieu est rendu anaérobie grâce à un barbotage d'azote dans les réacteurs dès le début de l'expérience. Le maintien de ce barbotage en continu tout au long de l'expérience permet d'éviter l'oxydation du substrat par les bactéries aérobies planctoniques (libres). Lorsqu'indiqué, les effluents seront additionnés d'acétate pour permettre l'amélioration de la répétabilité des expériences en apportant une source de carbone facilement biodégradable.

Pour optimiser les biofilms électro-actifs, des séries de décrochage/repiquage ont été réalisées. Le décrochage des biofilms formés sur les électrodes de travail est effectué par ultrasons à 20°C pendant 15 minutes dans 30 mL d'une solution de Ringer (solution isotonique qui permet d'éviter les chocs osmotiques lorsque les bactéries se trouvent transférées en dehors de leur milieu naturel). Le repiquage est réalisé dans l'effluent industriel brut. L'effluent industriel est au préalable filtré à 0,45 µm pour éviter la contamination et donc juger du seul effet des bactéries provenant du biofilm précédent.

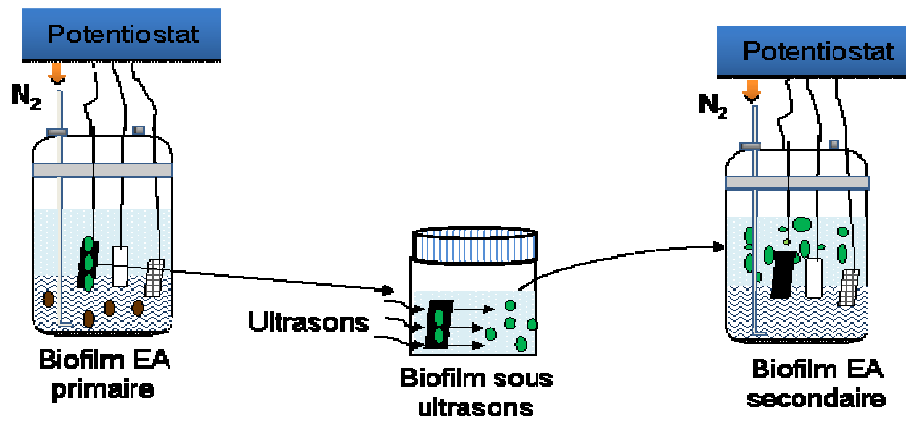


Figure 29: Représentation schématique du repiquage des biofilms EA

Enfin, les électrodes colonisées sont caractérisées par différentes méthodes microscopiques et microbiologiques (DGGE, photos MEB et à épifluorescence) parfois en collaboration avec des partenaires du projet ANR Agri-Elec.

II.2.3. Techniques électrochimiques

II.2.3.1. Chronoampérométrie (C A)

La chronoampérométrie à potentiel constant consiste à imposer un potentiel constant à une électrode de travail et à enregistrer la réponse en courant au cours du temps. Dans ce travail de thèse, cette technique est utilisée pour suivre l'évolution du développement du biofilm et de son efficacité au cours du temps. La formation du biofilm électro-actif se manifeste par l'apparition d'un faible courant électrique, puis son développement, actif sur la surface de l'électrode et, stimulé au fur et à mesure des ajouts du substrat se traduit par une augmentation du courant que l'on assimile souvent à l'allure caractéristique d'une courbe de croissance microbienne (**Figure 30**).

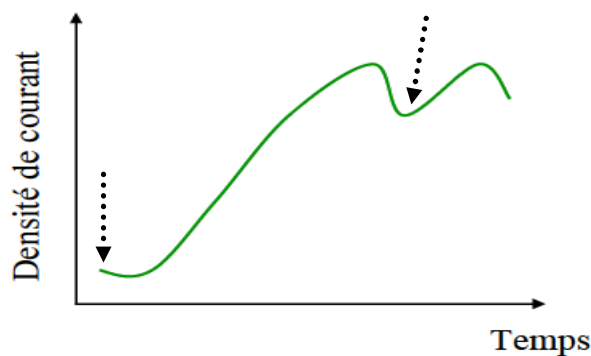


Figure 30: Exemple de chronoampérogramme lors du développement d'un biofilm électro-actif. Les flèches sur les figures indiquent les ajouts d'acétate

Calculs des densités de courant et rendements faradiques

Les densités de courant sont obtenues en divisant le courant obtenu par la surface projetée de l'électrode.

Les calculs des rendements faradiques dépendent du mode d'alimentation comme présenté au chapitre précédent (Cf paragraphe I.3.11.3.)

En alimentation batch, dans le cas d'un substrat simple :

$$Rf = \frac{M_i \int_0^t idt}{nFCV} \quad \text{Équation 39}$$

En alimentation batch séquentielle ou continue:

$$Rf = \frac{M_i \int_0^t idt}{nFV\Delta DCO} \quad \text{Équation 40}$$

Avec: M_i : masse molaire du substrat (g/mol)

$\int_0^t idt$: nombre de coulombs produits par la réaction pour un intervalle de temps donné (C)

n : nombre d'électrons échangés au cours de la réaction (mol e⁻/mol)

F : constante de Faraday (C/mol e⁻)

C : concentration du substrat introduite dans le réacteur

V : volume de l'effluent mis en jeu (L)

ΔDCO : variation de la DCO en entrée et à la sortie du réacteur (g/L)

Dans le cas d'un substrat pur, l'acétate par exemple, $n = 8$ mol e⁻/mol alors que dans le cas d'un effluent, le calcul se fait par rapport à l'oxygène, $MO_2 = 32$ et $n = 4$

II.2.3.2. Voltammétrie Cyclique (V C)

La voltammétrie cyclique est une technique qui consiste à un balayage linéaire du potentiel de l'électrode de travail au cours du temps. Le potentiel effectue des allers-retours à

la même vitesse entre deux valeurs limites prédéfinies à partir d'un potentiel initial choisi égal au potentiel à courant nul. Le milieu n'est pas agité pendant le balayage en potentiel. Le potentiostat mesure le courant qui est représenté en fonction du potentiel dans un voltammogramme (*Figure 31*).

A différents moments durant la Chronoampérométrie (CA), des mesures de Voltammétries Cycliques (V Cs) sont réalisées avec les électrodes en cours de colonisation. Pour cela le potentiostat fait varier le potentiel appliqué à partir du potentiel imposé lors de la CA en balayages aller et retour entre -0,6 V/ECS et 0,6 V/ECS à des vitesses de 1 mV/s ou 10 mV/s. A la fin des expériences de CA, des électrodes propres sont parfois introduites dans le milieu pour y réaliser des mesures de VCs dans les mêmes conditions afin de déterminer le rôle du biofilm sur la production du courant. Habituellement, cette mesure est réalisée à partir du potentiel à courant nul, mais pour ces essais réalisés en cours de chronoampérométrie, nous avons choisi de démarrer les V Cs à partir du potentiel imposé en C A pour limiter les perturbations imposées aux biofilms.

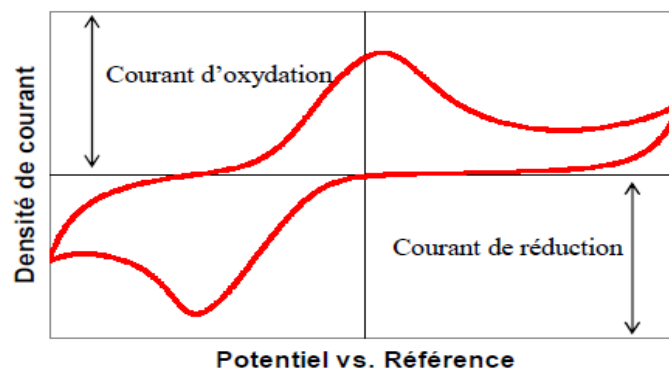


Figure 31: Allure d'un voltammogramme

Cette technique est généralement utilisée en raison de sa simplicité de mise en œuvre et de sa rapidité pour la caractérisation initiale d'un système redox actif. Elle fournit une estimation du potentiel redox des systèmes électro-actifs capables d'échanger des électrons avec l'électrode, des informations sur les mécanismes de transfert électronique entre l'électrode et le biofilm, ainsi que sur la stabilité de l'analyte⁵ dans les états d'oxydation à l'intérieur de la gamme de potentiels choisie (Fricke *et al.* 2008).

⁵ Analyte = substance à analyser

II.2.4. Modes d'alimentation

II.2.4.1. Alimentation batch

L'effluent industriel est complété avec de l'acétate comme substrat additionnel pour aider à la formation rapide des biofilms EA. Lorsque cela est précisé, l'effluent est dilué avec le milieu synthétique simplifié décrit au paragraphe II.1.4. dans les proportions de 250 mL d'effluent pour 200 mL de milieu synthétique. 10 mM de KCl sont systématiquement ajoutés dans chaque réacteur pour améliorer la conductivité de l'effluent. Chaque pic observé sur les chronoampérogrammes correspond à un ajout d'acétate dans le réacteur.

II.2.4.2. Alimentation batch séquentielle

Lors des essais d'optimisation des bioanodes, le réacteur contient uniquement de l'effluent industriel qui joue les rôles de substrat et d'inoculum. Des quantités précises d'effluent sont périodiquement remplacées en fonction du temps de séjour souhaité dans le réacteur.

II.2.4.3. Alimentation continue

En alimentation continue, l'effluent brut, utilisé comme substrat et inoculum, est renouvelé dans le réacteur grâce à une pompe péristaltique dont la vitesse est réglée en fonction du débit d'alimentation souhaité. Les effluents industriels sont stockés à 4°C sous barbotage d'azote pour éviter une dégradation rapide de leur DCO. Le temps de rétention hydraulique (TRH) ou temps de séjour de l'effluent dans le réacteur est déterminé par la mesure du volume de sortie. La mesure de la DCO en sortie permet de calculer le taux d'abattement de DCO assuré par le procédé.

II.3. Expérimentation en piles semi-microbiennes

II.3.1. Cathode à air

Pour les expériences en piles semi-microbiennes, nous avons utilisé une cathode dite «à air» car capable de réduire l'oxygène de l'air à sa surface. Elle est constituée d'une succession de 3 couches pressées les unes aux autres comme présenté sur la *Figure 32*.

❖ Première couche ou couche de diffusion. Elle a pour rôle d'homogénéiser la distribution des gaz sur toute la surface de l'électrode, le transport des électrons et l'évacuation des produits de la réaction. Elle est préparée comme suit: sur un feutre de carbone (25 cm²) incorporé de couche microporeuse mpl (micro porous layer), on induit des

couches de polytétrafluoroéthylène (PTFE, 20%) pour la rendre hydrophobe et réduire ainsi les pertes d'eau

❖ Deuxième couche: une couche active réalisée par le mélange d'une poudre de carbone et de particules de catalyseur platine liées par du PTFE (5%) pour une charge finale en Pt de $0,5 \text{ mg/cm}^2$. La couche active de la cathode, lorsque cela sera indiqué, peut subir quelques modifications en fonction des paramètres que l'on désire étudier.

❖ Troisième couche: un séparateur en polyoléfine collé sur un tissu de carbone recouvre la cathode. Il a pour rôle de filtrer les impuretés de l'effluent et de limiter ainsi l'empoisonnement des sites actifs du catalyseur platine. La membrane polyoléfine est composée de fibres non tissées. Elle est utilisée généralement comme séparateur dans les batteries et a une épaisseur de $150 \text{ }\mu\text{m}$ pour un rayon de pores de $12 \text{ }\mu\text{m}$. Il joue le rôle de support à l'électrolyte. C'est un séparateur physique pas du tout sélectif par rapport aux ions.

❖ Lorsque la polyoléfine est utilisée comme séparateur, la cathode sera nommée «cathode standard». Plusieurs autres membranes ont été testées comme séparateurs. Il s'agit de :

- membranes anioniques nommées «AEM N°1» et «AEM N°2». Les caractéristiques du fournisseur pour ces deux membranes sont: pour «AEM N°1»: épaisseur $28 \text{ }\mu\text{m}$; capacité d'échange ionique $1,8 \text{ meq/g}$; résistance électrique $0,3 \text{ }\Omega/\text{cm}^2$; résistance de rupture $0,4 \text{ Mpa}$; stabilité thermique 70°C et pour «AEM N°2»: épaisseur $450\mu\text{m}$; capacité d'échange ionique $1,3 \text{ meq/g}$; résistance électrique $< 40 \text{ }\Omega.\text{cm}^2$; résistance de rupture $0,55 \text{ Mpa}$; stabilité thermique 90°C ,
- membrane de dialyse: membrane en acétate de cellulose utilisée généralement pour des applications en dialyse. Son épaisseur est de $30 \text{ }\mu\text{m}$ pour un rayon de pores inférieur à $12 \text{ }\mu\text{m}$. cette membrane laisse passer les ions de façon chimique,
- membrane Nafion®: c'est une membrane de conduction protonique utilisée généralement dans les piles à combustible de type PEMFC.

La couche active de la « cathode standard » contient $0,5 \text{ mg}$ de Pt/cm^2 et 20% de PTFE

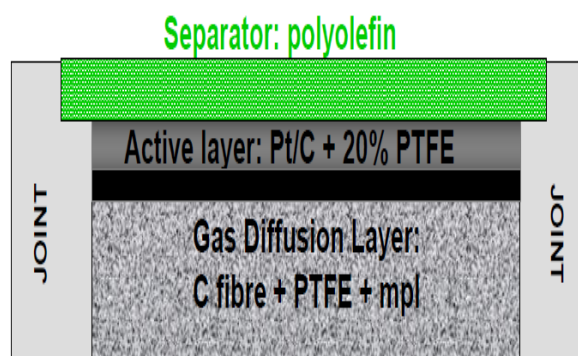


Figure 32: Composition de la cathode à air «standard» utilisée dans cette étude (Schéma PaxiTech).

Deux versions de prototypes formant les piles à combustible microbiennes ont été utilisées pour ces travaux.

II.3.2. Première version du prototype de pile semi-microbienne

La première version du prototype (*Figure 33*) a une contenance de 100 mL qui sera inoculée par les différents effluents papetiers sélectionnés. Les anodes et cathodes sont des tissus de carbone de surface projetées de 25 cm². Des grilles de titane (25 cm²) sont utilisées comme collecteurs de courant et des connecteurs en titane permettent de mettre en contact les électrodes aux résistances externes et au multipotentiostat qui va suivre l'évolution de la différence de potentiel de la pile avec le temps.

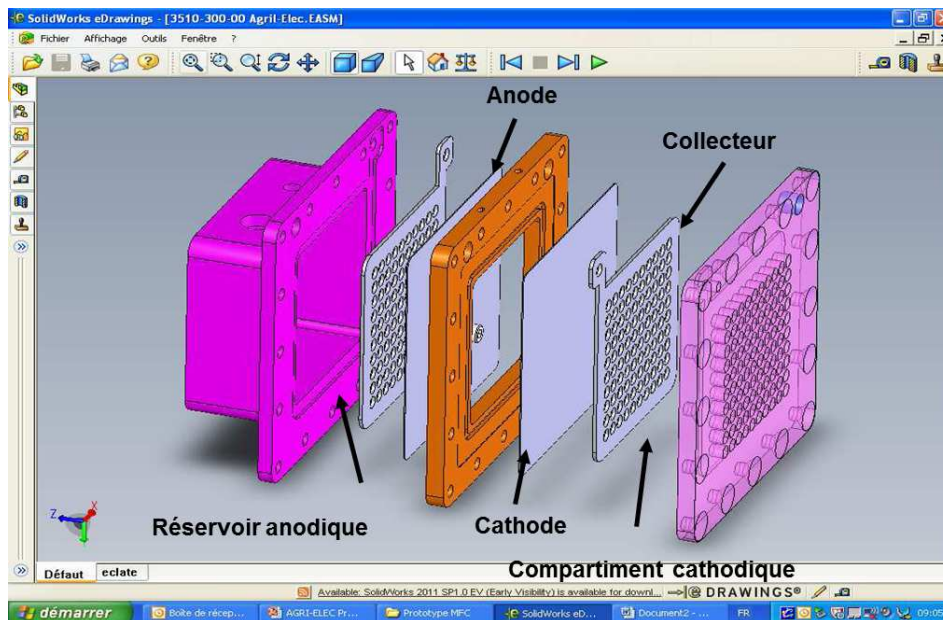


Figure 33: Première version du prototype de PAC. (Schéma PaxiTech).

Cette version est conçue de façon à pouvoir y introduire une électrode de référence au calomel saturée entre l'anode et la cathode afin de réaliser la caractérisation individuelle des deux électrodes. La distance inter électrodes est de 4 cm.

II.3.3. Deuxième version du prototype de pile semi-microbienne

Une deuxième version du prototype de pile hybride a été conçue en réponse à certaines des insuffisances identifiées sur la première version. Elle sera présentée dans le chapitre VI.

II.3.4. Caractérisation des piles semi-microbiennes: courbes de puissance

Lorsque les biofilms EA sont formés directement dans les piles, ils sont premièrement caractérisés par les techniques de chronoampérométrie et de voltammétrie cyclique décrites au paragraphe II.2.3. Les piles sont ensuite caractérisées par des mesures de différence de potentiel. Les électrodes sont connectées entre elles à travers différentes résistances externes. Le multipotentiostat permet de suivre l'évolution de ce potentiel en fonction du temps.

II.3.4.1. Première version du prototype

Pour la première version du prototype, le montage est réalisé de telle sorte que la différence de potentiel (ddp) de la pile et le potentiel de l'anode puissent être récupérés pour chaque valeur de la résistance externe. A partir de ces deux valeurs, sont calculées les potentiels de la cathode ($U_{pile} = E_{cath} - E_{an}$), le courant anodique ($U = R_{ext} I_{an}$), le courant cathodique ($I_{cath} = -I_{an}$), la puissance de la pile ($P = UI$). Toutes ces valeurs nous permettent de juger de la contribution individuelle des deux électrodes dans la puissance de la pile.

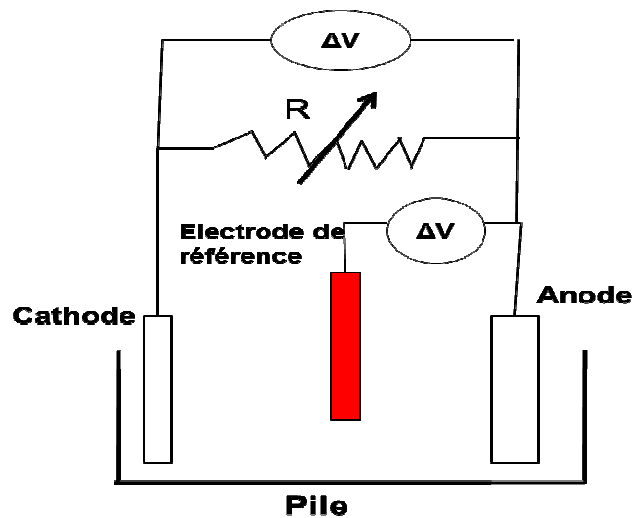


Figure 34: Représentation schématique du montage pour la caractérisation avec la première version du prototype.

II.3.4.2. Deuxième version du prototype

Dans cette version du prototype qui se veut optimisée, la diminution de la distance entre les électrodes a nécessité la suppression de l'électrode de référence. La seule variable suivie au cours du temps par le potentiostat est U_{pile} pour une R_{ext} donnée et donc pas de possibilité de caractérisation individuelle des électrodes.

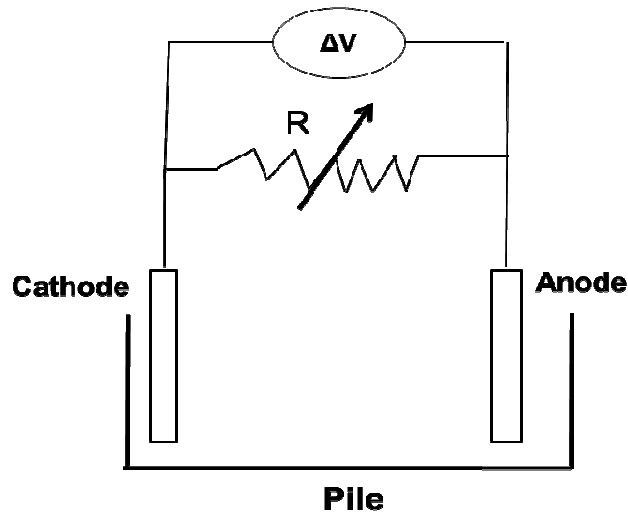


Figure 35: Représentation schématique du montage pour la caractérisation avec la deuxième version du prototype.

II.4. Caractérisation des effluents et des biofilms

II.4.1. La Demande Chimique en Oxygène (DCO)

La mesure de DCO est réalisée selon la norme ISO 15705 relative aux micro-méthodes photométriques standards en utilisant des réactifs Merck et un spectrophotomètre WTW Photolab® 6000. Ce test dose les composés organiques et minéraux oxydables par le dichromate de potassium avec du sulfate d'argent comme catalyseur. L'échantillon d'effluent est oxydé par une solution sulfurique chaude de dichromate de potassium, la concentration des ions Cr_2O_7 jaunes non consommés est ensuite dosée par photométrie.

Calcul des rendements et incertitudes

Pour juger de l'efficacité de traitement des effluents, il est nécessaire de calculer le taux d'abattement de la DCO comme suit :

$$\text{Abat DCO} = \left[\frac{\text{DCO}_{\text{entrée}} - \text{DCO}_{\text{sortie}}}{\text{DCO}_{\text{entrée}}} \right] \times 100 \quad \text{Équation 41}$$

Avec une incertitude calculée comme suit :

$$\Pi = 2 \times u_{DCO} = 2 \times \left[\frac{1}{DCO_{entrée}} \right] \cdot \sqrt{u_{(DCO_{entrée})}^2 + u_{(DCO_{sortie})}^2 + \frac{(DCO_{entrée} - DCO_{sortie})^2}{DCO_{entrée}^2}} \cdot u_{(DCO_{entrée})}^2$$

Équation 42

Avec u : incertitude sur la mesure de la DCO = 30 mg/L.

II.4.2. La Demande Biologique en Oxygène (DBO₅)

Elle est définie comme la concentration en masse d'oxygène dissous consommé dans des conditions définies par l'oxydation biochimique des matières organiques et/ou inorganiques dans l'effluent. Sa mesure consiste en un prétraitement de l'échantillon à analyser par dilution avec différentes quantités d'eau enrichie en oxygène dissous, plus un ensemencement de micro-organismes aérobies, avec suppression de la nitrification. Ensuite, l'échantillon subit une incubation à 20°C pendant 5 jours à l'obscurité dans un flacon entièrement rempli et fermé. La concentration en oxygène dissous avant et après incubation est alors déterminée et la masse d'oxygène consommé par litre d'échantillon calculée. La DBO₅ est donnée par la formule:

$$DBO_5 = \left[(C_1 - C_2) - \frac{V_t - V_e}{V_t} \times (C_3 - C_4) \right] \times \frac{V_t}{V_e}$$

Équation 43

Avec

C₁: concentration d'oxygène dissous dans l'effluent au temps initial (mg/L)

C₂: concentration d'oxygène dissous de l'effluent après 5 jours (mg/L)

C₃: concentration d'oxygène dissous de la solution du blanc au temps initial (mg/L)

C₄: concentration d'oxygène dissous de la solution du blanc après 5 jours (mg/L)

V_e: Volume de l'échantillon utilisé pour la préparation de la solution d'essai (mL)

V_t: Volume total de la solution d'essai (mL)

Ces mesures ont été réalisées en respectant la norme Européenne NF EN 1899-1.

II.4.3. Les Acides Gras Volatiles (AGV)

Les mesures d'Acides Gras Volatiles (AGV) ont été réalisées grâce à un dosage par chromatographie liquide (DIONEX). La chromatographie liquide est une technique analytique qui permet l'analyse qualitative (par séparation des espèces présentes) et quantitative des

espèces ioniques présentes dans un échantillon liquide dépourvu de matières en suspension. La phase stationnaire est une résine échangeuse d'ions (transgenomic IC Sep ICE-COREGEL 87H3). L'éluant est de l'acide sulfurique H_2SO_4 0.01 N. Le débit dans la colonne est de 0.6 mL/min. La gamme d'étalonnage est réalisée avec 10-50-100-200-500-1000 mg/L. La détection est réalisée par Ultra Violet (UV) visible à 205 nm.

II.4.4. Carbone inorganique, carbone total, dureté de l'effluent

Ces mesures sont réalisées avec un COTmètre (TOC-V CSN SHIMADZU) sous débit d'oxygène pur afin d'éviter les contaminations de CO_2 atmosphérique. L'appareil est préalablement étalonné avec deux courbes balayant différentes gammes de concentration : de 0 à 10 mg/L et de 10 à 100 mg/L. Les différents dosages de l'échantillon suivent la norme Européenne NF EN 1484:1997.

Le carbone total est dosé par combustion catalytique à haute température alors que dans le cas du carbone inorganique, il est éliminé dans l'effluent par acidification puis purgé séparément. Une mesure de CO_2 est ensuite réalisée dans les deux cas par une cellule Infra Rouge (IR).

II.4.5. Techniques microscopiques

II.4.5.1. Microscopie à épifluorescence

A la fin des expériences électrochimiques, les électrodes de travail sont retirées des réacteurs, colorées pendant 10 minutes à l'obscurité avec une solution à 0,03% d'acridine orange qui est un fluorochrome capable de traverser la membrane des micro-organismes pour se fixer à l'ADN ou à l'ARN des cellules vivantes. L'acridine orange a des caractéristiques d'excitation et d'émissions différentes suivant qu'il est fixé sur l'ADN ou l'ARN (Pour A6014, $\lambda_{excitation}= 502nm$, $\lambda_{émission}= 525nm$ dans le cas de l'ADN et $\lambda_{excitation}= 460nm$, $\lambda_{émission}= 650nm$ dans le cas de l'ARN). Les bactéries adhérentes à la surface des électrodes sont ainsi marquées, les échantillons sont ensuite rincés à l'eau distillée et laissés quelques minutes à l'obscurité totale pour séchage.

Les photos en épifluorescence sont réalisées à l'aide d'un microscope Karl Zeiss Axiotech 100 avec un objectif 50x (sec) équipé d'une lampe à mercure HBO 50/ac (excitateur AP 450-490, réflecteur FT 510, filtre LP 520). L'acquisition ainsi que le traitement des images sont réalisés à l'aide d'une caméra numérique monochrome (évolution VF) et du logiciel Image-Pro Plus.

II.4.5.2. Microscopie Electronique à Balayage (MEB)

Le microscope électronique à balayage est un LEO 435 VP-Carl Zeiss SMT fonctionnant à 10 kV de tension d'accélération et muni des diaphragmes 30, 50, et 700 μm . L'acquisition des photos se fait à l'aide du logiciel LEO UIF. Pour observer les bactéries adsorbées à la surface des électrodes, celles-ci sont préalablement traitées comme suit :

❖ Premièrement, une fixation chimique grâce à des fixateurs dont le but est de rendre les cellules insolubles dans l'eau ou dans les solvants organiques. Les systèmes enzymatiques sont ainsi bloqués pour éviter toute modification ultérieure.

Protocole de fixation:

1) fixation pendant 20 minutes à l'aide des fixateurs aldéhydiques (2 volumes de glutaraldéhyde à 4% + 1 volume de tampon phosphate 0,4 M à pH 7,4 + 1 volume d'eau distillée)

2) série de 2 bains successifs de 15 minutes à l'aide d'une solution constituée de 1 volume de tampon phosphate à pH 7,4 + 2 volumes de saccharose 0,4 M + 1 volume d'eau distillée

❖ Ensuite, une déshydratation progressive des cellules à l'aide de solvants organiques. La déshydratation successive est faite avec des solutions de plus en plus concentrées en acétone comme suit : acétone 50% (5 minutes), acétone 70% (5 minutes), acétone 100% (30 minutes), 50% acétone + 50% hexamethyldisilazane (HDMS) (30 minutes), 100% HDMS jusqu'à évaporation. Le HDMS étant un desséchant puissant.

II.4.6. Méthodes microbiologiques

II.4.6.1. La méthode DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)

L'électrophorèse en gradient de gel dénaturant est l'une des méthodes permettant de visualiser des mutations de l'ADN par changement d'une base dans la séquence. Elle permet d'étudier la diversité génétique des bactéries et d'obtenir des profils de populations bactériennes. Cette méthode a été utilisée pour la caractérisation des populations bactériennes sur les électrodes colonisées par des biofilms EA.

Le mode opératoire est le suivant: chaque biofilm est vigoureusement raclé de la surface d'électrode avec un épandeur de verre stérile dans un milieu stérile (M9). L'ADN est extrait du biofilm et les suspensions résultantes stockées à -80°C après addition de 5% de DMSO. Les communautés bactériennes sont ensuite ciblées par l'amplification du gène 16S en utilisant une paire d'amorces universelles (fd1 et rd1) correspondant aux positions 8 ± 27 et 1524 ± 1540 . La PCR résultante est amplifiée en utilisant une approche de PCR nichée avec des amorces 329f-GC et 919r qui génèrent 590 fragments bp (Haichar *et al.* 2008). La technique de PCR nichée permet de produire une importante quantité d'ADN à partir de

n'importe quel membre de la communauté qui a le gène cible. L'ADN amplifié par PCR est placé à une extrémité d'un gel d'électrophorèse qui a un gradient dénaturant de l'ADN (urée + formamide). Certaines bandes sont excisées pour de nouvelles amplifications par PCR et les produits de la PCR sont identifiés par un séquençage adéquat (Haichar *et al.* 2008).

L'ensemble de ces analyses a été réalisé par le Laboratoire d'Ecologie Microbienne de la Rhizosphère et d'Environnements Extrêmes (LEMIRE).

II.4.6.2. Mesure de la flore totale

Nous avons utilisé la méthode de dénombrement bactérien basée sur des dilutions successives pour avoir un ordre de grandeur des quantités de micro-organismes cultivables présents dans nos réacteurs.

Le mode opératoire est le suivant : en conditions stériles, 1mL du milieu est prélevé et transféré dans un tube contenant 9 mL d'urée tryptophane afin de réaliser une dilution au 1/10ème. L'opération est renouvelée en changeant de pipette et en versant de nouveau 1 mL dans un nouveau tube d'urée-tryptophane, et ainsi de suite, jusqu'à ce que la concentration en bactéries devienne relativement faible. Ensuite, 100 µL des différentes solutions préparées ci-dessus sont prélevées et réparties dans des boîtes de Pétri contenant un milieu gélosé PCA (Plate Count Agar) en vue d'immobiliser les bactéries, et de former des colonies bien définies. Les boîtes sont enfin mises à incuber à 30 C pendant 72 h avant le comptage. On considère que les colonies sont dénombrables si leur nombre est compris entre 30 et 300. Au-dessus de 300, elles sont indénombrables, et en dessous de 30, on considère qu'elles sont trop rares pour être dénombrées.

Chapitre III

Détection et sélection de biofilms anodiques dans les circuits d'eau des procédés papetiers

Introduction

L'objectif final de ces travaux de thèse est de concevoir un prototype de PACM adapté au traitement des effluents de l'industrie papetière. Pour y parvenir, la première étape essentielle est de détecter et sélectionner dans ce secteur industriel des sources d'inoculum aptes à former des biofilms électro-actifs (EA) dans des conditions optimisées de laboratoire. C'est cette partie de l'étude qui est présentée dans ce chapitre. Les échantillons (effluents, biofilms, sédiments) ont été prélevés dans divers environnements représentatifs des papeteries françaises. La sélection a été faite en fonction des modes de production et de traitement des effluents dans les différents sites (Cf paragraphe II.1.).

Comme présenté dans le chapitre précédent, nous avons choisi de travailler avec des systèmes à trois électrodes (C A, V C). Ce choix est justifié sur la base d'un état de l'art sur cette méthode de travail peu commune pour la majorité des chercheurs dans le domaine des PACMs.

Pour chaque échantillon sélectionné, nous présenterons les expériences les plus significatives qui ont été réalisées en vue de détecter les biofilms EA. Les différentes techniques de caractérisation ainsi que les méthodes mises en jeu pour l'optimisation de ces biofilms seront aussi présentées.

III.1. Approche expérimentale

III.1.1. Etat de l'art

L'étude des performances de biofilms EA par l'utilisation d'une pile à combustible microbienne dépend de mécanismes souvent complexes dont la contribution individuelle dans chacun des compartiments est difficilement évaluable. En effet, de nombreuses interactions entre les différentes composantes de la pile interviennent dans les performances finales résultant en des conclusions souvent supposées et non précises. On pourrait citer comme exemple d'interactions:

- ❖ une cinétique limitante de l'une des électrodes,
- ❖ les différentes surtensions du système,
- ❖ la résistivité de l'effluent,
- ❖ le potentiel anodique qui évolue tout au long de l'expérience induisant des conditions variables avec le temps.

Dans le cas d'une pile avec cathode à air, l'oxygène peut diffuser à l'anode à travers la membrane et affecter les performances de la cathode ... etc.

Pour comprendre exclusivement les contributions et performances individuelles des différentes composantes de la pile (anode, cathode, membrane...), de plus en plus de chercheurs ces dernières années se tournent vers des études en demi-cellules appelées également systèmes à 3 électrodes. Les techniques de chronoampérométrie (C A) ou de voltammétrie cyclique (V C) décrites dans le chapitre précédent (Cf paragraphe II.2.3) sont alors utilisées pour suivre l'évolution des performances des biofilms EA au cours du temps.

L'argument généralement avancé contre le choix d'un système à 3 électrodes est le coût des potentiostats nécessaires aux expérimentations (environ 30000 euros pour un potentiostat à 16 voies). Les scientifiques et leurs équipementiers ont commencé à réfléchir à des moyens d'y remédier. Un groupe de chercheurs Américains a mis au point récemment un système de potentiostat au tarif plus abordable (environ 500 euros pour 3 voies), rendant ainsi les études en potentiel contrôlé plus accessibles pour un grand nombre (Friedman *et al.* 2012).

Travailler en système 3 électrodes et donc sous un contrôle plus rigoureux des conditions électrochimiques présente plusieurs avantages : Ce mode de travail a permis d'évaluer l'électroactivité de diverses souches bactériennes en cultures pures, d'explorer divers environnements naturels à la recherche de biofilms EA et d'avancer dans la compréhension de différents phénomènes qui entrent en jeu dans la technologie de la PACM. De plus, il a été montré qu'imposer un potentiel élevé pour la formation de bioanodes augmente l'activité électrochimique des micro-organismes durant la phase de démarrage. En effet, une pile dans laquelle un potentiel positif par rapport à une référence Ag/AgCl a été imposé à l'anode pour la formation du biofilm EA démarre 24 jours plus rapidement que celle connectée directement avec une résistance externe (Wang *et al.* 2009). Les auteurs ont avancé plusieurs hypothèses parmi lesquelles imposer un potentiel élevé à l'anode augmente la charge positive de la surface de l'électrode (carbone). Ceci devrait favoriser l'adhésion des bactéries chargées négativement en particulier des bactéries Gram⁺ qui ont un rôle clé dans la production d'électricité car possédant un point isoélectrique plus bas que celui des bactéries Gram⁻ (Wang *et al.* 2009). L'idée d'une adhésion bactérienne dépendant de la charge surfacique de l'électrode avait déjà été suggérée par d'autres études (Cheng et Logan 2007; Busalmen *et al.* 2008).

La méthode de travail à 3 électrodes permet de juger rapidement de l'électroactivité de différentes souches bactériennes pures. Pour ces études, des substrats spécifiques sont dégradés aux électrodes. *Geobacter sulfurreducens* qui a été définie comme la souche électroactive par excellence est la souche la plus étudiée dans la littérature. Son activité électrochimique a été évaluée aussi bien du côté anodique que cathodique. Du côté anodique, en présence d'acétate, Dumas *et al.* (2008) ont étudié son activité sur deux matériaux

⁶ Gram-/Gram+ : définit une bactérie négative/ positive à la coloration de Gram qui permet de mettre en évidence les propriétés de parois bactériennes.

d'électrodes différents: La DSA (Dimensionally Stable Anodes, électrode à base de titane recouvert d'oxydes d'iridium et de tantale (10 g/m²)) (Dumas *et al.* 2008c) et l'acier inoxydable (Dumas *et al.* 2008a). Du côté cathodique cette fois, les mêmes auteurs ont montré qu'avec une électrode de même nature (acier inoxydable), cette souche pouvait aussi être EA en changeant le substrat (fumarate au lieu de l'acétate utilisé à l'anode) et surtout en imposant un potentiel plus négatif, (Dumas *et al.* 2008b).

A l'aide de techniques voltampérométriques classiques (Fricke *et al.* 2008) ou pulsées à l'exemple de la DPV (Differential Pulse Voltammetry) (Marsili *et al.* 2008), cette souche bactérienne a aussi été utilisée pour la compréhension des mécanismes se déroulant aux électrodes. Dans le but d'optimiser l'électroactivité de cette souche, des mutants ont été créés qui ont montré une activité catalytique supérieure à celle de la souche pure (Nevin *et al.* 2009; Yi *et al.* 2009).

Plusieurs autres souches pures ont été étudiées aussi bien à l'anode qu'à la cathode; nous pouvons ainsi citer *Shewanella oneidensis* (Peng *et al.* 2010); *Pseudomonas* (Yong *et al.* 2011), ou encore *Desulfobrio desulfuricans* (Cordas *et al.* 2009). Pour ce dernier exemple, Cordas *et al.* (2009) utilisent une culture pure de *D. desulfuricans* qui est une bactérie sulfato réductrice pour produire du courant sur la surface d'un acier inoxydable (254 SMO) ou d'un graphite polarisé à différents potentiels (-0,6, -0,4, -0,2, 0,2, 0,4 V/ECS). Les meilleurs rendements sont obtenus à -0,4 V/ECS. Des densités de courant stables de -158 mA/m² et -272 mA/m² sont produites avec une électrode de graphite polarisée à -0,4 V/ECS lorsque du sulfate de fer est rajouté comme substrat à la solution.

Les techniques électrochimiques à 3 électrodes ont aussi été utilisées pour évaluer l'activité de diverses sources d'inoculum naturels sur les performances des biofilms EA. On peut ainsi citer des milieux marins (Erable *et al.* 2009; Erable et Bergel 2009; Parot *et al.* 2011); les composts naturels ou des lixiviats (Dulon *et al.* 2007; Parot *et al.* 2008; Cercado-Quezada *et al.* 2010), des effluents industriels (Rabaey *et al.* 2010; He *et al.* 2011). Rabaey *et al.* (2010) utilisent ainsi cette technique pour définir le potentiel nécessaire à un système d'électrolyseur pour la production de la soude à la cathode. L'inoculum utilisé dans cette expérience provient d'un mélange de biofilms préformés issus d'une PACM et d'un pilote en fonctionnement, le substrat est un effluent domestique complété d'acétate à des concentrations variables et additionné d'un milieu de culture. En imposant un potentiel anodique élevé (1,77 V/ Ag/AgCl), le système produit un courant de 1,05 A sous acétate qui passe à 0,38 A lorsque l'effluent réel d'une brasserie est utilisé (Rabaey *et al.* 2010).

Ce mode d'étude a aussi permis des avancées dans la compréhension de différents phénomènes. Des corrélations ont ainsi pu être établies entre le potentiel imposé, le temps nécessaire pour le démarrage de l'activité du biofilm EA, le courant maximal obtenu, la concentration de la biomasse et la puissance de pile complète réalisée à partir de ces biofilms (Aelterman *et al.* 2008). Il a été récemment montré dans plusieurs études que la valeur du potentiel imposé est un paramètre important dont dépend la nature des communautés qui se développent à l'anode (Torres *et al.* 2009; Sun *et al.* 2009; Wagner *et al.* 2010; Wei *et al.*

2010). Avec des bioanodes formées sous quatre potentiels différents, dans les mêmes conditions avec des boues anaérobies comme inoculum, Torres *et al* (2009) ont montré que le potentiel le plus faible (-0,15 V/ESH ou -0,39 V/ECS) permet une croissance de biofilms EA plus rapide, une composition bactérienne dominée par le genre *Geobacter Sulfurreducens*, et une densité de courant plus élevée de 8 A/m². Une électrode dans le même réacteur qui a été polarisée à un potentiel plus élevé (0,37 V/ESH ou 0,13 V/ECS) présente un démarrage plus lent, une communauté bactérienne plus diverse et une densité de courant produite plus faible (0,6 A/m²). Les auteurs avancent comme hypothèse que les bactéries ont la faculté de maximiser l'énergie qu'elles vont tirer du transfert électronique vers l'électrode en fonction du potentiel appliqué. En effet, les micro-organismes ont à leur disposition plusieurs chaînes respiratoires et la sélection d'une chaîne respiratoire plutôt qu'une autre dépend de l'énergie qu'ils pourront acquérir (Torres *et al.* 2009). Finkelstein *et al* (2006) avaient déjà suggéré des détails sur l'effet du potentiel imposé sur les dynamiques de biofilm avec des anodes benthiques. Ils avaient émis l'hypothèse selon laquelle en fonction du potentiel, pour maximiser leur gain d'énergie, les micro-organismes régulent leur métabolisme en ajustant le potentiel de leurs réductases terminales à des valeurs légèrement inférieures à celle de l'anode (par exemple en augmentant le pourcentage des réductases réduites par rapport aux réductases oxydées). (Finkelstein *et al.* 2006).

Avec les techniques à 3 électrodes, les protocoles de formation des biofilms EA sont de plus en plus améliorés. Il a été ainsi montré que des biofilms provenant des réacteurs en fonctionnement utilisés comme inoculum dans de nouveaux réacteurs permettaient d'améliorer les performances de ceux-ci (Liu *et al.* 2008; Harnisch *et al.* 2011). Des paramètres spécifiques qui influencent les performances des biofilms ont été évalués à l'exemple du pH (Patil *et al.* 2011b). Enfin, avec cette méthode de travail, de très fortes densités de courant peuvent être atteintes. On retrouve ainsi dans la littérature des densités de l'ordre de 21,1 A/m² (Sleutels *et al.* 2011), 30,8 A/m² (He *et al.* 2011) ou même 60 A/m² dans des conditions particulières d'expérience avec des ultra microélectrodes (Pocaznoi *et al.* 2012a).

III.1.2. Choix du potentiel imposé pour former une bioanode

L'efficacité des biofilms électro-actifs est caractérisée par les densités de courant maximales (en A/m² de surface projetée d'électrode) et par les rendements faradiques qu'ils permettent d'atteindre. Un biofilm électro-actif (EA) anodique est performant lorsqu'il est capable de produire de fortes densités de courants aux potentiels les plus bas possibles.

Le choix du potentiel à imposer à l'anode dépend généralement de deux objectifs majeurs:

- ❖ augmentation des chances d'obtenir un biofilm EA
- ❖ sélection d'un biofilm EA le plus efficace

Si l'on souhaite maximiser les chances de former un biofilm EA, on impose un potentiel le plus élevé possible avant celui de l'oxydation de l'eau (0,84 V/ESH) ou de toute autre espèce en solution.

Wagner *et al.* (2010) dans une revue bibliographique comparent les performances de 28 études réalisées sous potentiel contrôlé. Parmi les 28 cas étudiés, 24 présentent des performances améliorées lorsque le potentiel de l'anode est élevé, alors que seulement 4 cas présentent des performances améliorées sous potentiel faible (Wagner *et al.* 2010). En théorie, plus le potentiel imposé est élevé, plus les micro-organismes ont de l'énergie disponible et se développent donc plus rapidement (biomasse plus importante). Wei *et al.* (2010) ont montré ces phénomènes dans une étude réalisée avec une culture pure de *G. Sulfurreducens*. Les anodes sont polarisées à 3 potentiels différents : -0,16V, 0V et 0,4 V/ENH. Les auteurs montrent un démarrage plus rapide, des densités de courant plus élevées et une production de biomasse plus importante pour les électrodes polarisées à des potentiels positifs par rapport à celles polarisées à -0,16V. Ils concluent que la clé pour obtenir une densité de courant élevée est de favoriser un développement rapide d'un biofilm épais sur la surface de l'électrode, ceci peut être obtenu en imposant un potentiel élevé à l'anode (Wei *et al.* 2010). L'énergie que peut gagner une bactérie dépend aussi du potentiel des protéines terminales de sa chaîne respiratoire. Lorsque le potentiel de l'anode est suffisamment élevé au-dessus du potentiel redox des protéines terminales, les électrons sont transmis à l'anode avec une vitesse maximale et augmenter encore le potentiel de l'anode n'apporte plus de gain supplémentaire. Les bactéries EA ne peuvent pas tirer profit d'un potentiel excessivement élevé au-dessus du potentiel redox de leurs protéines terminales (Sun *et al.* 2012). Cette limite explique qu'un palier de courant soit observé aux valeurs de potentiel les plus élevées sur les courbes de voltammétrie.

Sleutels *et al.* (2011) utilisant l'acétate comme substrat obtiennent de meilleures performances à potentiel élevé (> -0,25 V/ Ag/AgCl) par rapport à un potentiel faible proche du potentiel standard de l'oxydation de l'acétate (-0,45 V/ Ag/AgCl). Ils expliquent que les densités de courant sont plus élevées car les électrogènes⁷ ont alors plus d'énergie pour se développer et augmenter leur rendement métabolique. Ceci implique une plus grande consommation de substrat d'où une augmentation du rendement faradique (Sleutels *et al.* 2011). Avec une PACM benthique, Busalmen *et al* montrent que la valeur du potentiel appliqué est une variable clé pour optimiser la production d'énergie à partir de biofilms EA. Ainsi lorsque le potentiel de l'anode passe de 0,1 V à 0,6 V Ag/AgCl, de nouveaux couples redox sont détectés, ce qui indique un nouveau mécanisme de transfert d'électrons (Busalmen *et al.* 2008).

D'après toutes ces études, un potentiel élevé semble favoriser l'activité des bactéries électrogènes, en encourageant la voie métabolique qui permet une croissance rapide et un gain d'énergie élevé pour les cellules bactériennes.

⁷ Electrogènes : bactéries capables d'échanger des électrons avec des surfaces solides

Si l'on souhaite plutôt restreindre la recherche aux biofilms potentiellement les plus efficaces, on choisit un potentiel relativement bas.

Comme décrit plus haut (Cf paragraphe III.1.1.), Torres *et al.* (2009) ont montré que dans un même réacteur, lorsque les micro-organismes sont en compétition pour la consommation d'acétate, les biofilms formés sous polarisation négative par rapport à l'électrode standard à hydrogène (ESH) permettaient d'obtenir de meilleures performances (Torres *et al.* 2009). Yi *et al.* (2009) ont aussi montré qu'imposer un potentiel très négatif (-0,2 V/Ag/AgCl) pendant une longue période permet l'évolution d'une culture pure de *G. Sulfurreducens* vers une souche plus efficace avec une densité de courant produite plus de 5 fois supérieure à celle de la souche de départ. Les auteurs montrent ainsi que le potentiel négatif agit comme une pression sélective vers l'évolution d'une souche plus efficace (Yi *et al.* 2009). Aelterman *et al.* (2008) ont montré qu'un potentiel bas (-0,2 V/Ag/AgCl) malgré une plus faible quantité de biomasse produite permettait d'obtenir des puissances maximales beaucoup plus rapidement que des potentiels élevés (0 V et 0,4 V) (Aelterman *et al.* 2008).

Cet ensemble d'expériences montre que des potentiels différents peuvent être appropriés pour optimiser les performances des biofilms EA. Nous avons par conséquent choisi de faire évoluer le potentiel imposé au cours de nos expériences. Avec comme référence tout au long des expériences une électrode au calomel saturé (ECS), nous commencerons tout d'abord par imposer un potentiel positif pour favoriser la croissance du biofilm sur l'électrode (0,4 V par exemple) puis différents potentiels négatifs seront essayés en vue de diminuer l'énergie disponible pour la croissance et l'entretien des bactéries et donc d'obtenir des biofilms plus efficaces d'un point de vue électrochimique.

III.2. Résultats

III.2.1. Conditions opératoires

Pour le criblage des environnements papetiers sélectionnés et présentés dans le chapitre précédent, nous avons choisi de diluer l'effluent de moitié 50/50 (V/V) avec un milieu synthétique simplifié inspiré du milieu de culture de *Geobacter* (Cf paragraphe II.1.4.). Ce genre microbien est reporté dans la littérature comme souche par excellence pour les PACMs avec l'acétate comme substrat. Elle est capable de réaliser l'oxydation complète de l'acétate en utilisant l'électrode comme seul accepteur d'électrons (Rismani-Yazdi *et al.* 2007). Ce milieu simplifié contient essentiellement des nutriments azotés et phosphorés pour pallier les déficits des effluents papetiers et favoriser une meilleure croissance des micro-organismes. De plus, les vitamines et sels minéraux présents dans le milieu initial de référence ont été éliminés car des expériences préliminaires n'ont pas montré leur influence sur l'activité catalytique des biofilms.

Toutes les expériences de criblage sont réalisées en mode batch. De l'acétate (5 mM) a été ajouté au milieu à partir d'une solution concentrée (0,5 M). Il constitue une source de matière carbonée oxydable et facilement assimilable par les micro-organismes. Il permet de pallier l'épuisement des sources de carbone de l'effluent au cours du développement des biofilms électro-actifs et de maintenir des conditions de milieu plus stables que par l'ajout d'un effluent industriel de nature variable.

L'électrode de travail que nous utilisons dans cette section est une plaque de graphite de 10 cm² pour un réacteur en verre d'une contenance de 500 mL. Ce choix d'une petite surface d'électrode pour un volume assez important d'effluent à traiter a été fait pour obtenir des conditions électrochimiques rigoureuses. D'une part, une petite taille d'électrode devrait favoriser l'uniformité des conditions électrochimiques sur la surface et donc l'uniformité du développement du biofilm. D'autre part, en mode batch, l'épuisement du substrat dans le réacteur sera plus lent avec une petite électrode, on peut donc espérer former des biofilms plus matures.

Un barbotage d'azote est réalisé dans les réacteurs pour éliminer l'oxygène dans le milieu. Il a été effectué pendant 10 minutes en début d'expérience ou en continu tout au long de l'expérience lorsque cela sera indiqué.

La formation du biofilm se fait par chronoampérométrie et des mesures de voltammétrie cyclique sont réalisées ponctuellement au cours de l'expérience. Tous les potentiels sont indiqués dans le manuscrit par rapport à l'électrode au calomel saturée utilisée comme référence (ECS) dans toutes les expériences.

III.2.2. Etude des échantillons d'une lagune aérobie du Site N°1

III.2.2.1. Référencement des biofilms formés à partir des échantillons de lagune

Tous les biofilms EA formés à partir des échantillons prélevés sur le site N°1 sont référencés dans l'organigramme présenté sur la *Figure 36*, ainsi que les repiquages réalisés à partir de ces biofilms. Les repiquages consistent à récupérer des électrodes des biofilms EA préalablement formés et de les utiliser pour inoculer de nouveaux réacteurs.

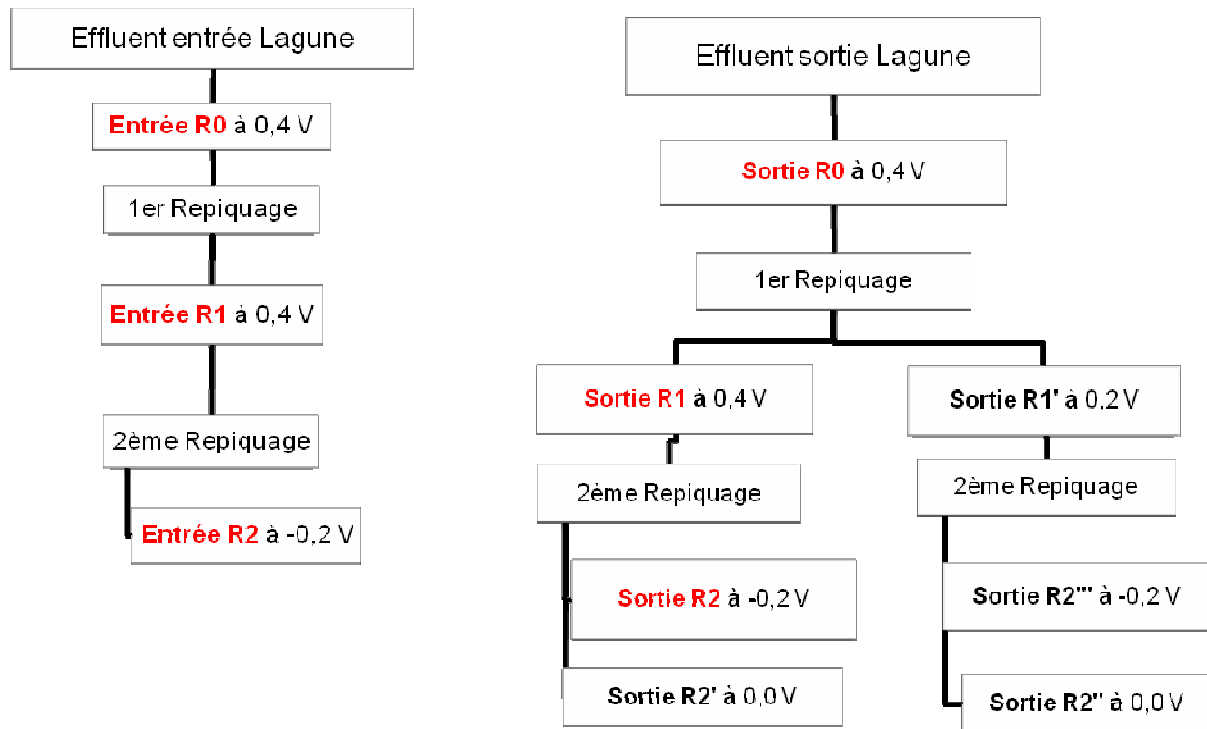


Figure 36: Référencement des biofilms électro-actifs formés à différents potentiels imposés à partir des échantillons de la Lagune (Site N°1). Biofilms Rx: biofilm formé après x repiquages.

III.2.2.2. Article N°1

L'article qui suit a été soumis pour publication dans «Biochemical Engineering journal». On retrouve dans cet article les biofilms dont les noms sont colorés dans le tableau de référencement de la *Figure 36*.

Cet article présente que pour un même site papetier, des biofilms EA de performances très différentes sont obtenus en fonction du lieu de prélèvement des effluents dans le processus de traitement. Ce questionnement a été rarement discuté dans la bibliographie et pourtant il pourrait être essentiel quant au positionnement d'une PACM dans un processus de traitement d'effluent pour obtenir les performances optimales. Ainsi, des effluents et biofilms naturels collectés en entrée et sortie de la Lagune d'un même site papetier ont été utilisés pour former des bioanodes dans les mêmes conditions opératoires sous potentiel imposé. Les biofilms primaires sont formés à potentiel élevé (+0,4 V) puis repiqués progressivement à plus faible potentiel jusqu'à -0,4 V pour le biofilm tertiaire. La composition des populations microbiennes dans les différents biofilms EA obtenus est présentée et l'évolution spontanée du pH vers des valeurs basiques discutée.

Sampling location of the inoculum is crucial in designing anodes for microbial fuel cells

STEPHANIE F. KETEP^{†*}, ALAIN BERGEL[‡], MARIE BERTRAND[§], WAF A ACHOUAK[§], ERIC FOUREST[†]

[†]*Centre Technique du Papier, BP 251, 38044 Grenoble Cedex 9, France*

[‡]*Laboratoire de Génie Chimique (LGC), CNRS-Université de Toulouse (INPT), BP84234, 31432 Toulouse, France*

[§]*Laboratoire d'Ecologie Microbienne de la Rhizosphère et d'Environnements Extrêmes (LEMIRE), UMR 6191, CNRS-CEA-Aix-Marseille Univ. CEA/DSV/iBEB, CEA Cadarache, 13108 Saint Paul Lez Durance, France*

*Corresponding author: phone number: (+33)476154087; Fax number: (+33)476154016. E-mail address: Stephanie.Ketep@webCTP.com

Abstract

Microbial anodes were formed under applied potential of +0.4 V/SCE in Kraft pulp mill effluents with microbial inoculums that were collected at the inlet and outlet of the aerated lagoon of the treatment plant. The anodic biofilms formed with the outlet effluent contained *Geobacter* and *Desulfuromonas* sp. and provided current densities of 2.2 A/m² for the primary biofilm, 5.1 A/m² after re-suspension and up to 6 A/m² for the tertiary biofilms, which were formed at lower potential of -0.4 V/SCE. The anodic biofilms formed with the inlet effluent contained only *Desulfuromonas* sp. as dominant species and always gave lower currents in identical conditions.

Cyclic voltammetry corroborated DGGE analysis. It was possible here to distinguish the different capabilities of the two inoculum sources to form microbial anodes thanks a minimal supplementation in nutrients was added with no significant buffer effect and re-suspension were performed in filtered effluent.

Keywords: Pulp mill effluent, Waste-water treatment, Biofilms, Batch process, Biocatalysis, Microbial fuel cell (MFC)

1. Introduction

Microbial fuel cells (MFCs) are presented as a promising technology for the treatment of wastewater with concomitant generation of electrical current [1-4]. The microbial-catalyzed oxidation of soluble organic matter at the anode can result in the complete degradation of organic molecules [5], without the need for strong aeration that is required in conventional aerobic treatment. Several types of biodegradable organic matters contained in wastewaters [6] and various effluents [7] have been

successfully treated in MFCs at laboratory scale. When the production of electricity is no longer an objective, the efficiency of the wastewater treatment can be optimised by short-circuiting the anode and the cathode and simplifying the MFC design into a so-called electrochemical snorkel [8]. It can be suspected that the capacity of an effluent to form an efficient microbial anode may drastically vary depending on the location along the processing line. For instance, a recent article has demonstrated very different MFC performance depending on the sampling sites from the same freshwater lake [9]. Similarly, it can be thought that the capacity of a given effluent to form a microbial anode may significantly vary from the entrance to the outlet of a treatment plant. If it was demonstrated the performance of a MFC in a treatment process should depend on its position in the process stream. Such questioning has been rarely addressed yet [10].

The purpose of this work was to assess the suitability of an effluent to form microbial anodes depending on its position at the entrance or at the outlet of an aerated lagoon. An effluent from a Kraft pulp mill was chosen, because of the high interest of the pulp and paper industries to find new efficient ways to treat their effluent. In these industries, decrease in water usage has resulted in highly concentrated process effluents, which require expensive downstream treatments. To date, not many MFC studies have targeted pulp mill effluents. Limitations in power output and treatment efficiency due to low conductivity have been identified with effluents from primary clarifier of pulp and paper mill [11]: 144 mW/m² was obtained with un-amended wastewater, which rose to 672 mW/m² with addition of 100 mM phosphate buffer. Two *Clostridium* strains have been tested to degrade cellulose and treat wastewater from paper industry, but additions of glucose (substrate) and methylene blue (mediator) were necessary [12].

In the present work the effluent samples were mixed (250:200 mL) with a synthetic medium that contained only low amounts of ammonium and phosphate. Addition of ammonium, phosphate and carbonate is commonly done at industrial scale to enhance the treatment of effluents that present nutrient deficiencies. Here the concentrations of the added compounds were minimal to prevent from too large enrichment and particularly from an artificial buffering effect. Acetate is frequently observed in these effluents, provided by hydrolysis and acidogenesis of polysaccharides. The two effluent samples were thus checked in conditions that were not far from those that could be sustained in actual treatment process. Nitrogen was bubbled into the reactor only for a few minutes at the beginning of the experiments to remove dissolved oxygen. There was then no nitrogen bubbling during the experiments in order not to disturb the natural CO₂ release. Continuous nitrogen bubbling would force CO₂ extraction and could affect the pH of the solutions. Using such operating conditions, it was expected to check the effluent samples under close-to-the-field conditions not too far from those that could be sustained in an actual MFC.

A three-electrode system was used to control the polarisation potential with respect to a reference electrode. Polarisation potential was fixed at +0.4V (vs. SCE) because a similar high value has been found optimal to form microbial anodes from wild source of inoculum [13]. In marine sediments [14], microbial anodes formed at high polarization potential 0.618 V (vs. Ag/AgCl) have also produced higher currents than those formed at lower potential -0.058V (vs. Ag/AgCl). As already observed by Torres *et al* 2009 [15], we postulated that high potential would result in larger biodiversity of the microbial communities growing on the anode surface, giving best chances to catch and grow the suitable anode respiring bacteria. Moreover, it would be easy to start an industrial MFC at high potential by simply short-circuiting anode and cathode.

2. Material and methods

2.1. Reactors and electrodes.

Reactors were closed glass electrochemical cells containing 450 mL of solution with 200 mL headspace (total volume 650 mL). Holes in the reactor lid allowed inserting electrodes and a sintered end glass tube for nitrogen bubbling. Working electrodes were 2 cm x 5 cm x 0.5 cm³ graphite plates (Goodfellow), screwed to a titanium rod (12 cm length, 2 mm diameter, Alfa Aesar) for electrical contact. Before use, graphite electrodes were cleaned by 1 hour immersion in 1M HCl and 1 hour in 1M NaOH, followed by rinsing with distilled water for 20 minutes. The 10 cm² Pt/Ir grids (90% Platinum-10% Iridium, 0.12 mm diameter wires, Heraeus) cleaned by flame heat and were used as auxiliary electrodes and saturated calomel electrodes (SCE, Copenhagen, Radiometer) were used as reference (potential +0.24 V vs. SHE).

2.2. Biofilm formation and electrochemical recording.

Inoculate came from an aerated lagoon treating the effluents of a French Kraft pulp mill. The inlet effluent sample was completed with the biofilm collected from the feeding pipe surface to get the most possible diverse microbial community representative of this effluent. With the same objective, the outlet effluent sample was completed with sediments from the settling lagoon. To form primary biofilms the electrochemical reactors were filled with 250 mL of effluent sample mixed with 200 mL of synthetic medium (23.8 mM NaHCO₃, 28 mM NH₄Cl, 5 mM NaH₂PO₄, 10 mM KCl, 5 mM sodium acetate, pH adjusted to 7.0 with HCl 1M). The solutions were sparged with nitrogen for 10 minutes at the beginning of each experiment to remove oxygen and the reactors were maintained at 25°C.

Primary and secondary biofilms were formed under constant potential chronoamperometry of +0.4 V (vs. SCE). Tertiary biofilms were formed under constant potential chronoamperometry in the range -0.2 to -0.4 V (vs. SCE). Potential was imposed in two three-electrode reactors in parallel, each containing a different effluent sample, using a multi-channel potentiostat (VMP3, software EC-Lab, BioLogic SA). Current was recorded every 900 s and current densities (A/m²) were expressed with respect to the anode surface area. Sodium acetate (5 mM) was added when current decreased to zero. Periodically, chronoamperometry was interrupted to record cyclic voltammetry (CV) curves at 10 mV/s scan rate between -0.6 and 0.6 V (vs. SCE). CV measurements began at the polarization potential of the CA to limit any electrochemical disruption on the biofilms. At the end of each polarisation, clean electrodes were placed in the reactor and CVs were recorded in the same conditions with the clean electrodes after 10 minute nitrogen bubbling. Three successive CV scans were systematically recorded and the second and third scans were always perfectly reproducible. Only the second scans were reported here.

Secondary and tertiary biofilms were formed by re-inoculating the primary and secondary biofilms, respectively. The biofilms were detached from the graphite electrode by ultrasonication in 30 mL physiological Ringer solution. The microbial suspension obtained (5 mL) was used as inoculum in new electrochemical reactors containing 200 mL synthetic medium and 250 mL effluent sample. The effluent samples were filtered under 0.2 µm to get rid of planktonic bacteria that would otherwise

interfere with the electro active microbial inoculum. pH was measured regularly at the beginning and at the end of each acetate cycle.

2.3. Microbial community analysis.

The microbial populations were analysed using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE). Each biofilm was vigorously scraped from the electrode surface with a sterile glass spreader in a sterile medium (M9). The resulting suspensions were stored at -80°C after addition of 5% DMSO. Bacterial communities were targeted by amplification of 16S using a pair of universal primers (fd1 and rd1) corresponding to positions 8±27 and 1524±1540. The resulting PCR fragment was amplified using a nested PCR approach by using primers 329f-GC and 919r generating 590 bp fragments (Haichar *et al.* 2008). DGGE was implemented with a first PCR amplification followed by nested amplification using primers yielding shorter sequences (590 bp) because this strategy allowed even poorly represented bacterial populations to be accessed. The so-called nested PCR allowed a significant amount of DNA to be produced from any member of the community that had a target gene. The PCR-amplified DNA was placed at one end of an electrophoresis gel that had a gradient of DNA denaturant (urea + formamide). Certain bands were excised for new amplifications by PCR and PCR products were identified by subsequent sequencing (Haichar *et al.* 2008).

2.4. Calculations

Coulombic efficiency

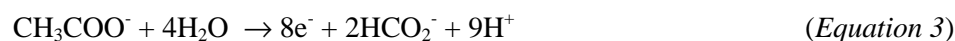
Coulombic efficiencies were calculated for the current peaks that corresponded to each successive acetate addition during the polarisation experiments (chronoamperometry). Coulombic efficiency (CE) is defined as the charge transferred to the electrode (C_{el}) to the total charge available in substrate (C_t). It was calculated as:

$$CE(\%) = \frac{C_{el}}{C_t} \times 100 \quad (\text{Equation 1})$$

The charge transferred to the electrode was calculated by integrating the current peaks that corresponded to given acetate addition:

$$C_{el} = \int_0^t i dt \quad (\text{Equation 2})$$

and the total charge that can be provided by the transformation of acetate to carbon dioxide:



was:

$$C_t = \frac{nFCV}{M_i} \quad (\text{Equation 4})$$

Where M_i is the molar mass of acetate (59g/mol), $n = 8$ is number of electrons exchanged during the reaction, F the Faraday constant (96485 C/mol), C the acetate concentration (0.3 g/L), V the volume of the medium (0.5 L). The final error in charge estimation was estimated to $\pm 1\%$.

3. Results and discussion

3.1. Formation of primary electroactive (EA) biofilms at +0.4 V/SCE.

The lagoon inlet and outlet samples mixed with minimal synthetic medium (250:200 mL) were put in two electrochemical reactors. Electrodes were polarized at +0.4 V/SCE. The current started to increase after an initial lag period of around 2 days (Figure 1). This initial lag phase corresponded to the time required for electroactive biofilms to form. Current densities reached similar maximum values at days 5 and 6 with the outlet and inlet samples respectively, and then decreased because of the acetate depletion. Coulombic efficiencies related to these first current peaks were around 8 % for both samples. The biofilm performance progressively increased with successive additions of 5 mM acetate. The maximum current densities depended strongly on the origin of the inoculum: currents were more than three times higher with outlet sample (2.2 A/m² at day 18) than with inlet sample (0.6 A/m² at day 19) and similar ranking was observed with coulombic efficiencies.

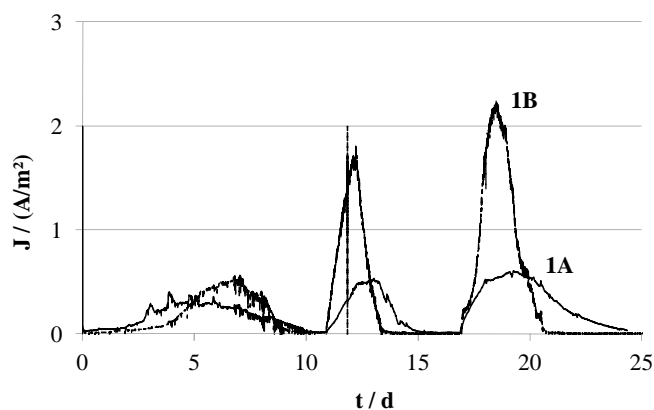


Figure 1 : Current density as a function of time for primary biofilms formed on smooth graphite electrodes, applied potential +0.4 V/SCE, successive addition of 5 mM acetate. **1A:** effluent from the lagoon inlet with successive current density peaks of 0.3, 0.5 and 0.6 A/m²; the corresponding coulombic efficiencies were 8, 5 and 11 %. **1B:** effluent from the lagoon outlet with current density peaks of 0.5, 1.7 and 2.2 A/m²; the corresponding coulombic efficiencies were 8, 10 and 17 %.

On day 25, cyclic voltammetry (CV) curves were recorded at 10 mV/s in condition of acetate depletion (Figure 2, curves 1A and 1B). For comparison, similar CV curves were recorded on clean electrodes that were introduced into the reactor at the end of the experiment (Figure 2).

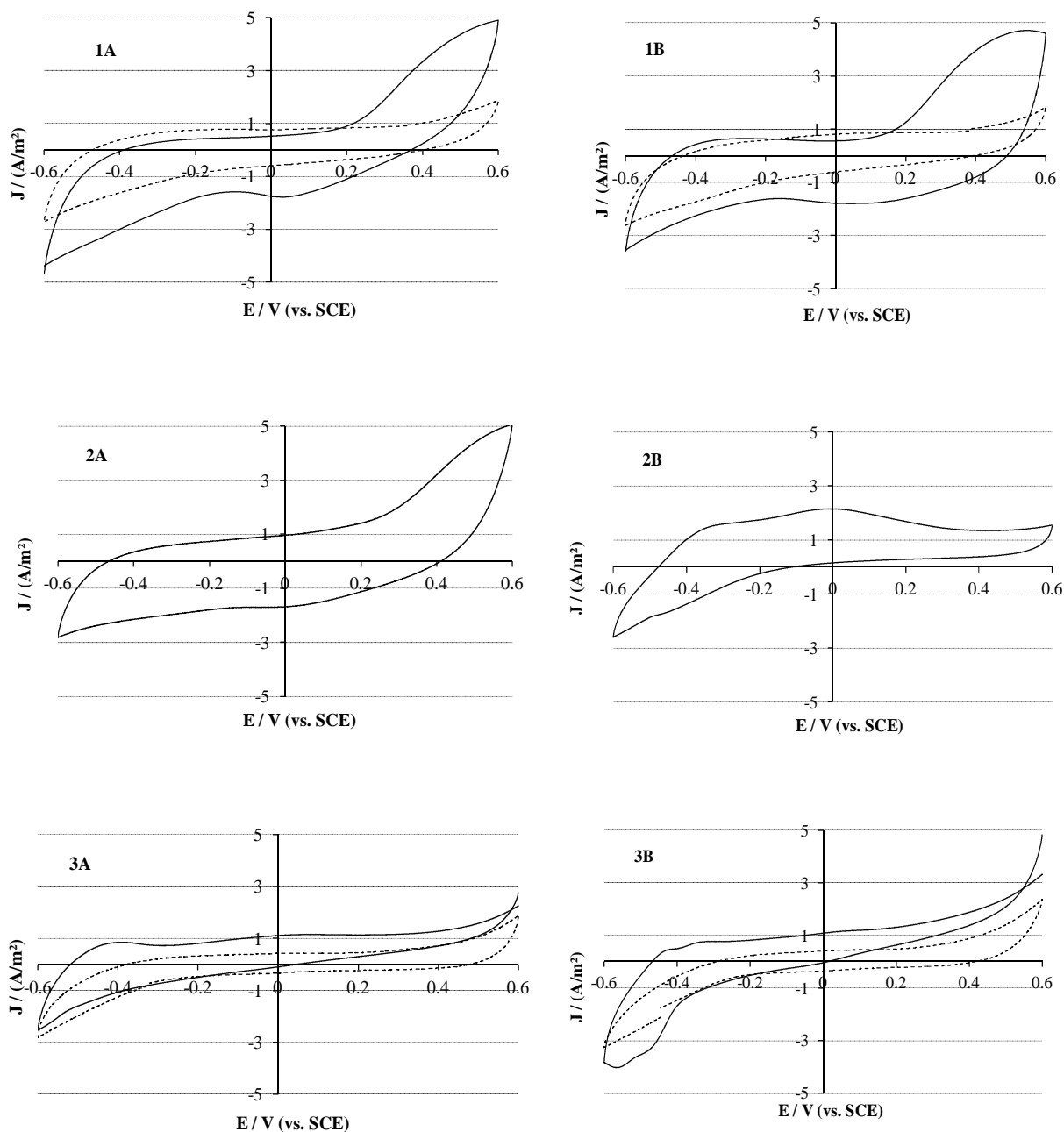


Figure 2: Cyclic voltammetry (10 mV/s) recorded at the end of chronoamperometries. (---) Clean electrode, (—) Colonized electrode. **1A:** primary biofilms from lagoon inlet, day 25 of Figure 1; **1B:** primary biofilms from lagoon outlet, day 25 of Figure 1; **2A:** secondary biofilms from lagoon inlet, day 30 of Figure 4; **2B:** secondary biofilms from lagoon outlet, day 30 of Figure 4. **3A:** tertiary biofilms from lagoon inlet, day 25 of Figure 5. **3B:** tertiary biofilms from lagoon outlet, day 25 of Figure 5.

Significant capacitive currents around 1 A/m² were observed with both microbial anodes and similar capacitive currents (around one-half) were obtained with the clean electrodes. These currents were due to an increase of the interface capacitance because of adsorption of compounds from the bulk.

No faradic signal was observed with the clean electrodes, which indicated that the redox peaks observed with the microbial anodes were due to the presence of electroactive biofilms. A great oxidation peak started from potential around +0.2 V (vs. SCE) with each biofilm. It can not be confused with a catalytic wave that would be due to acetate oxidation because the current under CA at +0.4 V/SCE, just before recording the CV curve, was close to zero (less than 0.05 A/m², Figure 1). As already reported, so-called non-turnover CV curves recorded after acetate depletion are linked only to redox compounds contained in the biofilm [17, 18]. The oxidation peak consequently corresponded to the oxidation of compounds that were reduced during the backward scan. This is confirmed by the significant reduction currents that were recorded during the reduction scan, with low reduction peaks around 0.02 V and +0.1 V/SCE for the inlet and outlet inoculum respectively.

As expected, a high bacterial diversity was observed on the primary biofilms analysed by DGGE (Figure 3A). Several microbial genera identified here, such as *Clostridium*, *Desulfuromonas*, *Pseudomonas*, *Geobacter* have already been described as anode respiring bacteria (ARB) [16], while others, such as *Hydrogenophaga*, *Dechloromonas*, *Fluvicola*, *Fusibacter*, *Aquimonas*, *Flavobacter* or *Cryomorphaceae* have not yet been described as electroactive. It has been reported that forming biofilms at high potentials results in greater microbial diversity, while lower potentials select only the most efficient ARB [17,19] that can achieve electron transfer by direct contact with the electrode surface or through a conductive matrix, such as *Geobacter* [20,21] or *Desulfuromonas* sp.[22]. In contrast, biofilms formed at high potentials are believed to be predominantly formed from ARB that produce electron shuttles, such as *Pseudomonas* and *Clostridium* [23] and possibly non-electroactive species. Here, both the inlet and outlet sample confirmed a microbial diversity made up of ARB and non-electroactive species. This diversity explains that no clear redox phenomena emerged from the CV curves, except a large oxidation peak at high potential values, which can be due to several redox compounds entrapped in the biofilm. Both biofilms contained *Clostridium* sp. known to produce extracellular redox mediators. On the other hand, the outlet inoculum led to biofilms richer in *Geobacter* and *Desulfuromonas* than the inlet inoculum, which explains the higher current densities provided.

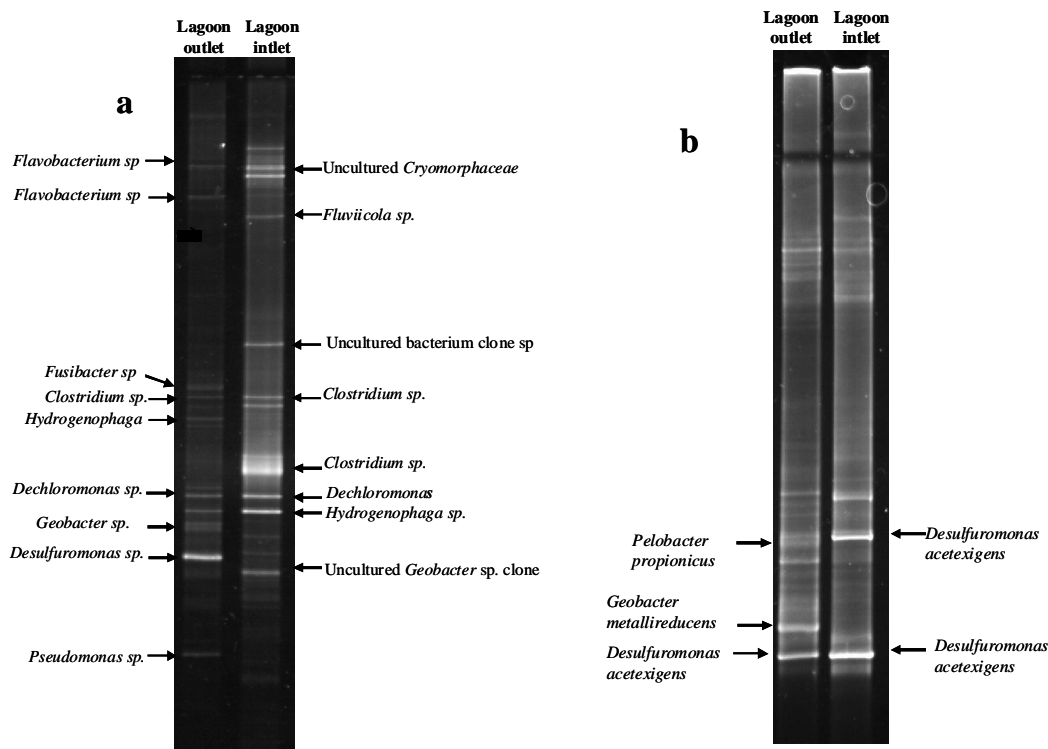


Figure 3: DGGE profiles of the biofilm grown on graphite electrodes from lagoon inlet and lagoon outlet samples. a: primary biofilms (end of Figure 1); b: tertiary biofilms (end of Figure 5).

3.2. Secondary EA biofilms formed at the same imposed potential +0.4 V/SCE.

Primary biofilms were scraped from the electrodes and used as inocula in new reactors under the same experimental conditions and the same applied potential of +0.4 V/SCE (Figure 4).

Both secondary biofilms gave improved electrochemical performance with respect to the primary biofilms: the initial lag period and the time required to reach maximum currents were reduced; the maximum current densities increased from 0.6 ± 0.05 to 1.6 ± 0.05 A/m² with inlet inoculum, and from 2.2 ± 0.05 A/m² to 5.1 ± 0.05 A/m² with outlet inoculum; maximum coulombic efficiencies rose from 11 ± 1 % to 14 ± 1 % with inlet and from 17 ± 1 % to 36 ± 1 % with outlet inocula (Figure 4). Similarly to the primary biofilms, the secondary biofilms coming from the outlet sample still led to currents around 3-fold higher than inlet sample. The increased performance obtained here by re-suspending an already electroactive biofilm was consistent with reported studies. It has been shown that inoculating a reactor with a biofilm collected from a running MFC [24-28] or with the effluent from a previous reactor [29] improved the electrochemical performance of the new biofilms with respect to the biofilms that were used as inoculum. Similarly, clean electrodes inserted in a running MFC have been shown to benefit from the presence of the already formed microbial anode [26, 30]. It must also be noted that after 10 days of substrate starving, biofilms recovered their performance immediately after acetate addition, reflecting their robustness and their ability to be implemented in real conditions, in which the quality of feeding may dramatically vary with time.

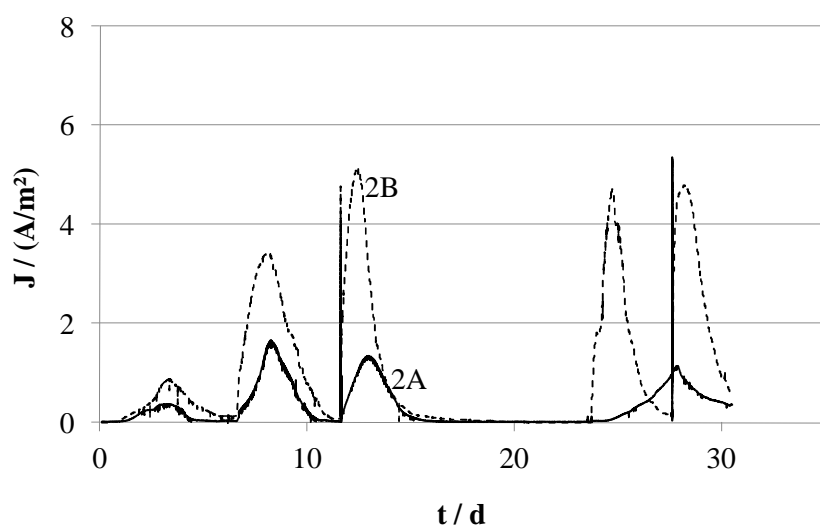


Figure 4: Current density as a function of time for the secondary biofilms formed on smooth graphite electrodes at +0.4 V/SCE. The primary biofilms were used as inocula in new reactors under the same conditions, but with filtered effluents

2A: effluent from the lagoon inlet with current density peaks of 0.4, 1.6, 1.4 and 1.1 A/m² and respective coulombic efficiencies of 4, 12, 13 and 14 %.

2B: effluent from the lagoon outlet with current density peaks of 0.9, 3.5, 5.1, 4.6, and 4.8 A/m² and respective coulombic efficiencies of 10, 35, 36, 30 and 35 %.

CVs performed at the end of polarization (Figure 2, curves 2A, 2B) were similar to the CVs recorded with the primary biofilm for the inlet inoculum. In contrast, the biofilm formed from outlet inoculum exhibited significant modifications with two barely-defined redox couples that appeared at negative potentials and may indicate the emergence of predominant electroactive species in the biofilm. The CV curves consequently detected different behaviours depending on the inoculum sample: re-inoculation did not affect the electrochemical characteristics of the biofilm formed from the inlet inoculum, while it brought up low potential electron transfer system in the biofilm formed from the outlet inoculum.

3.3. Tertiary EA biofilms formed at lower potential.

Torres *et al.* [19] have postulated that the electroactive biofilms formed at high potential may contain non-electroactive bacteria that form a poorly conductive layer and thus hinder the development of directly-connecting bacteria. In order to avoid this possible effect when investigating the effect of the applied potential we chose to disrupt the secondary biofilms and investigated the effect of lowering the potential on tertiary biofilms. The secondary biofilms were collected and used as inocula in new electrochemical reactors under an applied potential of -0.2 V/SCE (Figure 5).

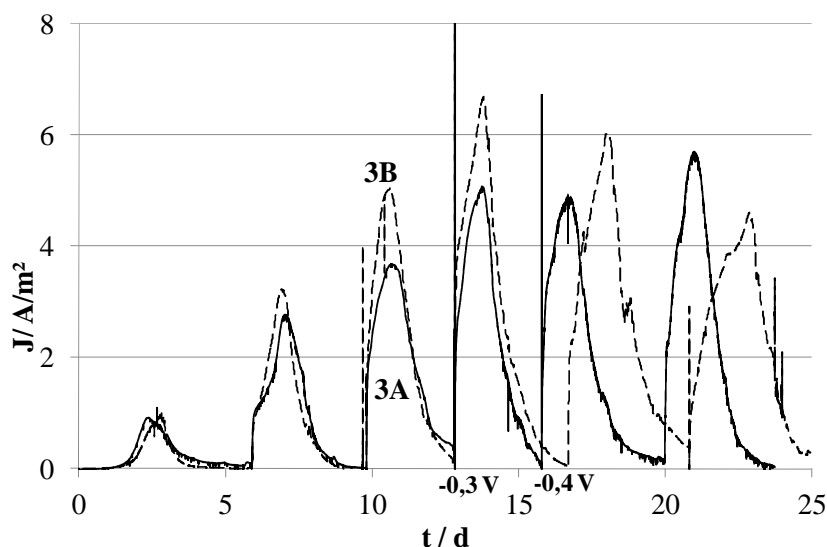


Figure 5 : Current density as a function of time for tertiary biofilms from the lagoon inlet and outlet samples with graphite electrodes under applied potential of -0.2 V, -0.3 V and -0.4 V/SCE. Potential values on the X-axis represent changes during experiments.

3A: effluent from the lagoon inlet with current density peaks of 0.9, 2.7, 3.7, 5.0, 4.8 and 5.6 A/m² and respective coulombic efficiencies of 6, 18, 27, 33, 36 and 39 %.

3B: effluent from the lagoon outlet with current density peaks of 0.9, 3.2, 5.0, 6.7, 7.0, 4.6 A/m² and respective coulombic efficiencies of 4, 18, 32, 43, 50 and 44 %.

The effect of the lower polarization potential was drastically different depending on the inoculum. For the lagoon outlet inoculum, the tertiary biofilm showed current density similar to the secondary biofilm. In contrast, the inlet inoculum led to current and coulombic efficiency (up to 40%, Figure 5) improved by a factor of 3 with respect to secondary biofilm. On day 12, the potential of the two electrodes was changed to -0.3 V/SCE and finally to -0.4 V/SCE on day 16. Performance increased slightly for both biofilms when changing the potential from -0.2 V to -0.3 V and remained stable at -0.4 V.

Non-turnover cyclic voltammetry curves were recorded at the end of the experiments (Figures 3A and 3B). Capacitive currents were of the same order of magnitude on clean electrodes and microbial anodes, around 0.5 A/m². The oxidation peak that had been observed at high potentials on the primary biofilms was no longer visible, while redox systems appeared at low potentials for both biofilms. Two redox systems were visible with the biofilm formed from outlet inoculum, with midpoint potentials around -0.40 and -0.50 V/SCE. Only one hardly-defined redox system was observed around -0.45 V/SCE with the inlet inoculum. These potential values are close to those found for *Geobacter sulfurreducens* biofilms in acetate medium with inflection point around -0.15 V/SHE (-0.39 V/SCE) [31]. Analysis of the microbial composition of the tertiary biofilm demonstrated the selection of predominant bacterial species (Figure 3b). *Geobacter metallireducens*, *Pelobacter propionicus* and *Desulfuromonas acetexigens* were identified in the biofilm formed from the outlet sample, while only *Desulfuromonas acetexigens* was identified in the biofilm developed from the inlet sample. *Pelobacter* species have often been detected in various electroactive biofilms [32,33] but they seem not to develop a capacity for electron transfer with electrodes [34]. Nevertheless, considering that the presence of both species has often been observed in wild electroactive biofilms, a possible synergetic effect cannot

be ruled out. *Desulfuromonas acetexigens* is an anaerobic gram negative bacterium that exclusively uses acetate as energy and carbon sources [35]. It has not been identified as anode-respiring bacteria yet, but it may be assumed that it has electroactive properties because it was found here in high proportions in both tertiary biofilms and it was the unique predominant species identified in the biofilm formed from the inlet sample. It should be noted that the nested DGGE procedure used here allowed even poorly represented bacterial populations to be accessed. It can consequently be soundly concluded that *Desulfuromonas acetexigens* was strongly dominant in the tertiary biofilm formed from the inlet sample. This assumption was consistent with the CV curves (Figure 2, curves 3A, 3B). The outlet biofilm presented two redox peaks, which may correspond to the two species *Geobacter metallireducens* and *Desulfuromonas acetexigens* identified by DGGE, while the inlet biofilm only exhibited one current peak, consistently to the sole predominant species *Desulfuromonas acetexigens* detected by DGGE. Nevertheless, isolation and electrochemical testing of the strain obviously remain necessary to firmly confirm the electroactivity of the strain *Desulfuromonas acetexigens*. It must be finally noticed that the current densities obtained here might appear relatively modest with respect to best values reported in the literature. To our knowledge, currently high current densities are in the range 10 to 15 A/m². The values reported in the literature have generally been obtained with optimal electrodes, which offer large active surface areas with respect to their projected surface area, such as carbon cloth, carbon brush [36] or carbon felts [37]. For instance the highest current density reported so far of 30.8 A/m² [37] was reached by adapting the porosity of a three-dimensional electrode. On the other hand, up to 66 A/m² have been reached but in very particular laboratory conditions [38]. Here, in contrast, flat non-porous graphite electrodes were used. The active surface areas were identical to the projected surface area. Actually, this choice was made to be able to make further easy comparisons between different sources of inoculum, but the smooth surface state did obviously not favour large current density. On such electrode surfaces, the current densities obtained of the order of 6 A/m² represent very promising results.

3.5. Comparison of the electroactive capacities of the inlet and outlet samples and practical consequences.

The lagoon inlet and outlet samples showed very different capability to form electroactive biofilms. The outlet inoculum led to efficient anodes since the first inoculation at +0.4 V/SCE (2.2 A/m²). The first re-inoculation (secondary biofilm) was sufficient to increase the current to 5.1 A/m² and CV exhibited emergence of a low-potential redox system. Lowering the potential (tertiary biofilm) revealed a remarkable stability of the anode: changing the applied potential from +0.4 V to -0.2 V/SCE had no significant effect on the current. Current density up to 6 A/m² was reached at -0.4 V/SCE. It can be concluded that the diverse microbial population that made up the primary biofilm was effective enough and stronger selection by reconstructing the biofilm at lower potential did not significantly improve its electrochemical performance.

In contrast, the inlet sample always led to lower current at +0.4 V/SCE (0.6 and 1.6 A/m² for the primary and secondary biofilm, respectively). Lowering the potential to -0.2 V/SCE was needed to increase the current density to around 5 A/m². The CV curve confirmed the presence of a low-potential redox system. In this case, the primary biofilm did not contain the directly-connecting anode-respiring bacteria and lowering the potential was necessary to select more efficient electroactive species.

To our knowledge this was the first time that such differences were evidenced due to the different sampling locations of the same effluent. The choice of the unusual operating conditions that was done here was consequently appropriate to compare the intrinsic capability of a given sample to form microbial anodes. The minimally enriched medium used here contained only low amounts of ammonium, phosphate and carbonate. Similar supplementation is commonly done in conventional treatment plants to overcome the nutrient deficiency of the effluent. The larger part of the solution was the raw or filtered effluent itself (250:200).

The outlet effluent exhibited much better possibility to form efficient anodes than the inlet effluent. This leads to preliminary engineering guidelines to implant a MFC into the treatment plant. A MFC operating in plug flow mode fed with the inlet effluent would have poor efficiency, because the entrance part of the reactor would not be able to develop an efficient anode. In such a case, using a continuously stirred MFC would be a suitable solution. Nevertheless, if a plug-flow mode must be chosen for other reasons, a re-circulation loop would be absolutely necessary to feed the entrance with a part of the outlet effluent, in order to benefit of the capacity of the outlet effluent to form efficient electroactive biofilms. Nevertheless, a recirculation loop would increase the pumping cost. Another solution may be to keep a smaller volume lagoon upstream to develop the suitable microbial community, setting the plug-flow MFC downstream. At least, the results described here put in light that the same effluent can have different capacities to form electroactive biofilms depending on the location in the treatment stream. Integrating a MFC into an effluent treatment plant must consequently start by testing the effluent at different locations under close-to-the-field operating conditions that do not mask the intrinsic properties of the effluent samples.

3.6. pH evolution during EA biofilm development.

Most studies that have reported current-potential characteristics of microbial anodes have been performed in well buffered conditions around neutral pH, because it is often agreed that this is the optimal pH for bacterial growth [39, 40]. Here, measuring the pH around every 3 days showed a continuous increase of pH from 7.5 at the beginning to around 9.0 or slightly above, at the end of each experiment.

The formal potential (E^{0}_{acetate}) of acetate oxidation:



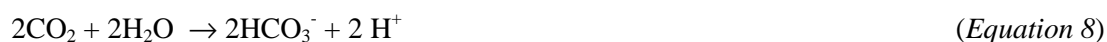
$$E(V) = E^{0}_{\text{acetate}} - \frac{RT}{nF} \ln \frac{[\text{CH}_3\text{COO}^-]}{[\text{pCO}_2]^2 [\text{H}^+]^7} \quad (\text{Equation 6})$$

$$E^{0}_{\text{acetate}} = E^{0}_{\text{acetate}} - 2.3 \frac{7.RT}{nF} \text{pH} \quad (\text{Equation 7})$$

is -0.524 V/SCE at pH 7.0. Here, at pH 9.0, $E^{0'}$ was -0.63 V/SCE. It should be noticed that the maximum current was maintained during polarisations to potentials as low as -0.40 V/SCE. The anode respiring bacteria generate their metabolic energy by transporting electrons from the substrate at low potential to the anode that serves as final electron acceptor. The higher is the difference between the formal potential of the substrate and the anode potential, the higher the possible metabolic gain for the bacteria [41]. The alkaline pH drift, which decreased $E^{0'}$ acetate from -0.52 to -0.63 V/ SCE increased the energy that can be used by the cells. At pH 7.0, the applied potential of -0.4 V/SCE was only 120 mV higher than the formal potential of the substrate to be oxidized. The cells could hardly extract energy from acetate oxidation by transferring the produced electrons to the anode that had a only 120mV-higher potential. In contrast, at pH 9.0, the applied potential of -0.4 V corresponded to a potential drop of 230 mV, which was enough for the cell develop an efficient energetic pathway. The higher difference of potentials at pH 9.0 explains that the biofilms were able to remain efficient at potentials as low as -0.4 V/SCE.

The pH increase of the bulk can also increase the electrochemical performance of the biofilm by enhancing proton extraction from the biofilm. The oxidation of acetate (Equation 1) results in local acidification of the biofilm, which inhibits the metabolic reactions and, in consequence, decreases the current produced. If the proton transfer from the biofilm to the bulk is not fast enough, the biofilm acidification limits the current produced [42]. Here, the alkaline pH of the bulk hampered the local acidification of the biofilm, because it would require very large pH gradient between the biofilm and the bulk. The alkaline pH that the effluent got spontaneously was another cause of the performance of the anodes obtained here. The benefits of alkaline pH have already been observed in the literature. Increased anolyte pH has been shown to shift the anode potential towards more negative values [43, 44]. It has been stipulated that electrochemical interactions between bacteria and electrodes in MFCs are enhanced under alkaline conditions [45]. A few studies have shown that MFCs can provide higher current under alkaline conditions [46-48]. A MFC using a mixed culture has been shown to tolerate a feed electrolyte at pH 10, the highest current being reached at pH 9 [49]. Recently a MFC inoculated with a mixture of aerobic and anaerobic sludge has produced optimal power at pH 9.5 [50]. Indeed, authors have suggested that pH 9.5 may be considered optimal for generating current from urban wastewaters.

The results obtained here confirmed that alkaline pH is favourable for effluent treatment with MFC. No nitrogen bubbling was performed in the closed reactors. CO_2 was consequently not extracted from the bulk and was mainly dissolved according to Equation 2:



which combined with Equation 5 leads to:



9 protons are consumed at the anode per 8 electrons. In regard, the cathode consumed 8 protons with the 8 electrons. The proton balance due to the electrochemical reaction thus led to a slight acidification

of the bulk, with 1 proton produced for 8 electrons. Consequently, the pH drift was not directly linked to the electrochemical reactions. Such spontaneous pH drift was evidenced here because a minimal supplementation was used, without significant buffer capacity. It may result from a combined effect of spontaneous removal of a part of CO₂, alkalinity and hardness of the effluent as well as organic acid removal during operation. The microbial anodes obtained here maintained their maximum current down to potential values as low as -0.4V/SCE. Designing an anode able to produce stable current at potentials as low as possible is a main advantage for designing MFC. Nevertheless, it cannot be concluded that these anodes are unconditionally more efficient. Actually, when inserted into a microbial fuel cell, the gain in potential that will be achieved on the anode can be lost on the cathode side if the cathode reaction also depends on the pH value (e.g. oxygen reduction). The anodes designed here, will present very interesting characteristics when coupled to a cathode that is not sensitive to pH value. On the other hand, the efficiency of these anodes at alkaline pH showed that it is not required to adjust pH of the effluent to neutral values, which is a main asset to apply MFC for the treatment of large volumes of effluents.

4. Conclusion

For the first time it was showed here that the same effluent can have different capacity to form microbial anodes depending on the sampling location, at the inlet or the outlet of the aerated lagoon of a treatment plant. The microbial inoculum coming from the inlet was dramatically less suitable than the outlet sample to form efficient electroactive biofilms. The minimally enriched conditions implemented here that did not mask the intrinsic properties of each sample certainly favoured the distinction of the two inoculum sources.

Moreover, in the absence of significant buffering effect, the pH increased during biofilm formation to alkaline values up to 9.1. At this pH, the microbial anode formed from the outlet sample maintained maximum current densities up to 6 A/m² until potential values as low as -0.4 V/SCE. These current densities were very promising considering that they were obtained on smooth electrode surfaces. In the case of the inlet inoculum, the performance obtained at low potential and alkaline pH could be attributed to the strong selection of *Desulfuromonas acetexigens* that appeared as the sole most abundant species in the final tertiary biofilms. *D. acetexigens* has never been identified as an electroactive species yet, further work is now required to isolate the strain and test it in pure culture.

Acknowledgements

This work was achieved in the framework of the “Agri-Elec (ANR-008-BioE-001)” project, which is supported by the French National Research Agency (ANR).

References

- [1] R.A. Rozendal, H.V.M. Hamelers, K. Rabaey, J. Keller, C.J.N. Buisman, Towards practical implementation of bioelectrochemical wastewater treatment, Trends Biotechnol. 26 (2008) 450-

459.

- [2] S. Oh, J. Kim, G.C. Premier, T.H. Lee, C. Kim, W. Sloan, Sustainable wastewater treatment: How might microbial fuel cells contribute, *Biotechnol. Advances*. 28 (2010) 871–881.
- [3] J. Fornero, M. Rosenbaum, L. Angenent, Electric power generation from municipal, food, and animal wastewaters using microbial fuel cells, *Electroanal*. 22 (2010) 832-843.
- [4] O. Lefebvre, A. Uzabiaga, I. Chang, B. Kim, H.Y. Ng, Microbial fuel cells for energy self-sufficient domestic wastewater treatment—a review and discussion from energetic consideration, *Appl Microbiol Biotechnol*. 89 (2011) 259-270.
- [5] B.E. Rittmann, Opportunities for renewable bioenergy using microorganisms, *Biotechnol Bioeng*. 100 (2008) 203-212.
- [6] S.B. Velasquez-orta, E. Yu, K. Katuri, I. Head, T.P. Curtis, K. Scott, Evaluation of hydrolysis and fermentation rates in microbial fuel cells, *Appl. microbiol. biotechnol*. 90 (2011) 789-798.
- [7] B. Min, J. Kim, S. Oh, J.M. Regan, B.E. Logan, Electricity generation from swine wastewater using microbial fuel cells, *Water Res*. 39 (2005) 4961-4968.
- [8] B. Erable, L. Etcheverry, A. Bergel, From microbial fuel cell (MFC) to microbial electrochemical snorkel (MES): maximizing chemical oxygen demand (COD) removal from wastewater, *Biofouling*. 27 (2011) 319-326.
- [9] T. Song, H. Cai, Z. Yan, Z. Zhao, H. Jiang, Various voltage productions by microbial fuel cells with sedimentary inocula taken from different sites in one freshwater lake, *Bioresour. Technol*. 108 (2012) 68-75.
- [10] D. Jiang, B. Li, W. Jia, Y. Lei, Effect of inoculum types on bacterial adhesion and power production in microbial fuel cells, *Appl. Biochem. Biotechnol*. 160 (2010) 182-196.
- [11] L. Huang, B. Logan, Electricity generation and treatment of paper recycling wastewater using a microbial fuel cell, *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 80 (2008) 349-355.
- [12] A.S. Mathuriya, V.N. Sharma, Bioelectricity production from paper industry waste using a microbial fuel cell by *Clostridium* species, *J. Biochem. Tech*. 1 (2009) 49-52.
- [13] S. Parot, M. Délia, A. Bergel, Forming electrochemically active biofilms from garden compost under chronoamperometry, *Bioresour. Technol*. 99 (2008) 4809-4816.
- [14] L.M. Tender, J.G. Zeikus, D.A. Finkelstein, Effect of electrode potential on electrode-reducing microbiota, *Environ. Sci. Technol*. 40 (2006) 6990-6995.
- [15] C.I. Torres, A.K. Marcus, B.E. Rittmann, Kinetics of consumption of fermentation products by anode respiring bacteria, *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 77 (2007) 689-697.
- [16] F.E.Z. Haichar, C. Marol, O. Berge, J.I. Rangel-Castro, J.I. Prosser, J. Balesdent, T. Heulin, W. Achouak, Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure, *ISME J*. 2 (2008) 1221-1230.
- [17] P. Aelterman, S. Freguia, J. Keller, W. Verstraete, K. Rabaey, The anode potential regulates bacterial activity in microbial fuel cells, *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 78 (2008) 409-418.
- [18] F. Harnisch, S. Freguia, A basic tutorial on cyclic voltammetry for the investigation of

- electroactive microbial biofilms, *Chemistry - An Asian Journal*. 7 (2012) 466-475.
- [19] C.I. Torres, R. Krajmalnik-Brown, P. Parameswaran, A.K. Marcus, G. Wanger, Y.A. Gorby, B.E. Rittmann, Selecting anode-respiring bacteria based on anode potential: phylogenetic, electrochemical, and microscopic characterization, *Environ. Sci. Technol.* 43 (2009) 9519-9524.
- [20] H. Richter, K.P. Nevin, H. Jia, D.A. Lowy, D.R. Lovley, L.M. Tender, Cyclic voltammetry of biofilms of wild type and mutant *Geobacter sulfurreducens* on fuel cell anodes indicates possible roles of OmcB, OmcZ, type IV pili, and protons in extracellular electron transfer, *Environ. Sci. Technol.* 2 (2009) 506-516.
- [21] K.P. Nevin, B. Kim, R.H. Glaven, J.P. Johnson, T.L. Woodard, B.A. Methé, R.J. DiDonato Jr., S.F. Covalla, A.E. Franks, A. Liu, D.R. Lovley, Anode biofilm transcriptomics reveals outer surface components essential for high density current production in *Geobacter Sulfurreducens* fuel cells, *PLoS ONE*, 4 (2009) e5628.
- [22] A.S. Alves, C.M. Paquete, B.M. Fonseca, R.O. Louro, Exploration of the 'cytochrome' of *Desulfuromonas acetoxidans*, a marine bacterium capable of powering microbial fuel cells, *Metallomics* 3 (2011) 349-353.
- [23] A.E. Franks, K.P. Nevin, Microbial Fuel Cells, A Current Review, *Energies*. 3 (2010) 899-919.
- [24] K. Rabaey, G. Lissens, S.D. Siciliano, W. Verstraete, A microbial fuel cell capable of converting glucose to electricity at high rate and efficiency, *Biotechnol. Lett.* 25 (2003) 1531-1535.
- [25] K. Rabaey, N. Boon, S.D. Siciliano, M. Verhaege, W. Verstraete, Biofuel cells select for microbial consortia that self-mediate electron transfer, *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (2004) 5376-5382.
- [26] J.R. Kim, B. Min, B.E. Logan, Evaluation of procedures to acclimate a microbial fuel cell for electricity production, *Appl Microbiol Biotechnol.* 68 (2005) 23-30.
- [27] A. Wang, D. Sun, N. Ren, C. Liu, W. Liu, B. Logan, W. Wu, A rapid selection strategy for an anodophilic consortium for microbial fuel cells, *Bioresour. Technol.* 101 (2010) 5733-5735.
- [28] F. Harnisch, C. Koch, S.A. Patil, T. Hübschmann, S. Müller, U. Schröder, Revealing the electrochemically driven selection in natural community derived microbial biofilms using flow-cytometry, *Energy Environ. Sci.* 4 (2011) 1265-1267.
- [29] L. Huang, B. Logan, Electricity production from xylose in fed-batch and continuous-flow microbial fuel cells, *Appl Microbiol Biotechnol.* 80 (2008) 655-664.
- [30] Ying Liu, F. Harnisch, K. Fricke, R. Sietmann, U. Schröder, Improvement of the anodic bioelectrocatalytic activity of mixed culture biofilms by a simple consecutive electrochemical selection procedure, *Biosens Bioelectron.* 24 (2008) 1006-1011.
- [31] E. Marsili, J. Sun, D.R. Bond, Voltammetry and growth physiology of *Geobacter sulfurreducens* biofilms as a function of growth stage and imposed electrode potential, *Electroanal.* 22 (2010) 865-874.
- [32] S. Freguia, E.H. Teh, N. Boon, K.M. Leung, J. Keller, K. Rabaey, Microbial fuel cells operating on mixed fatty acids, *Bioresour. Technol.* 101 (2010) 1233-1238.
- [33] P. Parameswaran, H. Zhang, C.I. Torres, B.E. Rittmann, R. Krajmalnik-Brown, Microbial

- community structure in a biofilm anode fed with a fermentable substrate: the significance of hydrogen scavengers, *Biotechnol. Bioeng.* 105 (2010) 69-78.
- [34] H. Richter, M. Lanthier, K.P. Nevin, D.R. Lovley, Lack of Electricity Production by *Pelobacter carbinolicus* Indicates that the Capacity for Fe(III) oxide reduction does not necessarily confer electron transfer ability to fuel cell anodes, *Appl. Environ. Microbiol.* 73 (2007) 5347-5353.
- [35] K. Finster, F. Bak, N. Pfennig, *Desulfuromonas acetexigens* sp. nov., a dissimilatory sulfur-reducing eubacterium from anoxic freshwater sediments, *Arch. Microbiol.* 161 (1994) 328-332.
- [36] G. He, Y. Gu, S. He, U. Schröder, S. Chen, H. Hou, Effect of fiber diameter on the behavior of biofilm and anodic performance of fiber electrodes in microbial fuel cells, *Bioresour. Technol.* 102 (2011) 10763-10766.
- [37] D. Pocaznoi, B. Erable, M. Delia, A. Bergel, Ultra microelectrodes increase the current density provided by electroactive biofilms by improving their electron transport ability, *Environ. Sci. Technol.* 5 (2012) 5287-5296.
- [38] B. Logan, S. Cheng, V. Watson, G. Estadt, Graphite fiber brush anodes for increased power production in air-cathode microbial fuel cells, *Environ. Sci. Technol.* 41 (2007) 3341-3346.
- [39] G. Gil, I. Chang, B. kim, M. Kim, J. Jang, H. Park, H. Kim, Operational parameters affecting the performance of a mediator-less microbial fuel cell, *Biosens. Bioelectron.* 18 (2003) 327-334.
- [40] G. jadhav, M. Ghangrekar, Performance of microbial fuel cell subjected to variation in pH, temperature, external load and substrate concentration, *Bioresour. Technol.* 100 (2009) 717-723.
- [41] B.E. Logan, B. Hamelers, R. Rozendal, U. Schroder, J. Keller, S. Freguia, P. Aelterman, W. Verstraete, K. Rabaey, Microbial fuel cells: methodology and technology, *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 5181-5192.
- [42] C.I. Torres, A. Kato Marcus, B.E. Rittmann, Proton transport inside the biofilm limits electrical current generation by anode-respiring bacteria, *Biotechnol. Bioeng.* 100 (2008) 872-881.
- [43] L. Zhuang, S. Zhou, Y. Li, Y. Yuan, Enhanced performance of air-cathode two-chamber microbial fuel cells with high-pH anode and low-pH cathode, *Bioresour. Technol.* 101 (2010) 3514-3519.
- [44] S.A. Patil, F. Harnisch, C. Koch, T. Hübschmann, I. Fetzer, A.A. Carmona-Martínez, S. Müller, U. Schröder, Electroactive mixed culture derived biofilms in microbial bioelectrochemical systems: the role of pH on biofilm formation, performance and composition, *Bioresour. Technol.* 102 (2011) 9683-9690.
- [45] Y. Yuan, B. Zhao, S. Zhou, S. Zhong, L. Zhuang, Electrocatalytic activity of anodic biofilm responses to pH changes in microbial fuel cells, *Bioresour. Technol.* 102 (2011) 6887-6891.
- [46] R.A. Rozendal, H.V.M. Hamelers, C.J.N. Buisman, Effects of membrane cation transport on pH and microbial fuel cell performance *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 5206-5211.
- [47] R. Rozendal, T. Sleutels, H. Hamelers, C. Buisman, Effect of the type of ion exchange membrane on performance, ion transport, and pH in biocatalysed electrolysis of wastewater, *Water. Sci. Technol.* 57 (2008) 1757-1762.
- [48] Y. Fan, H. Hu, H. Liu, Sustainable power generation in microbial fuel cells using bicarbonate

buffer and proton transfer mechanisms, Environ. Sci. Technol. 41 (2007) 8154-8158.

- [49] Z. He, Y. Huang, A.K. Manohar, F. Mansfeld, Effect of electrolyte pH on the rate of the anodic and cathodic reactions in an air-cathode microbial fuel cell, Bioelectrochemistry, 74 (2008) 78-82.
- [50] S. Puig, M. Serra, M. Coma, M. Cabré, M.D. Balaguer, J. Colprim, Effect of pH on nutrient dynamics and electricity production using microbial fuel cells, Bioresour. Technol. 101 (2010) 9594-9599.

III.2.2.3. Commentaires sur l'article N°1

Les résultats essentiels dégagés de cet article sont :

❖ Les performances des biofilms EA formés à partir des échantillons prélevés en sortie de lagune aérée sont supérieures à celles des échantillons prélevés en entrée. Les densités de courant maximales obtenues lors de la formation des premiers biofilms électro-actifs sont de $J_{max} = 0,6 \text{ A/m}^2$ avec l'effluent d'entrée de lagune (Biofilm Entrée R0) et $2,2 \text{ A/m}^2$ avec l'effluent de sortie de lagune (Biofilm Sortie R0).

❖ Les repiquages successifs au même potentiel (0,4 V) et ensuite à potentiel plus bas (-0,2 V) améliorent sensiblement les performances des nouveaux biofilms EA formés.

❖ Les valeurs élevées de pH en fin d'expérience nous ont permis de descendre en potentiel imposé jusqu'à des valeurs aussi faibles que -0,4 V en gardant de bonnes performances des biofilms EA. En effet, le potentiel redox de l'acétate dépend du pH et est calculé d'après les équations de Nernst (équations 6 et 7) présentées dans l'article. D'une manière plus schématique (Figure 37), on observe pour un potentiel imposé à l'anode de -0,4 V, un gain énergétique plus important à pH 9 par rapport à pH 7.

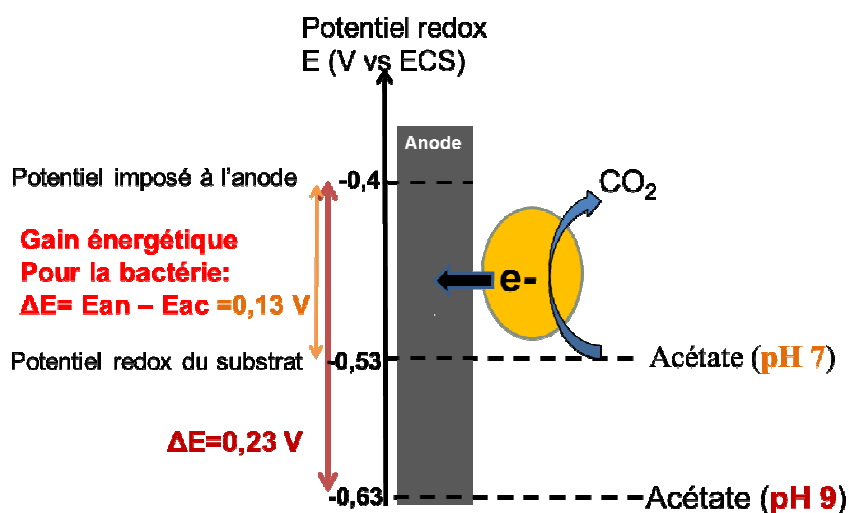


Figure 37 : Représentation schématique du gain énergétique de la bactérie en fonction du pH.

❖ Les voltammétries cycliques non catalytiques (lorsque le pic de courant est descendu presque à zéro) ainsi que les DGGEs réalisées sur les électrodes en fin d'expérience mettent en évidence les différences de compositions en micro-organismes entre les deux biofilms. En effet, différents systèmes redox qui apparaissent sur les VC ont des valeurs de potentiels proches de ceux des protéines terminales des micro-organismes détectés par les DGGEs.

❖ Une espèce microbienne qui n'avait jamais été identifiée jusqu'à présent dans les biofilms EA a été mise en évidence : il s'agit de : *Desulfuromonas acetexigens*. Cette espèce apparaît avec les repiquages à plus bas potentiel pour devenir prépondérante dans le biofilm de troisième génération (biofilm tertiaire). La procédure expérimentale originale utilisée ici pourrait expliquer qu'elle n'ait jamais été identifiée auparavant. Elle nécessite néanmoins d'être isolée et testée en culture pure pour évaluer son électroactivité.

❖ Le choix d'un milieu de travail assez original a permis de mettre en évidence, pour la première fois à notre connaissance, les capacités différentes de deux échantillons prélevés en des points proches d'un même site de traitement d'effluents papetiers pour former des biofilms EA. En effet, la plupart des travaux utilisent des milieux synthétiques riches et tamponnés qui masquent les propriétés intrinsèques des inocula. Suivant les travaux présentés ici, cette nouvelle stratégie permettrait de comparer la capacité d'environnements donnés à former puis à maintenir des biofilms EA.

III.2.2.4. Résultats complémentaires non présentés dans l'article N°1

D'autres biofilms ont été formés à partir des échantillons prélevés en sortie de lagune (non colorés dans le tableau de référencement de la *(Figure 36)*). La moyenne de la durée pour former des biofilms EA est de 30 jours.

Le biofilm Sortie R1' est un biofilm de deuxième génération issu du premier repiquage à 0,2 V du biofilm Sortie R0 formé à 0,4 V. Il a permis d'obtenir des performances de 4,2 A/m² de densité de courant et 48% de rendement faradique. Ces performances sont très proches de celles du biofilm de deuxième génération Sortie R1 polarisé au même potentiel que Sortie R0 précédent (0,4 V) et présenté dans l'article 1 à savoir 4,5 A/m² de densité de courant et 35% de rendement faradique. Une diminution de 200 mV du potentiel imposé lorsque le biofilm est reconstitué n'influence donc pas les performances.

Trois autres biofilms de deuxième génération (secondaires) ont été formés lors des repiquages à plus faibles potentiels, il s'agit du biofilm Sortie R2' qui est le résultat du repiquage du biofilm Sortie R1 à plus bas potentiel (de 0,4 à 0 V), et des biofilms Sortie R2'' et Sortie R2''' qui sont les biofilms secondaires issus du repiquage à plus bas potentiel du biofilm Sortie R1' de 0,2 V à 0,0 V et -0,2 V respectivement. Les performances de ces biofilms sont résumées dans le *Tableau 5*.

La diminution successive du potentiel se traduit par une bonne conservation des performances pour le cas du biofilm Sortie R2' et une amélioration dans les cas des biofilms Sortie R2'' et Sortie R2'''.

Pour toutes ces expériences, les performances restent stables jusqu'à un potentiel de $-0,3$ V. Une légère diminution commence à être observée autour de $-0,4$ V. En suivant l'hypothèse de Torres (Cf paragraphe III.1.1.), en imposant des potentiels de plus en plus bas, on fournit de moins en moins d'énergie aux biofilms ce qui permet de sélectionner les micro-organismes EA les plus performants (Torres *et al.* 2009).

| Biofilms | Potentiel imposé (V) | J (A/m^2) | Rf (%) |
|---|----------------------|---------------|--------|
| Sortie R1': 4 ajouts d'acétate, 28 jours | 0,2 | 5,8 | 25 |
| Sortie R2': 8 ajouts d'acétate, 28 jours | 0,0 | 5 | 17 |
| | -0,2 | 5,5 | 16 |
| | -0,3 | 6,5 | 15 |
| | -0,4 | 5 | 13 |
| Sortie R2'': 7 ajouts d'acétate, 25 jours | 0,0 | 1 | 10 |
| | -0,2 | 3,5 | 30 |
| | -0,3 | 5,2 | 45 |
| | -0,4 | 5,5 | 45 |
| Sortie R2''': 6 ajouts d'acétate, 25 jours | -0,2 | 5,2 | 35 |
| | -0,3 | 7 | 45 |
| | -0,4 | 6 | 50 |

Tableau 5: Performances de biofilms électro-actifs secondaires et tertiaires formés avec les échantillons Lagune qui ne sont pas présentés dans l'article N°1.

III.2.3. Etude des échantillons issus d'un méthaniseur du Site N°2

L'effluent est collecté à la sortie du méthaniseur. Un barbotage préalable d'azote pendant 10 minutes est réalisé en début d'expérience dans tous les réacteurs pour éliminer l'oxygène dans le milieu. L'organigramme de formation et de repiquage des biofilms électro-actifs réalisés avec ces prélèvements est présenté sur la *Figure 38*.

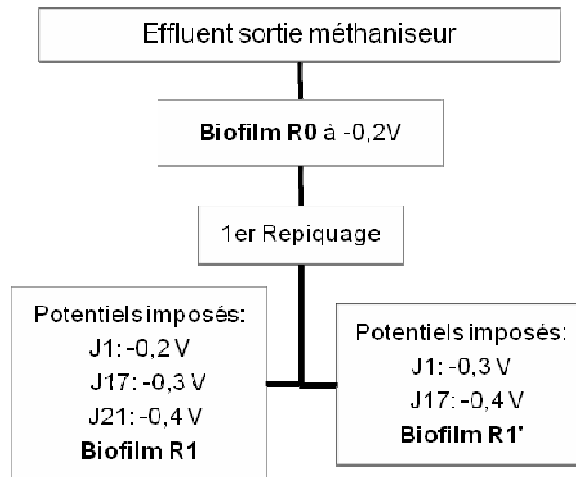


Figure 38: Référencement des biofilms EA formés à différents potentiels imposés à partir des échantillons du Site n°2. Biofilms Rx : x = état de repiquage du biofilm.

III.2.3.1. Formation du biofilm primaire

Les expériences réalisées avec les échantillons issus de la lagune (Cf paragraphe III.2.2.) ayant montré que des biofilms EA plus efficaces sont formés à faible potentiel imposé, nous avons décidé de former les biofilms EA primaires directement à faible potentiel (-0,2 V), avec l'effluent issu du méthaniseur (*Figure 39*).

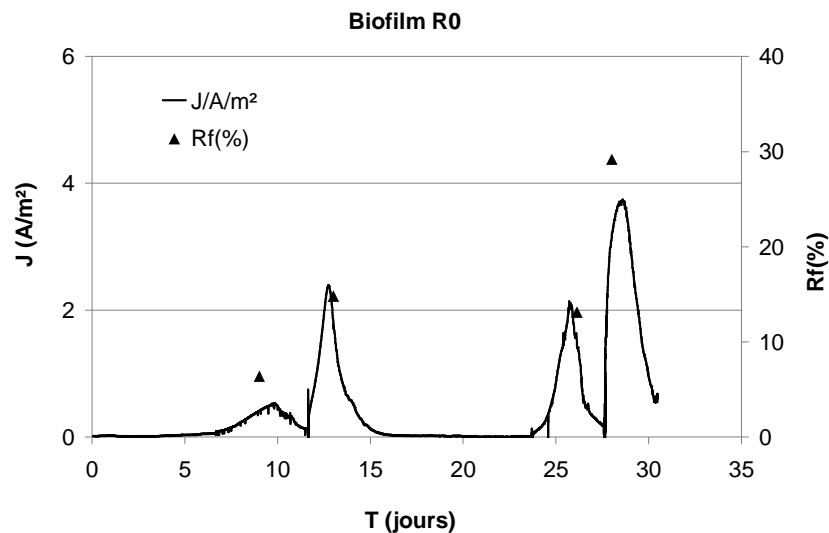


Figure 39: Densités de courant et rendements faradiques (Rf) obtenus avec le biofilm primaire formé avec l'effluent sortie méthaniseur. Electrodes de travail en plaque de graphite polarisées à -0,2 V.

On obtient un biofilm EA dont l'activité catalytique démarre à partir du cinquième jour et dont les valeurs maximales atteignent $3,8 \text{ A/m}^2$ en densité de courant et 30% en rendement faradique après un mois d'expérience et 4 ajouts d'acétate.

Ce biofilm primaire a été récupéré de l'électrode et utilisé pour inoculer deux réacteurs dont les électrodes ont été polarisées à deux potentiels différents. Dans un premier réacteur (R1), l'électrode est polarisée à $-0,2 \text{ V}$ qui est le potentiel auquel a été formé le biofilm primaire afin de juger de l'effet du repiquage seul. Dans un deuxième réacteur (R1'), l'électrode a été polarisée à $-0,3 \text{ V}$ afin de juger des effets couplés du repiquage et d'un potentiel imposé plus faible.

III.2.3.2. Formation des biofilms secondaires

Après repiquage du biofilm primaire, l'activité électrochimique des biofilms secondaires formés démarre plus rapidement (2 jours). Après 2 semaines d'expérience, les performances obtenues pour les 2 biofilms sont de $3,5 \text{ A/m}^2$ et 13% de rendement faradique pour le biofilm R1 repiqué au même potentiel et $5,8 \text{ A/m}^2$ et 23% de rendement faradique pour le biofilm repiqué à plus bas potentiel. Les densités de courant sont semblables (repiquage au même potentiel) ou améliorées (repiquage à potentiel plus bas) par rapport à celles du biofilm primaire en fin d'expérience. Les rendements faradiques sont plus faibles (de 30% à 13-23%). Les baisses de potentiels réalisées successivement jusqu'à $-0,4 \text{ V}$ à partir du jour 17 sont indiquées sur les courbes avec les couleurs correspondants aux expériences auxquelles elles se réfèrent (*Figure 40*).

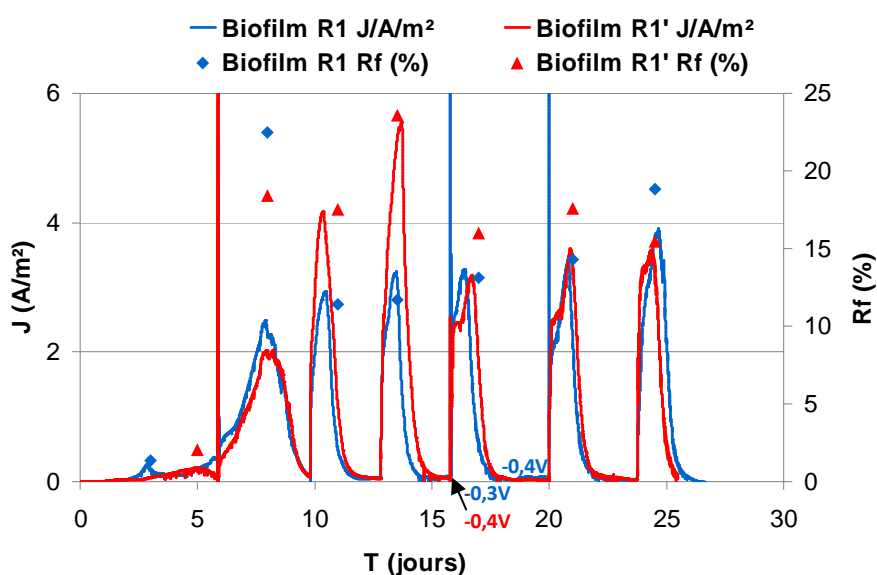


Figure 40: Biofilms secondaires: CA obtenues lors du repiquage du biofilm primaire de la **Figure 39** à 2 potentiels: $-0,2 \text{ V}$ (R1) et $-0,3 \text{ V}$ (R1').

Les performances des deux biofilms deviennent alors superposables tout au long de l'expérience. Les densités de courant varient entre 3,5 et 3,8 A/m² et les rendements faradiques entre 15 et 20%. Les potentiels imposés de -0,3 V et -0,4 V aboutissent ainsi aux mêmes résultats. Ce résultat indique que le biofilm a atteint son palier d'activité catalytique.

Des expériences similaires à celles présentées avec les échantillons méthaniseur ont été réalisées avec les effluents issus de rejets de la station d'épuration enrichis avec du biofilm naturel prélevé au niveau du clarificateur provenant du même site. Les résultats obtenus, très faibles, ne sont pas présentés dans ce manuscrit.

III.2.4. Etude des échantillons du Site N°3

Comme présenté dans le chapitre II, le site N°3 est un site de production de papier journal avec traitement des effluents par boues activées (*Cf* paragraphe II.1.3.). Des échantillons ont été prélevés en trois points de circuits d'eau différents. Nous commençons par présenter les résultats des échantillons «machine à papier» et «entrée biologique» car certains biofilms obtenus à partir de ces échantillons ont été utilisés pour réaliser l'article N°2.

III.2.4.1. Echantillons du site N°3 collectés sur la machine à papier et en entrée du traitement biologique

La description de ces différents échantillons a été faite dans le chapitre II (*Cf* paragraphe II.1).

III.2.4.1.1. Référencement des biofilms formés et repiqués

La *Figure 41* présente l'organigramme de formation et de repiquage des biofilms issus des échantillons de filtrats clairs de la machine à papier (MaP) et de l'entrée du traitement biologique aérobie (EB).

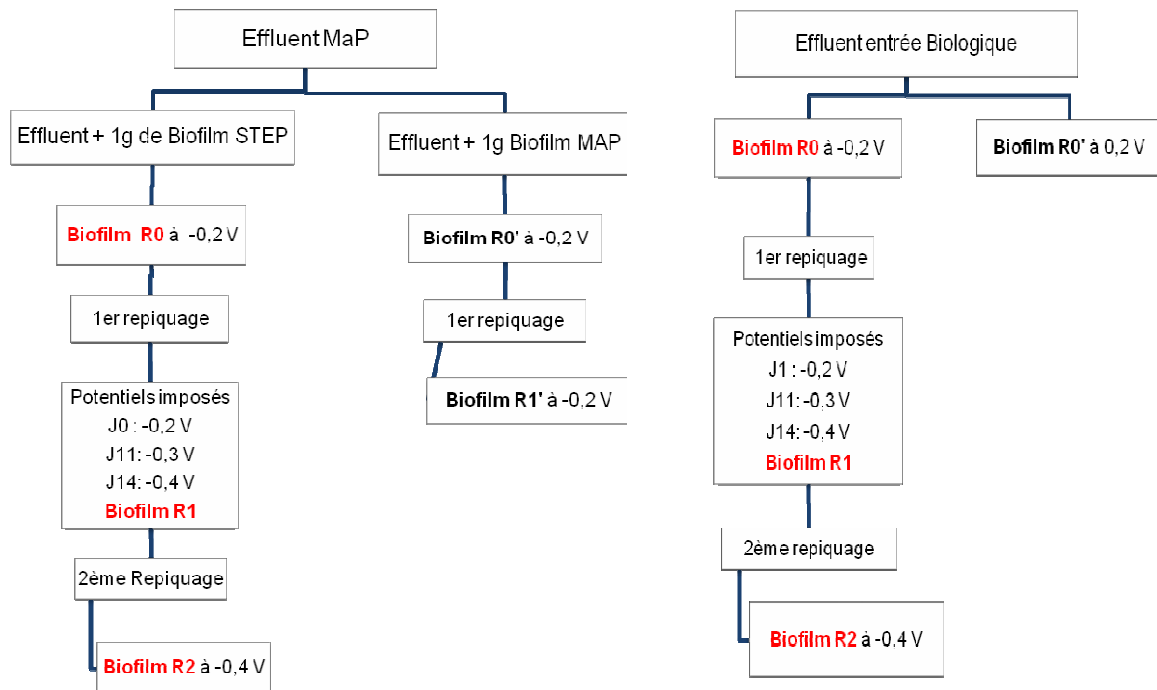


Figure 41: Différents biofilms EA formés à différents potentiels imposés à partir des effluents et biofilms récupérés au niveau de la machine à papier et de l'entrée de la station d'épuration du site N°3. En rouge, les biofilms utilisés pour réaliser l'article N°2.

III.2.4.1.2. Article N°2

L'article qui suit a été accepté pour publication dans le journal *Bioresource Technology*. Cet article présente les résultats obtenus avec les biofilms EA dont les noms sont colorés en rouge sur les organigrammes de la *Figure 41*.

Il a pour but de présenter un nouveau protocole optimisé pour la formation d'anodes microbiennes à partir d'effluents papetiers avec des systèmes à trois électrodes. Pour concevoir ce protocole, nous nous sommes appuyés sur deux points essentiels présentés et discutés dans la bibliographie en ce qui concerne la formation de biofilms EA. Premièrement, Il a été montré qu'un biofilm EA préalablement formé puis utilisé pour inoculer un nouveau réacteur permet d'améliorer les performances du nouveau biofilm obtenu. Deuxièmement, de faibles potentiels imposés à une électrode de travail permettaient la formation de biofilms EA plus efficaces. Nous avons décidé de tester les effets combinés de ces paramètres. La procédure consiste à former des biofilms primaires au potentiel de $-0,2V$. Ces biofilms sont ensuite repiqués au même potentiel puis, celui-ci est progressivement diminué par des sauts ($-0,3 V$ puis $-0,4V$) durant la chronoampérométrie. Le biofilm secondaire ainsi acclimaté à ce faible potentiel est utilisé pour former un biofilm tertiaire à $-0,4V$. Le biofilm tertiaire ainsi formé présente des densités de courant supérieures à $6A/m^2$. Un biofilm primaire formé directement à $-0,4 V$ présente des densités de courant négligeables.

Lowering the applied potential during successive scratching/re-inoculation improves the performance of microbial anodes for microbial fuel cells.

STEPHANIE F. KETEP^{1*}, ALAIN BERGEL², MARIE BERTRAND³, WAFI ACHOUAK³, ERIC FOUREST¹

1Centre Technique du Papier, 341 rue de la papeterie, 38400 Saint Martin d'Hères, France

2Laboratoire de Génie Chimique CNRS, Université de Toulouse, 4 allée Emile Monso BP84234, 31432 Toulouse, France

3CEA, DSV, IBEB, Laboratoire d'Ecologie Microbienne de la Rhizosphère et Environnements extrêmes, 13108 Saint-Paul-lez-Durance, France. CNRS, UMR 7265, 13108 Saint-Paul-lez-Durance, France. Université Aix-Marseille, 13108 Saint-Paul-lez-Durance, France

Abstract

Microbial anodes were formed under polarisation at -0.2 V/SCE on smooth graphite plate electrodes with paper mill effluents. Primary, secondary and tertiary biofilms were formed by a successive scratching and re-inoculation procedure. The secondary and tertiary biofilms formed while decreasing the polarisation potential allowed the anodes to provide current density of 6 A/m² at -0.4 V/SCE. In contrast, applying -0.4 V/SCE initially to form the primary biofilms did not lead to the production of current. Consequently, the scratching/re-inoculation procedure combined with progressive lowering of the applied potential revealed an efficient new procedure that gave efficient microbial anodes able to work at low potential. The observed progressive pH drift to alkaline values above 9 explained the open circuit potentials as low as -0.6 V/SCE. The remarkable performance of the electrode at alkaline pH was attributed to the presence of *Desulfuromonas acetexigens* as the single dominant species in the tertiary microbial anodes.

Keywords: Pulp mill effluent, electroactive biofilm, imposed potential, alkaline pH, microbial fuel cell (MFC)

1. Introduction

Strengthened environmental requirements and regulations have forced the pulp and paper industries to reduce the consumption of fresh water in papermaking processes. This trend has led to process waters that are highly concentrated in organic matter, requiring stronger treatment before the effluents can be rejected or recycled (Mathuriya and Sharma, 2009). Paper industries have consequently been searching for new effluent treatment technologies and, in this framework, microbial fuel cells (MFCs) might be a promising technology (Huang and Logan, 2008a). MFCs produce electrical energy from the oxidation of the organic matter contained in wastes. They could thus reduce the amount of sludge produced by biological treatment (Kim *et al.*, 2007) and help to supply some of the energy needed by the treatment plant. At laboratory scale, MFCs have been shown to be able to treat effluents from various origins (Pant *et al.*, 2009).

The objective of the present work was to design an optimal protocol for forming microbial anodes using an effluent coming from the pulp and paper industry. It has been shown that inoculating a reactor with a scraped-off biofilm collected from a running MFC (Rabaey *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2005, Wang *et al.*, 2010, Harnisch *et al.*, 2011, Cheng *et al.*, 2011) or with the effluent from a previous reactor (Huang and Logan, 2008b) improves the electrochemical performance of the new biofilms with respect to the biofilms that were used as inoculum. Similarly, clean electrodes inserted in a running MFC in the vicinity of an already active biofilm anode have been shown to benefit from the presence of the already formed microbial anode (Liu *et al.*, 2008).

Our protocol consisted of forming a primary biofilm from an inoculum source and then scratching the biofilm from the anode surface to use it to inoculate a new electrochemical cell. It now seems to be agreed that keeping the electrode polarised also favours the formation of efficient electroactive biofilms (Aelterman *et al.*, 2008; Torres *et al.*, 2009; Srikanth *et al.*, 2010). An electrode potential can produce a selective pressure for bacterial evolution (Yi *et al.*, 2009). The general target in designing microbial anodes is to obtain the highest possible current at the lowest possible potential. In this objective, it can be thought that polarising the electrode at low potential should favour the formation of efficient microbial anodes. This postulate has been validated by Torres *et al.* who have shown that anodes formed under low potential select the most efficient electrode-respiring bacteria (ERA). Anodes formed at -0.15 V vs. SHE produced up to 8 A/m², while anodes formed in identical conditions at +0.37 V gave no more than 0.6 A/m² (Torres *et al.*, 2009).

Here, we tested an original procedure that combined the advantages of both re-inoculation and polarisation at low potential. Primary biofilms were formed from paper machine effluents. The primary biofilms were then scratched and used as inocula to form secondary biofilms and the operation was repeated for tertiary biofilms. The applied potential was reduced from -0.2 V/SCE for the formation of the primary biofilms to -0.4 V/SCE for the tertiary biofilms. To the best of our knowledge, such an association of scratching/re-inoculation steps with lowering potential is described for the first time here. The interest of the procedure was demonstrated by comparison with control experiments performed with an applied potential of -0.4 V/SCE for the formation of the primary biofilms, which did not succeed in producing current.

The successive biofilms were formed in the industrial effluent (250 mL), which was filtered at 0.3 µm to remove planktonic microorganisms and supplemented with a synthetic medium (200 mL) to correct nutrient deficiencies, optimize the conditions for electroactive biofilm development, and stabilize the substrate supplied. The synthetic medium contained small amounts of carbonate, ammonium and phosphate compounds, potassium chloride and acetate. The small amounts of carbonate, ammonium and phosphate compounds did not have a significant buffer effect. In this condition the pH of the bulk was controlled by the evolution of the effluent itself.

Nitrogen and phosphate supplementation is commonly used to enhance the treatments of pulp and paper effluents. Acetate, provided by hydrolysis and acidogenesis of polysaccharides, is frequently observed in these effluents.

2. Materials and methods

2.1. *Microbial inocula and synthetic medium*

Effluent samples were collected from the water circuits of a French newsprint production site. A first effluent sample was collected directly from the filtrates of the paper machine and was used as inoculum source for reactor A#1. A second sample collected just after the primary clarification step of the waste water treatment plant was used similarly for reactor B#1. Primary biofilms were formed with 250 mL of effluent supplemented with 200 mL of synthetic medium that contained 23.8 mM NaHCO₃, 28 mM NH₄Cl, 5 mM NaH₂PO₄ (pH 7.0) previously sterilized by autoclaving. 5 mM sodium acetate and 10 mM KCl were added to the final solution (conductivity 3 mS/cm). The secondary and tertiary biofilms were formed in identical mixtures but the effluent was previously filtered at 0.3 μm to remove planktonic bacteria. The primary or secondary electroactive biofilms were detached from the electrode surfaces by ultrasound in 30 mL of physiological Ringer solution and this volume was used to inoculate the new electrochemical cell.

2.2. *Reactors and electrodes*

The electrochemical cells (borosilicate glass) contained 450 mL (primary biofilms) or 480 mL (secondary and tertiary biofilms) of solution with around 200 mL of headspace. The lid and the reactor body were sealed with a clamping ring. Working electrodes were flat 2 cm x 5 cm x 0.5 cm graphite plates (Goodfellow) screwed on to 2-mm-diameter, 12-cm-long titanium rods (Alfa Aesar) that ensured the electrical connection. Before use, the graphite electrodes were cleaned by 1 hour of immersion in 1M HCl, 20 minutes' rinsing with distilled water and 1 hour of immersion in 1M NaOH. Auxiliary electrodes were 90% Platinum-10% Iridium grids (Heraeus), cleaned by heating in a blue flame. Potentials were controlled and expressed versus a saturated calomel electrode (SCE; potential +0.24 V vs. SHE; Radiometer, Copenhagen). The reference electrode was as close as possible to the anode surface (working electrode) and the auxiliary electrode was in front of the anode, as far as possible from it.

2.3. *Electrochemical experiments*

Microbial anodes were formed at constant potential and characterized by chronoamperometry (CA) using a conventional three-electrode set-up and a multi-channel potentiostat (model VMP3, software EC-Lab v 10.2, Bio-Logic SA). Current was recorded every 900 s and chronoamperometry was periodically suspended to record cyclic voltammetry (CV) curves at 1 mV/s. The potential scan started at the potential imposed during CA to avoid damaging the biofilm. The primary biofilms were formed with the paper machine effluents in two parallel reactors (reactors A#1 and B#1) operated in strictly identical experimental conditions. The successive re-inoculations were then performed in strictly parallel ways without cross mixing from one reactor to the other. Temperature was maintained at 25°C. Acetate (5 or 2.5 mM) was supplied repetitively to characterize the biofilms' maturation in optimal and reproducible conditions. When mentioned, the medium was gently sparged with N₂. Coulombic efficiencies (CE) were calculated for each acetate addition as the ratio between the number of coulombs transferred to the anode and the maximum possible charge that the amount of added acetate could provide (8 electrons per acetate molecule). COD was titrated before each acetate addition. After one week, the COD in the effluent decreased from 1000-1200 mg/L to 300-350 mg/L.

This residual effluent COD corresponded to non-biodegradable organic substances. The organic substrate provided by the industrial effluents was thus considered negligible at this time and was not taken into account for the CE calculation.

2.4. Microbial community analysis

Microbial populations were analysed using 16S rDNA amplification followed by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE). Biofilms were scratched from the electrodes and bacterial DNA was extracted and stored at -80°C before analysis. 16S rRNA gene fragments were amplified from extracted DNA using a nested PCR approach as described by Haichar *et al.* in 2008 (Haichar *et al.*, 2008). Briefly, the first PCR amplification step was performed using universal bacterial primers fd1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', position 8-27 of the *E. coli rrs* gene), and S17 (5'-GTTACCTTGTTACGACTT-3'), position 1492-1509 of the *E. coli rrs* gene). For the second PCR step, PCR products were amplified using primers 375f-GC (Muyzer *et al.*, 1993) and S10 (Table S1) to generate 584 bp products for DGGE analysis. Products were checked by electrophoresis in 2 % agarose gels.

Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) fingerprinting of PCR products was carried out using the Dcode Universal Mutation Detection System (BIO-Rad Laboratories, France) according to (Haichar *et al.*, 2008). Certain bands of interest were excised and DNA was eluted and amplified. PCR products were sequenced at Genome express (Meylan, France) and sequences were analysed by the BLASTN search tool (Altschul *et al.*, 1990) to determine sequence homology and to search for similar sequences in the GenBank database.

3. Results and discussion

3.1. Primary, secondary and tertiary biofilms formed at lower applied potential.

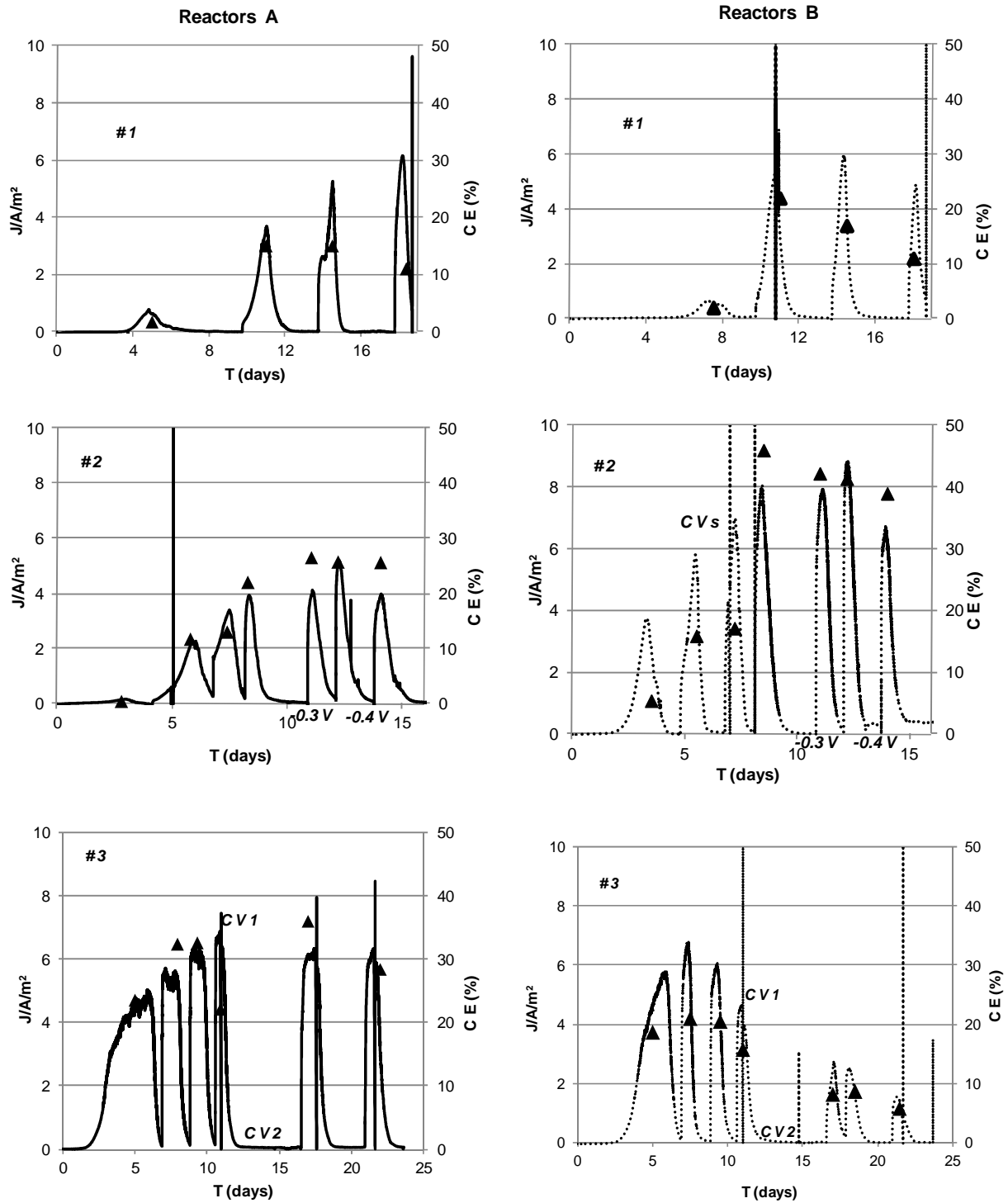


Figure 1: Current density (lines, right Y-axis) and coulombic efficiencies (points, left Y-axis) recorded during the formation of the primary, secondary and tertiary anodes, with additions of 5 mM acetate. The initial source of microorganisms was the paper machine wastewater (reactors A, left column) or the same effluent after clarification (reactors B, right column); #1) primary biofilms at -0.2 V/SCE; #2) secondary biofilms initially at -0.2 V/SCE, potential changes are indicated on the X-axis, N_2 sparging was started in reactor B#2 on day 8; acetate additions of 2.5 mM from day 8; #3) tertiary biofilms at -0.4 V/SCE under N_2 sparging in both reactors from the beginning.

Two primary biofilms were formed in parallel on graphite electrodes polarised at -0.2 V/SCE and immersed in 250 mL effluent from a papermaking unit mixed with 200 mL of low-concentration

synthetic medium. The effluent collected from the filtrate of the paper machine water was used in reactor A#1 and the clarified waste water in reactor B#1 (Figure 1A). The current increased after an initial lag period of a few days as commonly observed for the formation of electroactive biofilm on polarised electrodes. The current then decreased due to acetate depletion and successive additions of 5 mM acetate generated similar current peaks, which indicated that, from the point of view of electrochemical catalysis, the biofilms reached maturity with only two acetate additions. The two inoculum samples (effluent from the paper machine or after clarification) did not lead to any significant difference. Considering the second to fourth acetate additions, the maximum current densities provided were 5.5 A/m^2 on average (6 measurements from 3.8 to 6.8 A/m^2) and Coulombic efficiencies were from 11% to 22%. The low Coulombic efficiencies could have been predicted by considering the experimental set-up chosen: a working electrode of small surface area (10 cm^2) in a large volume of solution (450 mL). From a general point of view, these operating conditions minimize the effects of the variation in composition of the bulk solution due to the electrochemical reactions. A small surface area of the working electrode is optimal from the standpoint of electrochemical analysis but it obviously does not promote high coulombic efficiencies, particularly when homogeneous reactions occur, as was the case here.

The primary biofilms were removed from the anode surfaces and used to inoculate two new electrochemical reactors filled with 250 mL of filtered effluents and 200 mL of synthetic medium. Electrodes were polarised at -0.2 V/SCE (Figure 1, reactors A#2 and B#2). The initial lag period was reduced in comparison to the primary biofilms and performances until day 8 were similar to those of the primary biofilms. At day 8, two effects were studied simultaneously: acetate addition was reduced from 5 to 2.5 mM in both reactors, and reactor B#2 was placed under continuous nitrogen bubbling. The reduction of acetate concentration did not decrease the current density, indicating that substrate was not limiting. In contrast, nitrogen bubbling in reactor B#2 had a clear effect on CE, which increased to 47%, while reactor B#1 remained at 21%. Nitrogen bubbling clearly stabilized the CE at higher values. Nitrogen established anoxic conditions, which prevented the oxidation of acetate by aerobic bacteria in the bulk, resulting in lower competition against the anode respiring bacteria.

From day 11, the applied potential was changed to -0.3 and then -0.4 V/SCE . The performance of both electrodes remained stable with a current density of $7.5 \pm 1 \text{ A/m}^2$ and CE of $40 \pm 2\%$ for reactor B#2 under N_2 bubbling and a current density of $4.5 \pm 0.5 \text{ A/m}^2$ and CE $26 \pm 2\%$ for reactor A#2 not subjected to N_2 .

Secondary biofilms were used to inoculate third electrochemical reactors with a potential of -0.4 V/SCE applied from the start (Figure 1, #3). Acetate concentration was brought back to 5 mM and N_2 was continuously bubbled into both reactors (A#3 and B#3). Both tertiary electrodes showed remarkable performance; they provided current densities in the 4.5 to 6.8 A/m^2 range (8 measurements) at a potential as low as -0.4 V/SCE . After a 5-day deficiency of substrate, one anode showed a remarkable robustness by immediately recovering the same level of current when the substrate was provided again. However, in similar conditions the second anode recovered only around 50% of the current.

Finally, the formation of the two primary biofilms was attempted with the optimal conditions defined here, i.e. an applied potential of -0.4 V/SCE and continuous nitrogen bubbling. For the formation of primary biofilms, the 250-mL effluent samples, which served as inoculum sources, were obviously not filtered. No significant current was recorded after 28 days of polarisation and 4 successive additions of

5 mM acetate (results not shown). Current density was always lower than 0.03 A/m^2 for both experiments. The potential of -0.4 V/SCE was consequently too low to allow microbial anodes to form directly from the raw effluents.

In summary, forming primary biofilms directly at -0.4 V/SCE did not produce current. Using primary biofilms formed at -0.2 V/SCE as inocula led to secondary biofilms that provided significant current when the potential was decrease to -0.4 V/SCE . Finally, it was possible to form tertiary biofilms directly at -0.4 V/SCE using the secondary biofilms as inocula.

3.2. Analysis of the catalytic cyclic voltammetry (CV)

So-called catalytic voltammetry is voltammetry recorded when the substrate is present at a significant concentration in solution. The quality of the tertiary microbial anodes formed at -0.4 V/SCE can be assessed from the cyclic voltammetry (CV) curves recorded at day 11, when the current was maximal (CV1, Figure 2, A#3 and B#3). On each CV curve, the current densities measured at -0.4 V/SCE (6.2 A/m^2 and 4.1 A/m^2 for reactors A#3 and B#3, respectively) were similar to the current densities obtained during chronoamperometry (6.8 A/m^2 and 4.5 A/m^2 for reactors A#3 and B#3). The scan rate of 1 mV/s was consequently low enough to represent the stationary characteristics of the electrode. The voltammograms recorded in the absence of substrate (CV2, Figure 2) confirmed that the current was due to acetate oxidation. The two CV1 plotted in Figure 2 corresponded to the highest and lowest values of current (6.8 A/m^2 and 4.5 A/m^2) recorded during the first two weeks of polarisation. They exhibited some difference in electrochemical kinetics: the best anode (A#3) was able to provide up to 13 A/m^2 at 0.0 V/SCE (average of the values measured on the oxidation and reduction scans), while the other (B#3) reached only 5 A/m^2 at the same potential. Nevertheless, both anodes exhibited interesting performance at potential values as low as -0.4 V/SCE .

The current densities obtained here were among the highest reported in the literature for comparable conditions. Obviously, higher values have been reported (for a review see Liu *et al.*, 2010) but most of them have been obtained at higher temperature (40°C , whereas experiments were performed here at 25°C) or with three-dimensional electrodes (felts, brushes, granule beds, porous structures, etc.). For example, up to 30.8 A/m^2 (Chen *et al.*, 2011) has been reached on three-dimensional fibre electrodes taking advantage of the optimal porosity of the electrode structure. Nevertheless, this current density expressed with respect to the projected surface area cannot be straightforwardly compared to the current density obtained here on smooth electrode surfaces. For instance, up to 66 A/m^2 has been reported with electroactive biofilms formed around ultra-microelectrodes (Pocaznoi *et al.* 2012). In this case, the particular electrochemical properties of the ultra-microelectrodes were responsible for the high current density obtained, but the same biofilms developed on conventional macro-sized electrodes gave current density of only 7 A/m^2 . The maxima obtained here, in the range 4.5 to 6.8 A/m^2 at -0.4 V/SCE (5 to 13 A/m^2 at 0.0 V/SCE) on flat graphite electrodes without any surface treatment and without enhanced roughness can be attributed to the remarkable electroactivity of the biofilms formed.

Comparison of the CV of the tertiary anode with the CV of the secondary biofilm formed at -0.2 V/SCE (CVs, Figure 2) emphasized the improved quality of the tertiary anode. The secondary anode exhibited an open circuit potential of only -0.48 V/SCE , while the tertiary anode open circuit potential was -0.6 V/SCE . In consequence the secondary anode polarised at -0.2 V in reactor B#2 was able to produce less than 2 A/m^2 at -0.4 V/SCE on day 8. Progressive reduction of the applied potential

allowed this biofilm to produce up to 6 A/m². The procedure described here, of re-inoculating and concomitantly lowering the applied potential, clearly improved the electrochemical quality of the microbial anodes.

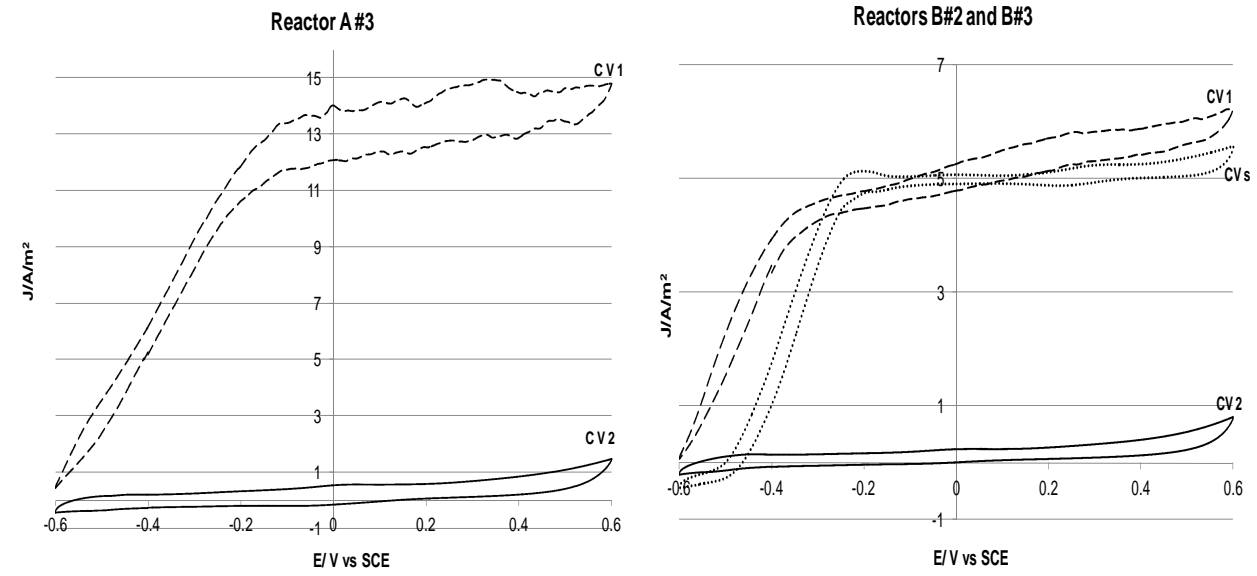


Figure 2: Cyclic voltammograms at 1 mV/s with the tertiary electrodes: CV1 were recorded at day 11, and CV2 at day 15 as indicated in Figure 1 (reactors A#3 and B#3). CVs was recorded at day 8 with the secondary biofilm formed at -0.2 V/SCE in reactor B#2.

3.3. pH evolution

During the polarisation experiments, the pH of the media always varied towards higher values. For example, the pH evolution during the secondary biofilm formation illustrated this general trend: the pH rose in similar way in both reactors from day 1 to day 5 (from 7.5 to 8.4 or 8.7 in reactors A and B, respectively). Then the pH reached higher values in reactor B, in which N₂ bubbling was started at day 8 (pH of 9.6 in B against 8.9 in A without N₂ bubbling). The pH changed to alkaline values during each experiment and nitrogen bubbling increased the alkalisation rate. The alkalisation cannot be explained by the electrochemical reactions. Actually, the anode biofilm oxidised acetate into carbon dioxide



which hydrolysed into hydrogen carbonate:



Combining Equations 1 and 2 leads to



9 protons were produced per 8 electrons. In comparison, the cathode achieving the reduction of water in anoxic conditions



or the reduction of oxygen in non-anoxic conditions



produced 8 hydroxyl ions per 8 electrons. The electrochemical reactions globally contributed to a slight acidification of the medium (1 proton produced per 8 electrons). Consequently, alkalisation of the bulk was not linked to the electrochemical reactions.

In order to confirm that the electrochemical reactions were not responsible for alkalisation, experiments were performed in the absence of electrodes. The pH of the effluent/synthetic medium (250/200 mL) mixture was monitored in three parallel reactors that did not contain electrodes, under three different conditions: i) without stirring and without N₂ bubbling; ii) with mechanical stirring and without N₂ bubbling, and iii) with N₂ bubbling and without stirring.

5 mM acetate was added at days 0, 5, 8 and 12 to remain close to the operating conditions of the polarisation experiments. The initial pH of 7.0 rose to alkaline values in each of the 3 reactors and stabilized after 15 days at 7.7 ± 0.1 , 8.05 ± 0.05 and 8.9 ± 0.1 (average values between days 12 and 15) in reactors i), ii) and iii) respectively. It was thus confirmed that alkalisation was not due to the electrochemical reactions but occurred spontaneously in the effluent. Such a spontaneous pH drift has rarely been reported in the literature because studies have generally used buffered conditions. In contrast, alkalisation was evidenced here because only minimal supplementation was used, which did not mask the real behaviour of the effluent during operation. The phosphate concentration of 2.2 mM of added phosphate in the (250/200 mL) mixture could not have a significant buffer effect and could not maintain the pH at its initial neutral value.

The progressive pH drift to alkaline values observed under nitrogen bubbling and, to a lesser extent, mechanical stirring, are explained by the extraction of carbon dioxide from the solution. Removing carbon dioxide from the solution shifted the acid-base equilibrium of carbonate species:



towards alkalisation. Obviously, N₂ bubbling was more efficient than simple mechanical stirring with a magnetic barrel because N₂ bubbling further reduced the partial CO₂ pressure compared to stirring under atmospheric conditions.

Generally, bacteria require pH close to neutrality for optimal growth (Jadhav and Ghangrekar, 2009; Gil *et al.*, 2003). In this work, pH reached values up to 9.5 at the end of the experiments with continuous N₂ bubbling. Given the high current density obtained, it can be concluded that the microbial anodes were well suited to effluent alkalisation. Actually, high pH values increase the standard potential of acetate, which is -0.63 V/SCE at pH 9.0. The maximal Gibb's energy available for bacterial growth is proportional to the difference between electrode potential and the formal potential of the electron donor. The open circuit potential around -0.60 V/SCE observed on CV curves (Figure 2), only 30 mV above the formal potential of acetate oxidation, was a first mark of the high electrocatalytic ability of the anode respiring bacteria present in the biofilm. Moreover, under the applied potential of -0.4 V/SCE they were able to grow and transfer electrons to the electrode by exploiting a potential drop of only 230 mV.

A few studies have observed that MFCs can provide high current under alkaline conditions (Rozendal *et al.*, 2008; Fan *et al.*, 2007). An air-cathode MFC has been shown to tolerate a feed electrolyte having a pH of up to 10, the highest current being reached at pH 9 (He *et al.*, 2008). Puig *et al.* (2010) have suggested that pH 9.5 may be considered optimal for an MFC to generate current from urban wastewaters (Puig *et al.*, 2010). Zhuang *et al.* have shown that microorganisms can oxidise organic matter under highly alkaline conditions up to pH 10 in an air-cathode two-chamber MFC (Zhuang *et al.*, 2010). According to the results described in the present work, studies using unbuffered media should be favoured now because of their interest for operating microbial fuel cells without adding large amounts of buffering compounds.

3.4. Evolution of microbial community in primary, secondary and tertiary biofilms analysed by DGGE and non-turnover CV

DGGE analyses of microbial communities showed a drastic selection from the primary to tertiary biofilms with *Geobacter metallireducens*, *Desulfuromonas sp.* and *Geobacter sulfurreducens* as dominant species (Figure 3). These bacteria are classically known to have anode respiring properties. They are able to implement the most efficient electron transfer pathways by direct electron transfer to the electrode without the need for a diffusible redox mediator (Logan, B., 2009). The potential of -0.2 V/SCE was consequently low enough to select to the most efficient anode respiring bacteria (Torres *et al.*, 2009). No significant difference was observed between the two effluent samples before and after the clarification step.

The secondary biofilms showed remarkable modifications of the microbial populations with respect to the primary ones. Most *Geobacter* species no longer appeared among the dominant species (only *Geobacter sulfurreducens* remained in reactor A#2), while other species identified as *Bacterioidetes* and *Clostridium sp.* emerged in reactor B#2. These species have already been identified in electroactive biofilms formed from activated sludge (Torres *et al.*, 2009) and marine environments (Erable *et al.*, 2009). From the secondary biofilms, a common band appeared which was present for both electrodes. This band corresponded to *Desulfuromonas acetexigens*, a bacterium described in 1994 as an obligate anaerobic sulphur-reducing eubacterium that exclusively used acetate as energy and carbon source (Finster *et al.*, 1994). In the tertiary biofilms, *Geobacter sp.* were no longer detected and *Desulfuromonas acetexigens* was the single dominating species in both biofilms.

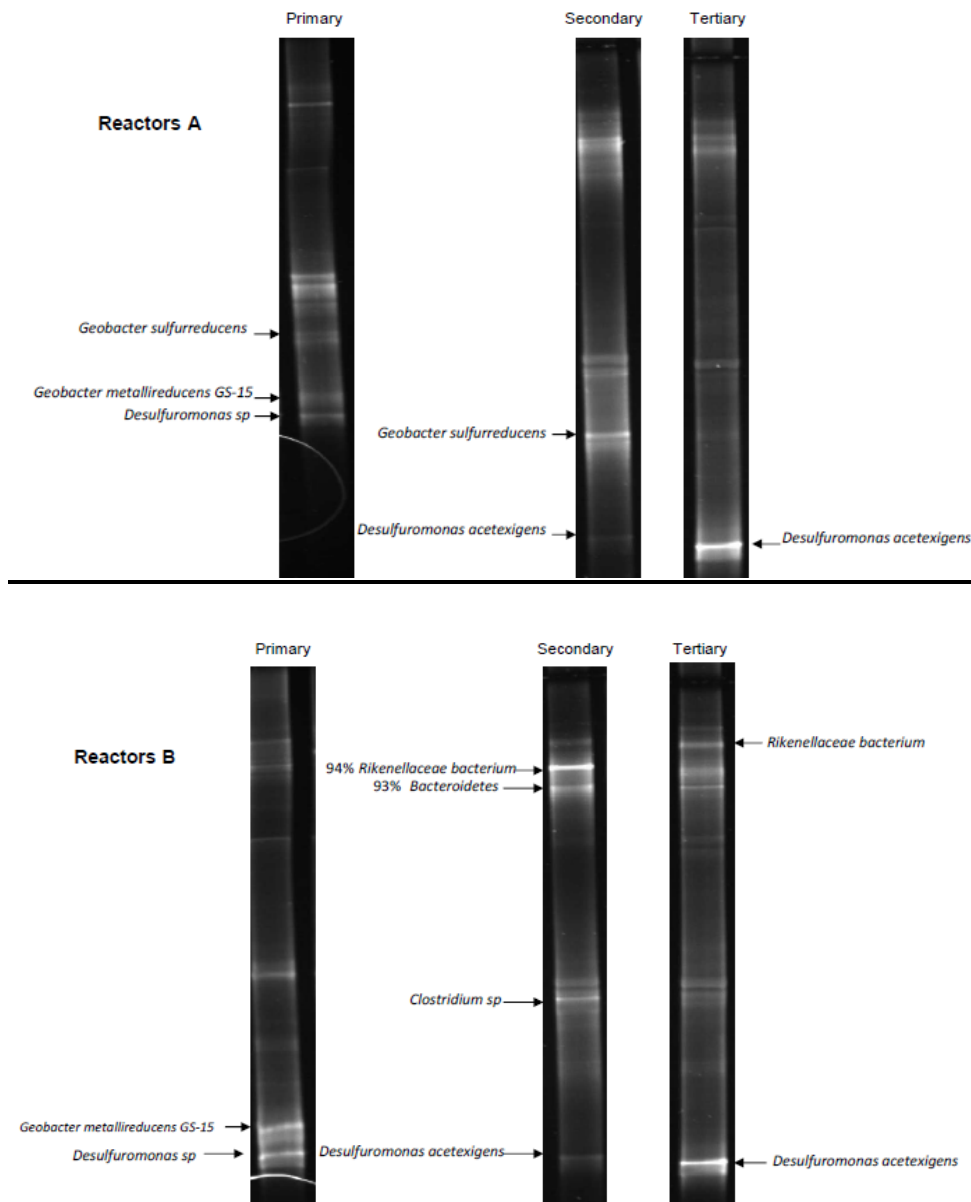


Figure 3: Evolution of DGGE profiles based on 16S rRNA genes PCR-amplified from bacteria forming primary, secondary and tertiary biofilms.

The negative selection of *Geobacter sp.* with re-inoculation was confirmed by the non-turnover CV recorded on primary, secondary and tertiary biofilms at the end of polarisation (Figure 4). So-called non-turnover CVs are recorded when the substrate is depleted. They thus give a comprehensive view of the redox compounds contained in the biofilms that can be addressed by the electrode (Fricke *et al.*, 2008; Harnisch and Freguia, 2012). The strong peaks around -0.4 V/SCE (-0.16 V/SHE) can be attributed to *Geobacter sp.* by comparison to the CV curves reported in the literature with pure culture of *Geobacter sulfurreducens* (Marsili *et al.*, 2008). These peaks decreased from the primary to the secondary electrodes and disappeared completely from the tertiary electrodes. The low potential of -0.4 V/SCE to which the secondary biofilms were exposed (from day 11) and at which the tertiary biofilms were formed, was doubtless responsible for the vanishing of the *Geobacter species* from the

microbial communities. Moreover, *Geobacter sp.* are known to have optimal growth around pH 6.8 (Fricke *et al.*, 2008; Marsili *et al.*, 2008) and the high pH values observed here would also have hindered their development. The electrochemical and DGGE analyses converged in showing that *Geobacter* disappeared from primary to secondary biofilms. This suggested that *Desulfuromonas acetexigens* was probably the bacterium responsible for the high current density obtained here with the tertiary electrodes at low potential and alkaline pH. Nevertheless, the numerical abundance of bacteria in biofilms is not, a priori, correlated with the capacities of the predominant species for high power production (Kiely *et al.*, 2011). Therefore, isolation and electrochemical testing of the isolate are needed to confirm this hypothesis.

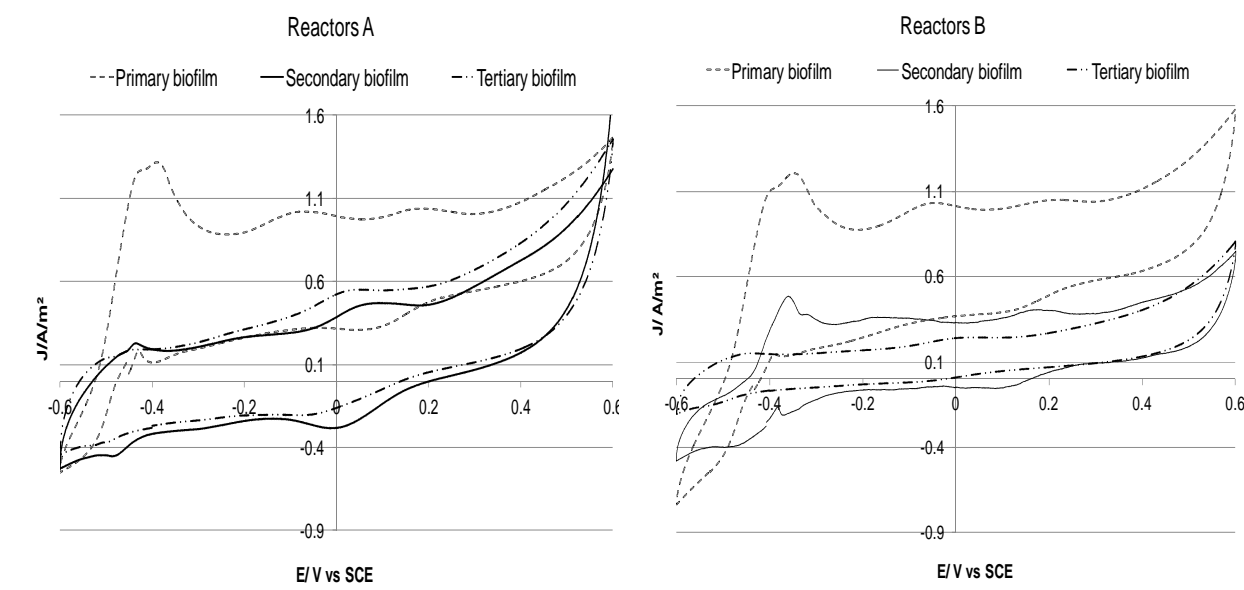


Figure 4: Non-turn-over CVs performed at 1 mV/s recorded at the end of each polarisation period for reactors A and B.

4. Conclusion

The electroactive biofilms formed by successive scratching and re-inoculation steps while lowering applied potential provided high current density (6A/m^2 on smooth electrode surfaces) at low potential (-0.4 V/SCE) and alkaline pH (around 9), which is of great interest for operating microbial fuel cells from pulp and paper effluents without adding buffering compounds. Such biofilms could not be formed by applying low potential from the first step of primary biofilm formation. To our knowledge, this is the first time that such a procedure has been used and it may explain why *Desulfuromonas acetexigens* has not been identified before in electroactive biofilms.

Acknowledgements

This work was achieved in the framework of the “Agri-Elec (ANR-008-BioE-001)” project supported by the French National Research Agency (ANR).

References

1. Aelterman, P., Freguia, S., Keller, J., Verstraete, W., Rabaey, K., 2008. The anode potential regulates bacterial activity in microbial fuel cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 78, 409-418.
2. Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403-410.
3. Chen, S., Hou, H., Harnisch, F., Patil, S.A., Carmona-Martinez, A.A., Agarwal, S., Zhang, Y., Sinha-Ray, S., Yarin, A.L., Greiner, A., Schröder, U., 2011. Electrospun and solution blown three-dimensional carbon fiber nonwovens for application as electrodes in microbial fuel cells. *Energy Environ. Sci.* 4, 1417-1421.
4. Cheng, S., Kiely, P., Logan, B., 2011. Pre-acclimation of a wastewater inoculum to cellulose in an aqueous-cathode MEC improves power generation in air-cathode MFCs. *Biores. Technol.* 102, 367-371
5. Erable, B., Roncato, M., Achouak, W., Bergel, A., 2009. Sampling Natural Biofilms: A New Route to Build Efficient Microbial Anodes. *Environ. Sci. Technol.* 43, 3194-3199.
6. Fan, Y., Hu, H., Liu, H., 2007. Sustainable Power Generation in Microbial Fuel Cells using Bicarbonate buffer and Proton Transfer Mechanisms. *Environ. Sci. Technol.* 41, 8154-8158.
7. Finster, K., Bak, F., Pfennig, N., 1994. *Desulfuromonas acetexigens* sp. nov., a dissimilatory sulfur-reducing eubacterium from anoxic freshwater sediments. *Arch. Microbiol.* 161, 328-332.
8. Fricke, K., Harnisch, F., Schroder, U., 2008. On the use of cyclic voltammetry for the study of anodic electron transfer in microbial fuel cells. *Energy Environ. Sci.* 1, 144-147.
9. Gil, G., Chang, I., Kim, B.H., Kim, M., Jang, J-K., Park, H.S., Kimet, H.J., 2003. Operational parameters affecting the performance of a mediator-less microbial fuel cell. *Biosens. Bioelectron.* 18, 327-334.
10. Haichar, F.E.Z., Marol, C., Berge, O., Rangel-Castro, J.I., Prosser, J.I., Balesdent, J., Heulin, T., Achouak, W., 2008. Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. *ISME J.* 2, 1221-1230.
11. Harnisch, F., Freguia, S., 2012. A Basic Tutorial on Cyclic Voltammetry for the Investigation of Electroactive Microbial Biofilms. *Chem. Asian J.* 7, 466-475
12. Harnisch, F., Koch, C., Patil, S.A., Hübschmann, T., Müller, S., Schröder, U., 2011. Revealing the electrochemically driven selection in natural community derived microbial biofilms using flow-cytometry. *Energy Environ. Sci.* 4, 1265-1267.
13. He, Z., Huang, Y., Manohar, A.K., Mansfeld, F., 2008. Effect of electrolyte pH on the rate of the anodic and cathodic reactions in an air-cathode microbial fuel cell. *Bioelectrochem.* 74, 78-82.
14. Huang, L., Logan, B., 2008a. Electricity generation and treatment of paper recycling wastewater using a microbial fuel cell. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80, 349-355
15. Huang, L., Logan, B., 2008b. Electricity production from xylose in fed-batch and continuous-flow microbial fuel cells, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80, 655-664.
16. Jadhav, G., Ghangrekar, M., 2009. Performance of microbial fuel cell subjected to variation in pH, temperature, external load and substrate concentration. *Bioresour. Technol.* 100, 717-723.

17. Kiely, P.D., Call, D.F., Yates, M.D., Regan, J.M., Logan, B.E., 2011. Anodic biofilms in microbial fuel cells harbor low numbers of higher-power-producing bacteria than abundant genera. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 88, 371-380
18. Kim, J.R., Min, B., Logan, B.E., 2005. Evaluation of procedures to acclimate a microbial fuel cell for electricity production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68, 23-30.
19. Kim, B.H., Chang, I.S., Gadd, G.M., 2007. Challenges in microbial fuel cell development and operation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76, 485-494.
20. Liu, Y., Harnisch, F., Fricke, K., Sietmann, R., Schröder, U., 2008. Improvement of the anodic bioelectrocatalytic activity of mixed culture biofilms by a simple consecutive electrochemical selection procedure, *Biosens. Bioelectron.* 24, 1006-1011.
21. Liu, Y., Harnisch, F., Fricke, K., Schöder, U., Ciment, V., Feliu, J.M., 2010. The study of electrochemically active microbial biofilms on different carbon-based anode materials in microbial fuel cells. *Biosens. Bioelectron.* 25, 2167-2171
22. Logan, B., 2009. Exoelectrogenic bacteria that power microbial fuel cells. *Nat. Rev.* 7, 375-381
23. Marsili, E., Rollefson, J.B., Baron, D.B., Hozalski, R.M., Bond, D.R., 2008. Microbial Biofilm Voltammetry: Direct Electrochemical Characterization of Catalytic Electrode-Attached Biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 7329-7337.
24. Mathuriya, A.S., Sharma, V.N., 2009. Bioelectricity production from paper industry waste using a microbial fuel cell by *Clostridium* species. *J. Biochem. Tech.* 1, 49-52.
25. Muyzer, G., De Waal, E.C., Uitterlinden, A.G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 695 -700.
26. Pant, D., Bogaert, G.V., Diels, L., Vanbroekhoven, K., 2009. A review of the substrates used in microbial fuel cells (MFCs) for sustainable energy production. *Bioresour. Technol.* 101, 1533-1543.
27. Pocaznoi, D., Erable, B., Delia, M., Bergel, A., 2012. Ultra microelectrodes increase the current density provided by electroactive biofilms by improving their electron transport ability. *Energy Environ. Sci.* 5, 5287-5296
28. Puig, S., Serra, M., Coma, M., Cabré, M., Balaquer, M.D., Colprim, J., 2010. Effect of pH on nutrient dynamics and electricity production using microbial fuel cells. *Bioresour. Technol.* 101, 9594-9599.
29. Rabaey, K., Boon, N., Siciliano, S.D., Verhaege, M., Verstraete, W., 2004. Biofuel cells select for microbial consortia that self-mediate electron transfer. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 5376-5382.
30. Rozendal, R.A., Sleutels, T., Hamelers, H., Buisman, C.J.N., 2008. Effect of the type of ion exchange membrane on performance, ion transport, and pH in biocatalysed electrolysis of wastewater. *Water Sci. Technol.* 57, 1757-1762.
31. Srikanth, S., Mohan, S.V., Sarma, P., 2010. Positive anodic poised potential regulates microbial fuel cell performance with the function of open and closed circuitry. *Bioresour. Technol.* 101, 5337-5344.

32. Torres, C.I., Krajmalnik-Brown, R., Parameswaran, P., Marcus, A.K., Wanger, G., Gorby, Y.A., Rittmann, B.E., 2009. Selecting Anode-Respiring Bacteria Based on Anode Potential: Phylogenetic, Electrochemical, and Microscopic Characterization. *Environ. Sci. Technol.* 43, 9519-9524.
33. Yi, H., Nevin, K.P., Kim, B.C., Franks, A.E., Klimes, A., Tender, L.M., Lovley, D.R., 2009. Selection of a variant of *Geobacter sulfurreducens* with enhanced capacity for current production in microbial fuel cells. *Biosens Bioelectron.* 24, 3498-3503.
34. Wang, A., Sun, D., Ren, N., Liu, C., Liu, W., Logan, B., Wu, W., 2010. A rapid selection strategy for an anodophilic consortium for microbial fuel cells. *Bioresour. Technol.* 101, 5733-5735.
35. Zhuang, L., Zhou, S., Li, Y., Yuan, Y., 2010. Enhanced performance of air-cathode two-chamber microbial fuel cells with high-pH anode and low-pH cathode. *Bioresour. Technol.* 101, 3514-3519.

III.2.4.1.3. Commentaires sur l'article N°2

Les résultats essentiels présentés dans l'article 2 sont les suivants:

❖ Les performances des biofilms EA secondaires repiqués au même potentiel (-0,2 V) présentent un démarrage plus rapide par rapport au biofilm primaire. On observe néanmoins une même activité catalytique pour l'oxydation de l'acétate.

❖ Les baisses progressives du potentiel semblent être appropriées pour former des biofilms EA de plus en plus performants. On a ainsi observé que les biofilms formés à -0,2 V repiqués au même potentiel et progressivement acclimatés jusqu'à -0,4 V pouvaient ensuite être repiqués directement à -0,4 V pour former un biofilm tertiaire avec des performances égales ou améliorées. Par contre lorsque le biofilm primaire est formé directement à -0,4 V les densités de courant restent très faibles, inférieures à 0,03 A/m² après un mois de polarisation et 4 ajouts d'acétate. Ce potentiel est donc trop faible pour la formation d'anodes microbiennes directement à partir de l'effluent brut. Il devient cependant possible de former des biofilms EA efficaces à ce faible potentiel grâce à des séries de repiquage et une acclimatation progressive du biofilm aux potentiels de plus en plus faibles. Ceci semble un résultat original qui n'a pas encore été reporté dans la bibliographie.

❖ Le barbotage d'azote dans le réacteur stabilise les performances des biofilms à des fortes valeurs. En effet, l'azote établit des conditions anoxiques qui empêchent la compétition de l'oxydation de l'acétate entre les micro-organismes électro-actifs du biofilm et les micro-organismes planctoniques aérobies (aéro-anaérobie facultative) contenus dans l'effluent.

III.2.4.1.4. Résultats complémentaires non présentés dans l'article N°2.

Deux biofilms primaires ont été formés à partir de l'effluent collecté en entrée du traitement biologique l'un au potentiel de -0,2 V et l'autre à +0,2 V. Pour le second, après 19

jours et 5 ajouts successifs d'acétate, la densité de courant maximale est de seulement 0,2 A/m². Il présente ainsi des performances 30 fois plus faibles dans les mêmes conditions d'expérience que celles du biofilm primaire formé à -0,2 V (près de 6 A/m²). Ces performances trop faibles ne nous ont pas encouragé à continuer à investiguer ce biofilm. On peut donc conclure qu'avec cet effluent, les potentiels élevés ne permettent pas d'obtenir de biofilms EA ayant des performances acceptables.

Pour juger de l'effet de la nature de l'inoculum sur la formation des biofilms EA, deux sources d'inoculum très proches ont été comparées. L'effluent de machine à papier a été additionné de deux biofilms collectés en deux points différents des équipements : l'un des biofilms a été récupéré au niveau du clarificateur de la station d'épuration (STEP), l'autre a été récupéré au niveau de l'encrassement de la machine à papier (MaP) (*Figure 4I*). C'est le premier échantillon, c'est-à-dire l'effluent enrichi du biofilm collecté au niveau du clarificateur qui a servi de base aux expériences décrites dans l'article N°2. Au contraire, le second échantillon semble inadéquat pour la formation de biofilms EA. En effet, après 18 jours d'expérience et 4 ajouts d'acétate dans des conditions opératoires similaires, les densités de courant et les rendements faradiques obtenus sont près de 30 fois inférieurs ($J_{\max} = 0,2$ A/m² et $R_f = 2\%$) à ceux obtenus dans l'article N°2 ($J_{\max} = 5,2$ A/m², $R_f = 15\%$) (*Tableau 6*).

| Biofilms | Potentiel (V) | J (A/m ²) | Rf (%) |
|--|---------------|-----------------------|--------|
| Effluent MaP : Biofilm R0' 4 ajouts d'acétate, 19 jours | - 0,2 | 0,4 | 2,2 |
| Effluent MaP: Biofilm R1' 3 ajouts d'acétate, 12 jours | -0,2 | 0,2 | 1,8 |
| Effluent entrée biologique : Biofilm R0' 4 ajouts d'acétate, 19 jours | 0,2 | 0,2 | 0,6 |

Tableau 6: Performances de différents biofilms électro-actifs R0' et R1' formés avec les échantillons Machine à Papier (MaP) et entrée biologique (EB) pas présentés dans l'article N°2.

De plus, à la fin de cette expérience l'abattement de la DCO est de seulement 25% alors qu'il était de près de 75% dans le cas précédent. Malgré un repiquage à plus bas potentiel les performances ne sont pas améliorées.

Avec cette expérience, on observe qu'un même effluent enrichi de 2 biofilms naturels prélevés à différents points d'un site papetier produit des biofilms EA avec des efficacités très différentes.

III.2.4.2. Echantillons du site N°3 prélevés en sortie de la station d'épuration

III.2.4.2.1. Référencement des biofilms formés et repiqués

La **Figure 42** présente l'organigramme de formation et de repiquage des biofilms issus des échantillons prélevés en sortie de la station d'épuration et complétés par 2 g/L de biofilm issu du clarificateur (STEP).

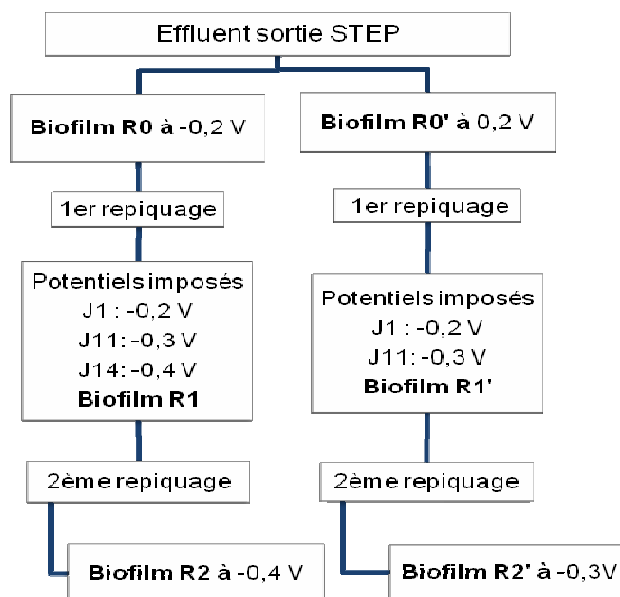


Figure 42: Référencement des biofilms EA formés à différents potentiels imposés à partir des effluents et biofilms de la station d'épuration du Site N°3.

III.2.4.2.2. Formation des biofilms électro-actifs primaires

Les biofilms primaires ont été obtenus sous 2 polarisations différentes: -0,2 et +0,2 V.

L'activité électrocatalytique des 2 biofilms démarre rapidement (3 jours). Après 2 semaines d'expérience (**Figure 43**), les performances du biofilm obtenu à plus faible potentiel -0,2 V sont plus importantes ($J_{\max} = 6,5 \text{ A/m}^2$ et $R_f = 18\%$) que celles du biofilm obtenu à potentiel plus élevé +0,2 V ($J_{\max} = 1 \text{ A/m}^2$ et $R_f = 6\%$). Cette expérience montre comme dans l'expérience précédente (*Cf* paragraphe III.2.4.1) qu'un potentiel élevé à l'anode ne favorise pas la formation de biofilms EA efficaces.

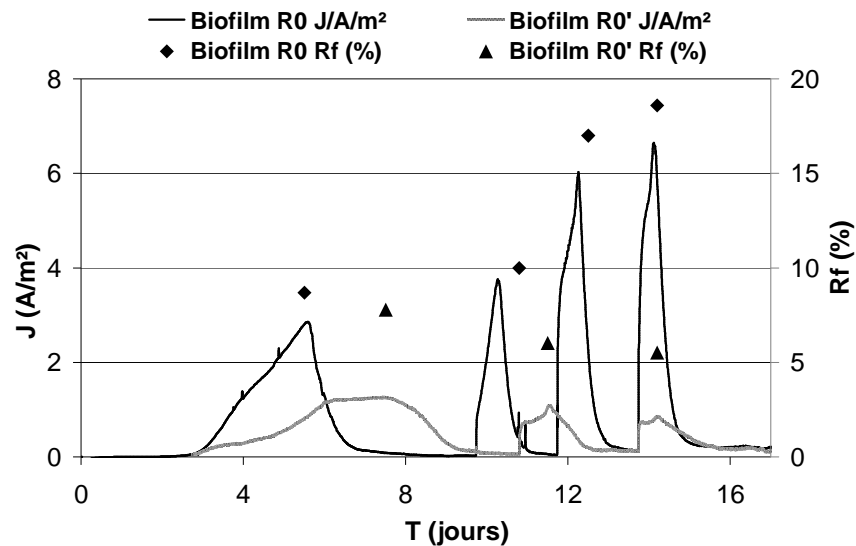


Figure 43: Biofilms primaires, étude de l'influence du potentiel imposé sur les densités de courant obtenues avec l'inoculum collecté en sortie de la station d'épuration du Site n°3. En noir : potentiel imposé -0,2 V, en gris : potentiel imposé 0,2 V.

Les biofilms primaires obtenus ci-dessus ont été utilisés pour inoculer de nouveaux réacteurs dans lesquels l'effluent a été préalablement filtré à 0,45 μm pour le débarrasser au maximum de micro-organismes.

III.2.4.2.3. Repiquages du biofilm primaire formé à -0,2V

❖ Premier repiquage au même potentiel (-0,2V)

Le biofilm primaire formé au potentiel de -0,2 V (Biofilm R0) a été utilisé pour inoculer un nouveau réacteur sous polarisation identique. Par rapport au biofilm primaire, le temps de latence est réduit de 3 à 1 jour (*Figure 44*). Dès le premier ajout d'acétate, les performances atteignent rapidement des valeurs élevées ($J_{\text{max}} = 4,2 \text{ A/m}^2$ et $R_f = 16\%$). L'abattement de DCO est de près de 65% et le pH à la fin de l'expérience de 8,15.

A partir du jour 11, le potentiel imposé passe à -0,3 V puis à -0,4 V au jour 14. On n'observe pas de changement des performances du biofilm avec ces baisses de potentiels. Seule la densité de courant diminue légèrement au potentiel de -0,4 V, passant d'un maximum de 5,8 à 4,2 A/m².

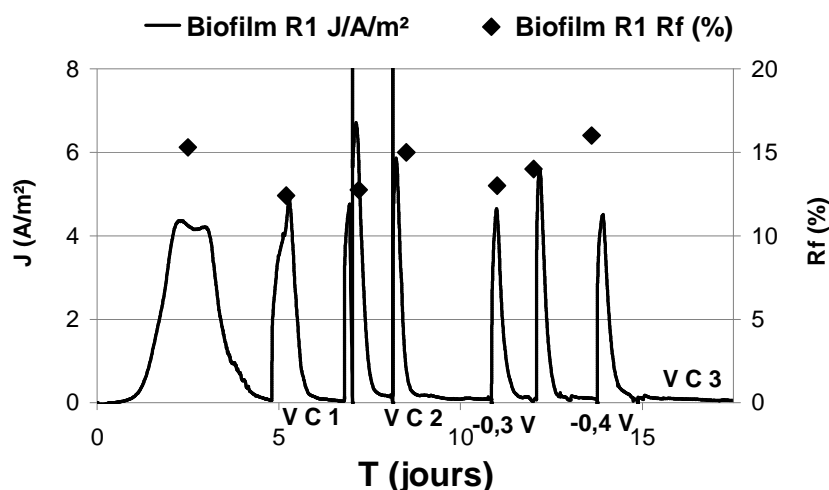


Figure 44: Biofilm secondaire: CA obtenue après repiquage du biofilm primaire de la **Figure 43**. Electrode de graphite polarisée à $-0,2V$, puis $-0,3$ et $-0,4V$.

Les VCs réalisées au début de l'expérience (Jour 0), n'ont pas présenté de courant à $-0,3$ V (courbes non présentées). Ceci indique que les pics d'oxydation **Figure 44** correspondent bien à l'oxydation de la matière organique contenue dans l'effluent par les biofilms EA. Les voltammétries cycliques (VCs) ont été réalisées au jour 7 (l'acétate est encore présent dans le milieu), au jour 8 (à la fin du pic d'acétate) et au jour 17 (à la fin de l'expérience). Ces différentes VCs sont présentées **Figure 45**. Au jour 7, l'acétate est toujours présent, les voltammétries sont alors dites catalytiques et elles correspondent à l'oxydation du substrat catalysée par les systèmes redox du biofilm. Lorsqu'il n'y a plus d'acétate en solution (jours 8 et 17), les VCs dites non-catalytiques, elles mettent en évidence les divers systèmes redox contenus dans le biofilm.

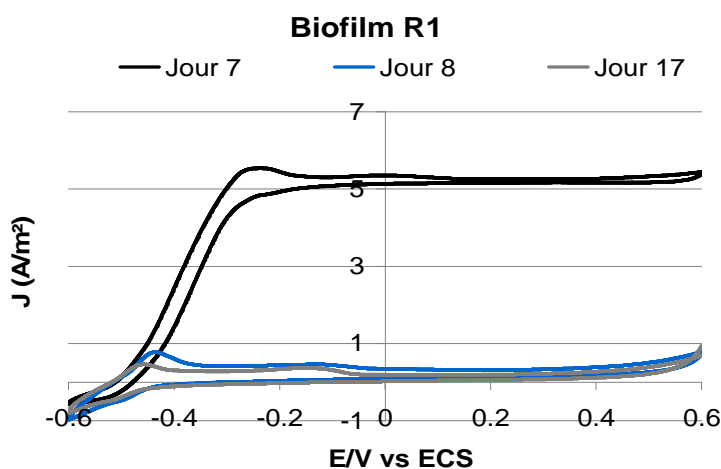


Figure 45: Voltammétries cycliques tracées aux instants indiqués sur la **Figure 44**. Elles sont réalisées à 1 mV/s à partir de $-0,4$ V entre $-0,6$ V et $0,6$ V.

A potentiel égal, les densités de courant observées sur ces voltammétries sont en accord avec les valeurs enregistrées en potentiel imposé. La VC tracée au jour 7 indique que le plateau de courant maximum est obtenu à partir de potentiels voisins de $-0,3$ V. Ceci explique la chute de courant sur la CA lorsque le potentiel imposé est passé à $-0,4$ V. Un léger pic d'oxydation est observé autour de $-0,35$ V. Il est caractéristique du biofilm naturel prélevé au niveau du clarificateur (biofilm STEP) car ce pic avait déjà été mis en évidence lors des expériences de formations de biofilms EA avec l'effluent MaP enrichit également avec ce biofilm (biofilm R0 *Figure 41*). (voir article N°2).

❖ Second repiquage du biofilm (R1) en abaissant le potentiel de $-0,2$ V à $-0,4$ V

Le biofilm préalablement formé à $-0,2$ V perd 90% de son efficacité lorsqu'il est repiqué à $-0,4$ V. En effet, après 3 semaines d'expérience et 3 ajouts d'acétate, l'activité catalytique reste faible ($J_{\max}=0,4$ A/m² et $R_{f\max}= 2,5\%$). Nous n'avons pas pu déterminer les raisons de cette chute drastique de performances.

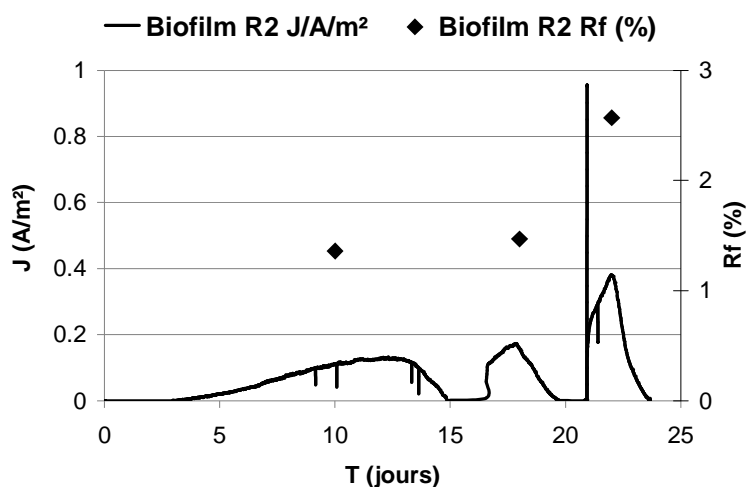


Figure 46: Biofilm tertiaire, CA obtenue après repiquage du biofilm R1 de la *Figure 44*. L'électrode de graphite est polarisée à $-0,4$ V.

III.2.4.2.4. Repiquages du biofilm primaire formé à $+0,2$ V

❖ Premier repiquage en abaissant le potentiel de $+0,2$ V à $-0,2$ V

Le biofilm primaire formé à $+0,2$ V est repiqué à plus bas potentiel $-0,2$ V (biofilm R1). Comme observé lors de tous les précédents repiquages, le démarrage est beaucoup plus rapide (un jour seulement) (*Figure 47*). Les performances passent d'une densité de courant maximale $J_{\max} = 1$ A/m² et d'un rendement faradique $R_f = 6\%$ pour le biofilm primaire à

$J_{\max} = 7 \text{ A/m}^2$ et $R_f = 20\%$ pour ce biofilm secondaire durant la première semaine de polarisation après 3 additions d'acétate. Étant donné le faible rendement faradique et la consommation rapide du substrat, une moyenne de 2 jours par injection de 5 mM d'acétate, nous avons décidé de maintenir le réacteur dans des conditions anaérobies pour limiter la compétition des bactéries planctoniques sur le biofilm EA pour la consommation de l'acétate. À partir du jour 8, et pendant une semaine, le réacteur est placé sous barbotage continu d'un mélange d'azote et de dioxyde de carbone (N_2/CO_2 , 80/20). On observe une augmentation immédiate de la densité de courant au-dessus de 8 A/m^2 et du rendement faradique à une valeur proche de 100%. Les performances restent élevées malgré la baisse du potentiel imposé à $-0,3 \text{ V}$ au jour 11. À partir du jour 15, le réacteur est placé sous barbotage d'azote pur, les performances restent constantes bien que le pH augmente dans le réacteur. En effet, le pH dans le réacteur évolue de 7,6 en début d'expérience jusqu'à 8,0 au jour 8. Lorsque le réacteur est placé sous barbotage continu de N_2/CO_2 , le pH baisse autour de 7,7 en raison de la génération d'acide carbonique due à la dissolution de dioxyde de carbone, et remonte jusqu'à 9,5 en fin d'expérience sous barbotage continu de N_2 pur. Cette évolution du pH au long de l'expérience n'affecte pas les performances de l'activité du biofilm EA qui gardent des valeurs élevées.

Cette capacité d'un biofilm à garder des performances élevées aussi bien à pH neutre qu'à pH basique est très intéressante pour la mise en œuvre des piles car la majorité des études réalisées jusqu'à présent montrent que le pH optimal pour un rendement maximal des biofilms EA dans les piles est proche de la neutralité (Gil *et al.* 2003; Jadhav et Ghangrekar 2009).

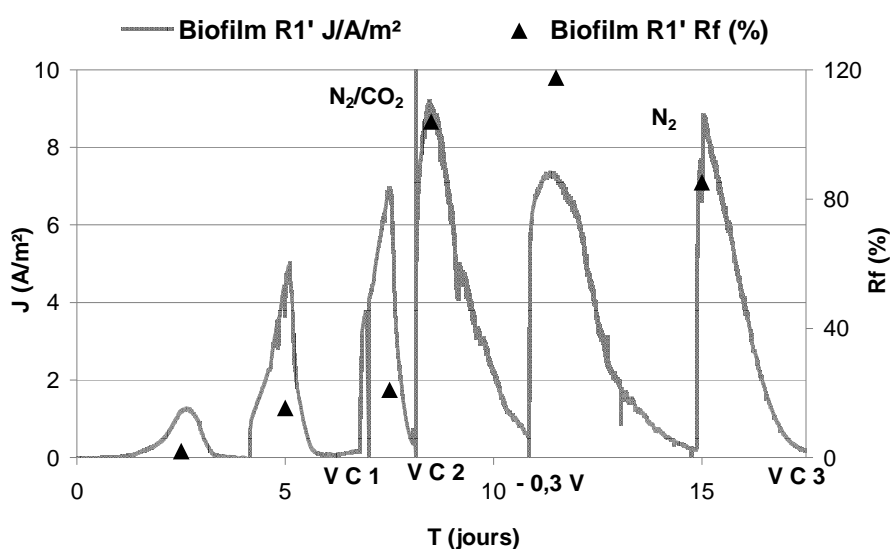


Figure 47: Biofilm secondaire : CA obtenue après repiquage du biofilm de la **Figure 43** formé à $0,2 \text{ V}$. L'électrode de graphite est polarisée à $-0,2 \text{ V/ECS}$. Au jour 11 le potentiel de l'électrode passe à $-0,3 \text{ V}$.

Des voltammétries cycliques ont été réalisées au jour 7 (VC catalytique), au jour 8 (à la fin du pic de courant) et au jour 17 (à la fin de l'expérience). Ces VCs sont présentées sur la **Figure 48**.

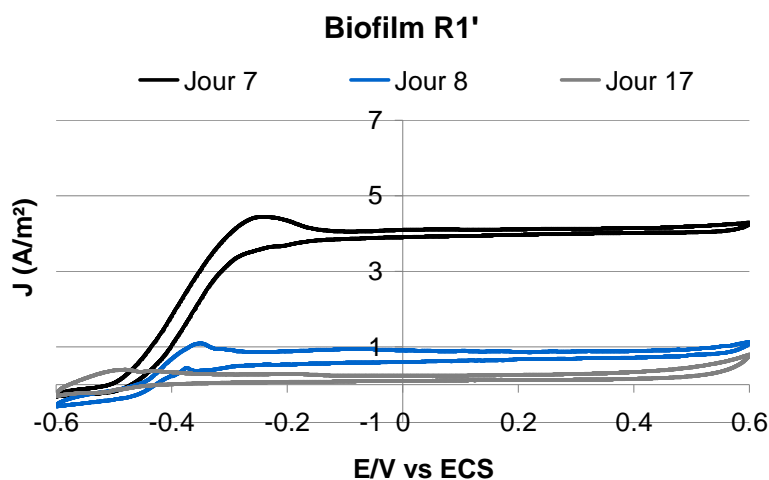


Figure 48: VCs obtenues avec l'électrode colonisée aux différents points indiqués sur la **Figure 47**. Elles sont réalisées à 1 mV/s à partir de -0,4V puis entre -0,6 V et 0,6 V.

Les densités de courant obtenues avec les VCs sont, à potentiel identique, en parfait accord avec celles enregistrées sous potentiel imposé juste avant de tracer les VCs. Un pic d'oxydation autour de -0,35 V est observé sur la voltammétrie non-catalytique tracée au jour 8 alors que l'acétate est presque entièrement consommé. Un pic similaire a déjà été observé sur les VCs effectuées avec le biofilm formé à partir de l'effluent de machine à papier (Figure 4, article N°2). Ce pic n'étant pas observé avec d'autres inocula, il pourrait indiquer une protéine caractéristique de ce biofilm. Toutefois il disparaît sur la voltammétrie réalisée lorsque le courant est totalement revenu à zéro, donc lorsque l'acétate a été complètement consommé. Le phénomène redox observé ici semble donc nécessiter la présence d'acétate.

❖ **Deuxième repiquage du biofilm en abaissant le potentiel de -0,2 V à -0,3 V**

Le biofilm secondaire (R1) a été utilisé pour inoculer un nouveau réacteur. Ce biofilm ayant été acclimaté au potentiel de -0,3 V à la fin de sa formation, le biofilm tertiaire (R2) est formé directement à ce potentiel. Nous avons observé que le maintien de conditions anaérobies dans le réacteur améliorerait de manière déterminante les performances EA du biofilm. Pour la formation de ce nouveau biofilm, un barbotage d'azote pur est choisi car le barbotage du mélange N₂/CO₂ réalisé précédemment n'a pas entraîné d'amélioration des performances. Le coût réduit de l'azote pur plaide également en sa faveur (28 euros pour 1 m³ de N₂ contre 200 euros pour 200 L du mélange N₂/CO₂ (Prix Air liquide)).

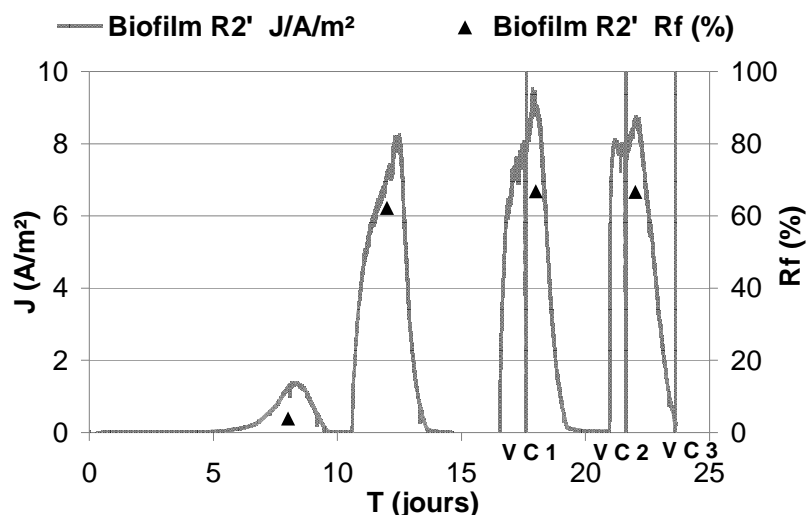


Figure 49: Biofilm tertiaire: CA obtenue après repiquage du biofilm (R1') de la **Figure 47**. L'électrode de graphite est polarisée à $-0,3$ V.

Les performances du biofilm tertiaire restent similaires à celles observées avec le biofilm secondaire au potentiel imposé de $-0,3$ V sous barbotage de N_2 (J_{max} entre 8 et 9 A/m^2 , R_f entre 60 et 70%). Un abattement de la DCO de près de 70% est obtenu. Le pH à la fin de l'expérience est de 9,3.

Comme indiqué sur la **Figure 49**, des voltammétries catalytiques sont réalisées aux jours 17 et 22 et une voltammétrie non catalytique au jour 25 à la fin de l'expérience lorsque l'acétate est épuisé. Elles sont présentées à la **Figure 50**.

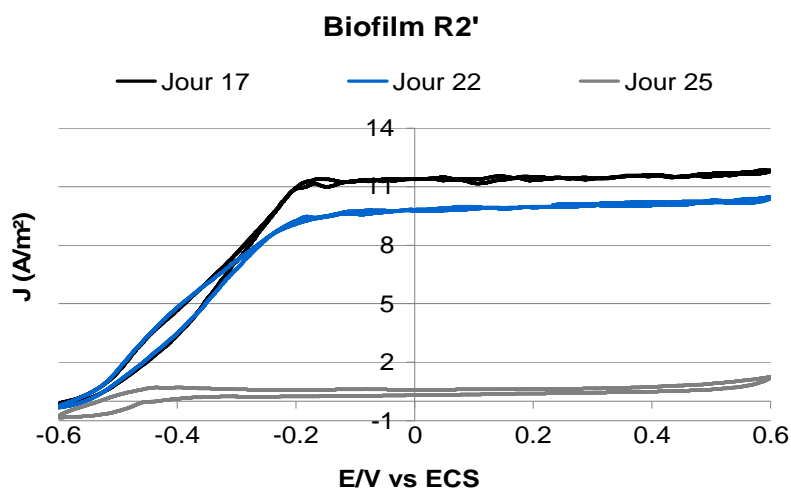


Figure 50: VCs obtenues avec l'électrode aux instants indiqués sur la **Figure 49**. Elles sont réalisées à 1 mV/s à partir de $-0,3$ V entre $-0,6$ V et $0,6$ V.

Les VCs catalytiques ont une allure identique pour les troisième et quatrième injections d'acétate avec seulement une légère diminution du courant maximum qui dépend de l'instant précis auquel la VC a été tracée. Ces VCs indiquent qu'un courant plus élevé, de l'ordre de 11 A/m², aurait pu être obtenu en imposant un potentiel à partir de -0,2 V.

III.2.4.2.5. Evolution de la composition des biofilms au cours des repiquages

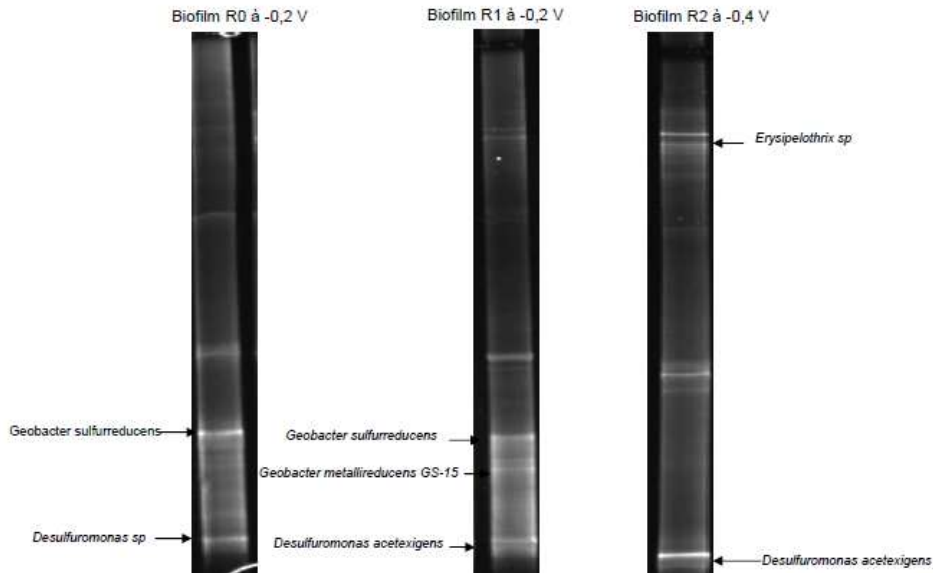
L'évolution de la composition microbienne des biofilms a été suivie par DGGE au cours de repiquages (*Figure 51*).

Chaque bande sur les profils DGGE représente une espèce spécifique de la communauté microbienne et l'intensité de la coloration de la bande permet d'évaluer l'abondance relative de l'espèce microbienne correspondante.

Cette analyse révèle des communautés bactériennes des biofilms primaires dominées par les genres *Geobacter* et *Desulfuromonas*, avec comme espèces prédominantes *Geobacter sulfurreducens* et *Desulfuromonas michiganensis*. *Geobacter sulfurreducens* est connue comme l'une des espèces EA les plus efficaces, capable de « respirer » une anode avec une perte minimale d'énergie (Sukkasem *et al.* 2008).

A partir du premier repiquage, on observe une bande commune à toutes les électrodes qui devient dominante au fur et à mesure des repiquages. Cette bande correspond à l'espèce *Desulfuromonas acetexigens*. Cette souche spécifique de la dégradation d'acétate n'a jamais été présentée dans la bibliographie comme étant électro active. Ici toutes les analyses DGGE mettent en évidence sa présence à des proportions qui augmentent au fur et à mesure des repiquages. Ceci suggère que *Desulfuromonas acetexigens* serait électro-active. Néanmoins, l'isolement et les tests électrochimiques de l'isolat restent nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

A



B

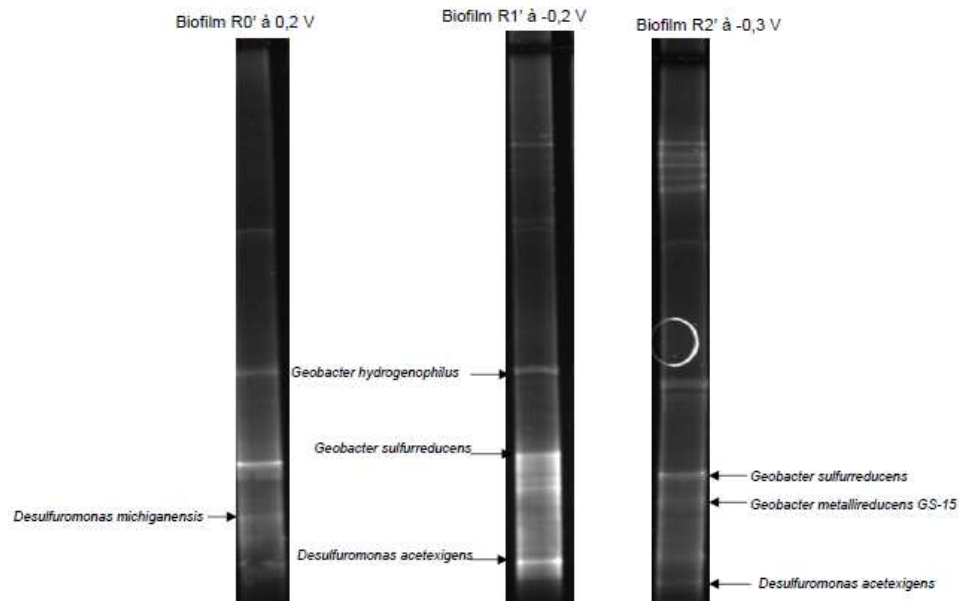


Figure 51: Evolution des populations microbiennes des biofilms obtenus par les repiquages successifs avec l'effluent sortie STEP. A = Biofilms Rx; B = Biofilms Rx'. Expérience réalisée par le LEMIRE.

III.3. Discussion générale des différents résultats issus des 3 sites

Tous les essais décrits dans ce chapitre présentent la même allure d'évolution du courant en fonction du temps: le courant est négligeable au début des chronoampérométries en raison de l'absence de catalyseur à la surface des électrodes, puis son augmentation avec le temps indique la formation progressive d'un biofilm électro-actif. La diminution du courant

est due à l'épuisement du substrat dans la solution et l'ajout d'acétate permet de retrouver très rapidement des courants élevés. Les densités de courants observées proviennent donc bien de l'oxydation de l'acétate catalysée par le biofilm qui se développe à la surface de l'électrode.

Pour plusieurs des tests, des voltammétries cycliques ont été réalisées en fin d'expérience en remplaçant l'électrode colonisée par une électrode propre (expériences non présentées dans ce mémoire). Aucun courant n'a été observé. Ceci confirme que ni les bactéries en suspension ni des métabolites éventuellement produits par les bactéries ne jouent de rôle dans la production du courant. Les biofilms EA sont donc les seuls responsables de la production du courant.

Les résultats obtenus avec les différents effluents papetiers étudiés donnent des valeurs de densités de courant de 0,6 à 9,5 A/m². Pour vraiment apprécier ces valeurs, il faut rappeler que le maximum reporté à ce jour dans la bibliographie est de 30,8 A/m² (He *et al.* 2011), mais cette valeur a été obtenue à un potentiel relativement élevé de +0,1 V vs. Ag/AgCl. Ici les densités de courant maximales sont obtenues à -0,2 V/ECS voire à des potentiels plus bas. De plus, la plus grande partie des travaux reportés dans la bibliographie utilisent des électrodes possédant une structure tridimensionnelle (feutres, tissus, brosses, etc.) qui offre une très grande surface pour la colonisation par le biofilm, alors que les densités de courant sont toujours calculées par rapport à la surface projetée. Ici, au contraire, les électrodes sont des plaques de graphite non poreuses dont la surface offerte à la colonisation est égale à la surface projetée. Les densités de courant sont donc inévitablement plus faibles que sur des électrodes tridimensionnelles. Bien que les comparaisons directes soient difficiles, nous pouvons toutefois conclure que les sources d'inoculum et les procédures testées permettent la formation de biofilms EA très efficaces.

Dans plusieurs cas, des biofilms ont été collectés sur les tuyaux ou les parois des équipements ou des sédiments ont été prélevés et ajoutés aux effluents pour servir d'inoculum pour former les biofilms primaires. Ceci était destiné à augmenter la diversité microbienne et favoriser la sélection de micro-organismes provenant de biofilms issus des environnements industriels. On a ainsi constaté que certains inocula étaient plus efficaces que d'autres à partir d'un même site. C'est le cas notamment des échantillons prélevés sur le Site N°3. L'effluent de machine à papier a été enrichi soit avec un biofilm STEP collecté sur les parois du clarificateur au niveau de la station d'épuration, soit avec un biofilm MaP prélevé sur la machine à papier. Dans des conditions opératoires similaires le premier échantillon a donné des densités de courant près de 30 fois supérieures au second. Dans ce cas, l'effluent seul n'est pas une source d'inoculum d'intérêt et l'enrichissement avec le biofilm de la machine à papier n'améliore pas ses qualités. Il faut en conclure que les biofilms de la station d'épuration représentent dans ce cas la source d'inoculum d'intérêt. Au contraire, l'effluent du Site N° 3 de l'entrée biologique a été utilisé sans enrichissement et a permis d'obtenir rapidement des densités de courant élevés. Ce résultat peut s'expliquer par une forte concentration en flore planctonique dans cet effluent mise en évidence par les mesures de dénombrement microbien ou flore totale (10⁷ à 10⁸ UFC/mL). Ces quelques remarques

montrent qu'il est encore difficile d'édicter des règles précises sur la meilleure procédure pour le choix de l'inoculum.

Les expériences de repiquages des biofilms EA ont montré d'une manière générale une réponse plus rapide des nouveaux biofilms (un jour ou deux). Les repiquages au même potentiel ou à plus bas potentiel ont montré des densités de courant et/ou les rendements faradiques améliorés parfois à plus de 50%. Dans le cas des repiquages à plus bas potentiel, l'augmentation de l'activité catalytique pour l'acétate a été importante pour les biofilms initialement formés à 0,4 V (Entrée R0, Sortie R0) puis repiqués à -0,2 V (Entrée R2, Sortie R2), ou à 0,2 V (Biofilm sortie STEP R0') puis repiqués à -0,2 V (Biofilm sortie STEP R1'). L'activité catalytique n'a pas été significative pour ceux présélectionnés à -0,2 V avec les différents effluents: sortie méthaniseur, machine à papier, entrée biologique et sortie STEP (Biofilms R0) et repiqués à -0,3 ou -0,4V.

Les meilleures conditions d'optimisation des performances des biofilms EA consisteraient donc à former des biofilms primaires à potentiels élevés puis de les repiquer à plus bas potentiels.

L'effet positif du repiquage d'un biofilm électro-actif a été relevé par différents auteurs. Ils expliquent que le nombre de bactéries électro-actives dans un premier inoculum est faible en comparaison de celles qui ne sont pas électrochimiquement actives. En effet, durant l'inoculation initiale, les bactéries EA sont en compétition avec des espèces non EA pour coloniser l'électrode, ce qui défavorise les performances des premiers biofilms (Min *et al.* 2005b; Liu *et al.* 2008). L'inoculation avec un biofilm électro-actif issu d'une électrode colonisée a été décrite comme une méthode efficace pour produire rapidement dans les PACMs des densités de puissance élevées (Min *et al.* 2005b).

Liu *et al.* (2008) ont remarqué que le 3ème biofilm issu du deuxième repiquage ne conduisait généralement pas à une augmentation significative des performances, ce qui a permis aux auteurs de conclure que la plupart des biofilms gardent les performances du premier repiquage (Liu *et al.* 2008). On pourrait donc maintenant compléter cette remarque en disant que les performances des biofilms tertiaires peuvent être améliorées en réalisant le repiquage à plus bas potentiel. C'est à notre connaissance un résultat totalement original par rapport à la bibliographie.

Les repiquages effectués à plus faibles potentiels ont entraîné une amélioration plus ou moins importante des densités de courant. La procédure consistant à acclimater progressivement un biofilm à des potentiels de plus en plus bas s'est avérée très efficace pour former des biofilms EA à faible potentiel (-0,4 V). Le fait que les densités de courant se maintiennent à de fortes valeurs pour de faibles potentiels est un avantage évident pour assurer de fortes tensions dans les PACMs. L'amélioration progressive des biofilms peut être attribuée à l'acclimatation des cellules bactériennes à la respiration à de faibles potentiels et/ou à la sélection de micro-organismes plus efficaces. La limitation des réactions

microbiennes compétitives assurée en maintenant des conditions anaérobies contribue également à l'amélioration des performances.

Lors de nos premières expériences, nous avons le souci de ramener systématiquement en début d'expérience le pH du milieu proche de 7,0 car plusieurs études stipulent qu'une croissance optimale des bactéries anodiques est obtenue pour des pH proches de la neutralité ou légèrement acides (Zhao *et al.* 2006). Par la suite nous avons observé, sans la corriger, une alcalinisation systématique de nos milieux, sans effet négatif sur les performances des bioanodes. Pour tous les effluents testés, le pH en fin d'expérience est voisin de 9,0 et les densités de courant, abattements de DCO et rendements faradiques restent élevés. Cette alcalinisation est attribuée à l'élimination progressive des acides organiques et du CO₂ dissous provoquée par le barbotage d'azote. Par exemple l'effluent du Site N°3 collecté en entrée du traitement biologique conduit à un biofilm tertiaire formé à -0,4 V/ECS (Figure 1, article N°2) qui atteint en fin d'expérience une densité de courant de 6,8 A/m², avec un rendement faradique de 35% et un abattement de DCO de 75% alors que le pH est de 9,5.

Jusqu'à présent très peu d'études ont été réalisées dans le domaine des PACMs dans des conditions alcalines. He *et al.* (2008) ont présenté des piles à cathodes à air inoculées par un mélange de boues aérobies et anaérobies capables de tolérer un pH jusqu'à 10. Les auteurs observent que la densité de courant augmente lorsque la pile est alimentée par un électrolyte avec un pH de plus en plus basique, jusqu'à la valeur maximale de 480 mA/m² à pH 9. Le courant est 7,23% supérieur à celui obtenu à pH 7 (He *et al.* 2008). Raghavulu *et al.* (2009) étudiant le fonctionnement d'une PACM à différents pH obtiennent une augmentation des densités de courant et de puissance dans l'ordre de croissance du pH: acide, neutre et basique alors que l'abattement de DCO diminue dans le sens : acide, basique, neutre (Raghavulu *et al.* 2009).

Conclusion

A la fin de cette première phase d'étude dont le but était de réaliser un criblage de divers environnements des industries papetières, nous nous rendons compte que de nombreux facteurs sont susceptibles d'influencer le développement et les performances des biofilms électro actifs. Nous avons mis en évidence l'importance cruciale de l'origine des échantillons, qui n'avait pas été remarquée dans les études précédentes. Les conditions anoxiques maintenues pas un barbotage de gaz dans les réacteurs améliore les performances des biofilms EA. La procédure d'abaissement progressif du potentiel au fur et à mesure des repiquages, qui a été initiée dans ce travail, permet d'améliorer les caractéristiques des biofilms en abaissant le potentiel auquel ils maintiennent leur courant maximal. Dans le cas des expériences présentées, -0,3 V semble être la limite inférieure du potentiel à imposer à l'électrode pour conserver les courants maxima, car en-deçà de ce potentiel (-0,4 V), les performances des biofilms commencent à diminuer.

Chapitre IV

Optimisation des performances des biofilms anodiques en batch avec acétate

Introduction

Le travail présenté dans le chapitre précédent consistait à rechercher et identifier des effluents de l'industrie papetière capables de former des biofilms électro-actifs (EA). Nous avons démontré dans divers effluents, enrichis ou non de biofilms naturels, l'existence de consortia microbiens capables de former des biofilms EA très efficaces. En effet, des densités de courant supérieures à 8 A/m^2 et des rendements faradiques supérieurs à 70% ont été obtenus en présence d'acétate.

L'objectif de ce chapitre est d'étudier l'influence de divers paramètres en vue d'optimiser les propriétés catalytiques des biofilms EA. Pour cela, nous avons sélectionné deux inoculumss parmi ceux étudiés dans le chapitre précédent:

- ❖ l'effluent prélevé sur le site N°2 en sortie de méthaniseur qui sera appelée «Effluent sortie de méthaniseur» par la suite,

- ❖ l'effluent prélevé sur le site N°3 (site de production de papier journal avec un traitement d'effluents par boues activées) en entrée du réacteur de traitement biologique. Cette source d'inoculum sera appelée «Effluent entrée biologique».

Ces deux échantillons ont donné de bons résultats lors des essais de criblage et ils sont en outre les plus représentatifs des papeteries françaises. En effet, ils proviennent de sites de fabrication de papier recyclé qui représentent plus de 65% de la production nationale de papier.

Comme dans le chapitre précédent, les biofilms sont formés en batch dans les effluents papetiers avec ajout d'acétate comme substrat additionnel. Les paramètres étudiés en vue d'optimiser les performances des biofilms EA sont: la nature du matériau utilisé comme électrode de travail, la valeur du potentiel imposé à l'électrode, l'élimination des bactéries planctoniques par filtration de l'effluent à $0,2 \mu\text{m}$ lors du repiquage, le taux d'inoculation, l'agitation et/ou les barbotages des gaz N_2 et N_2/CO_2 , la dilution ou non de l'effluent avec le milieu synthétique, la polarisation retardée de l'électrode de travail sous barbotage ou non de N_2 .

IV.1. Effet du matériau et de la surface des électrodes

Le matériau utilisé comme électrode de travail peut influencer sur le développement et les performances des biofilms anodiques. Il est important d'identifier pour chacun des deux effluents sélectionnés le matériau optimal pour les performances du biofilm EA. Pour cela, deux matériaux sous différentes formes ont été étudiés. Il s'agit de:

- ❖ Matériaux à base de carbone
 - plaque de graphite 5 x 2 x 0,5 cm³,
 - tissu de carbone 5 x 2 x 0,340 cm³,
 - feutre de carbone 5 x 2 x 0,2 cm³,
- ❖ Matériaux à base d'acier inoxydable
 - acier inoxydable brut (254 SMO) 9 x 2 x 0,5 cm³,
 - acier inoxydable microstructuré 9 x 2 x 0,5 cm³.

Ces cinq électrodes ont toutes été introduites dans un même réacteur contenant 1,5 L de milieu (effluent + milieu synthétique) et polarisées individuellement grâce à un dispositif électronique appelé N-STAT. Ce dispositif permet à chacune des électrodes de travailler individuellement dans des conditions expérimentales similaires avec une seule contre-électrode et une seule électrode de référence. Les biofilms formés sur chacune d'entre-elles sont donc en compétition pour la consommation du substrat. La composition du milieu reste similaire à celle des expériences de criblage présentées dans le chapitre précédent, il est constitué des effluents industriels dilués de moitié avec le milieu synthétique (*Cf* paragraphe II.1.4.) et complétés avec l'acétate à différentes concentrations indiquées sur la **Figure 52** et 10 mM de KCl.

Dans le chapitre précédent, nous avons vu que les biofilms secondaires permettaient d'obtenir un démarrage plus rapide et de meilleures performances par rapport aux biofilms primaires. Nous avons décidé de réaliser cette expérience avec des biofilms secondaires. Ainsi, des biofilms primaires préalablement formés avec de l'acétate ont été utilisés comme inocula pour former les biofilms secondaires. Le milieu est similaire à celui de la formation des biofilms primaires mais l'effluent est préalablement filtré au-travers d'un filtre à 0,45 µm pour permettre que l'essentiel des micro-organismes proviennent du biofilm primaire et non de l'effluent.

Afin d'évaluer l'influence de la concentration en substrat sur les densités de courants et les rendements faradiques, différentes concentrations d'acétate sont ajoutées successivement dans le réacteur. Elles sont ajoutées dans le sens croissant (5 – 10 – 20 mM) dans le cas de l'effluent sortie méthaniseur et dans le sens contraire (20 – 10 – 5 mM) dans le cas de l'effluent entrée biologique. Chacun des réacteurs est placé sous barbotage continu d'azote tout au long de l'expérience. Les résultats obtenus pour les deux effluents sont présentés **Figure 52**. Les calculs de rendements faradiques sont rapportés pour toutes les électrodes à la quantité globale d'acétate introduite. Ces valeurs sont donc très inférieures à celles qui auraient pu être obtenues pour un réacteur avec une seule électrode car le substrat est utilisé simultanément par les cinq électrodes. Les rendements faradiques obtenus de chaque électrode doivent par conséquent être additionnés si l'on souhaite comparer les performances de ce dispositif avec celui d'un réacteur dans lequel une seule électrode a été introduite.

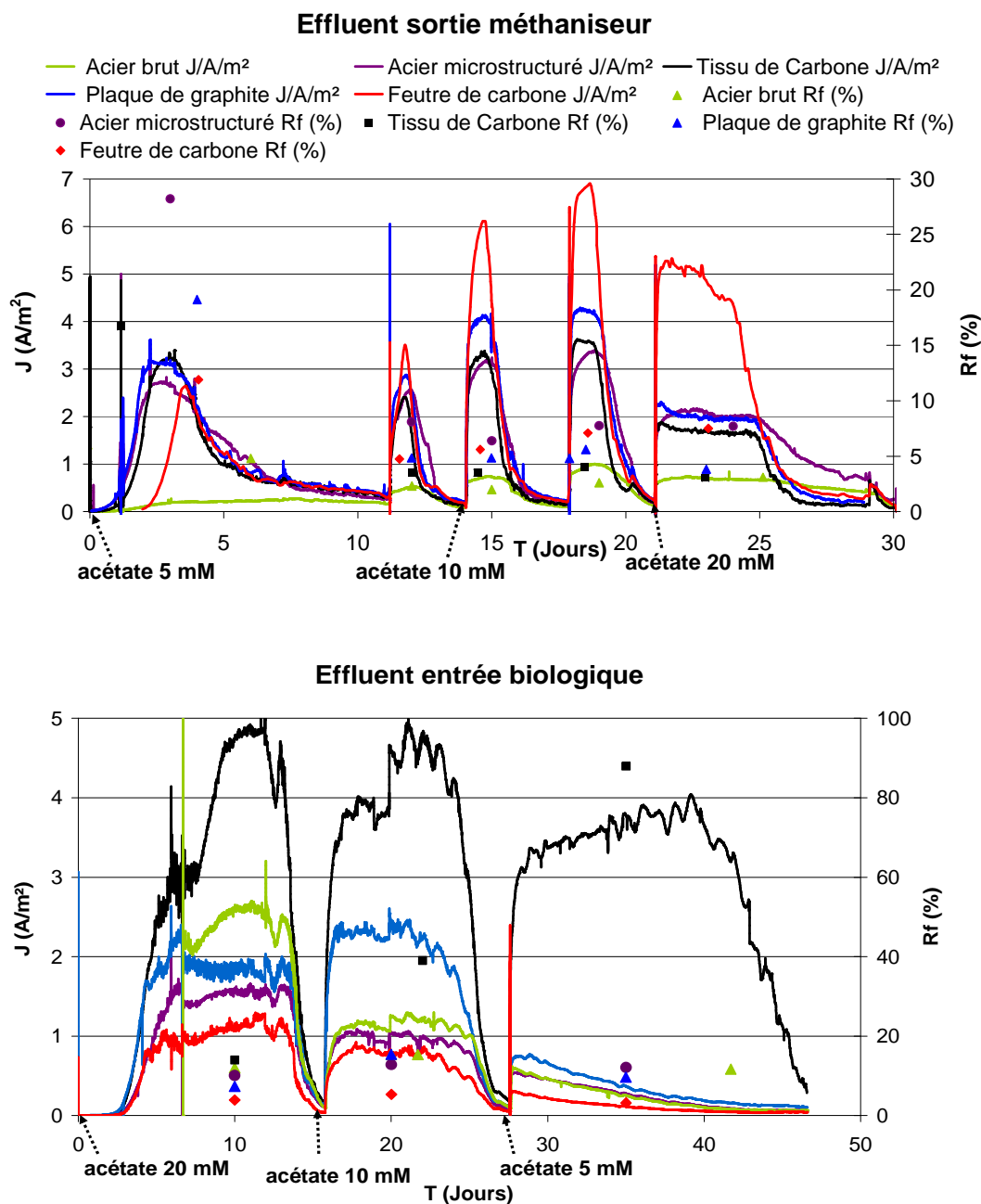


Figure 52: Biofilms secondaires: Effet de cinq matériaux d'électrode sur les performances des biofilms EA formés avec les effluents sortie méthaniseur et entrée biologique.

Ces graphes permettent de constater que l'ordre d'efficacité des matériaux dépend de la nature de l'effluent. Les matériaux testés classés par ordre croissant d'efficacité pour chaque effluent sont :

Effluent Sortie Méthaniseur du site N°2:

Acier Brut < Acier microstructuré << Tissu carbone < Plaque graphite < Feutre carbone

Effluent Entrée Biologique du site N°3:

Feutre carbone < Acier microstructuré < Acier Brut << Plaque graphite < Tissu carbone

Le feutre de carbone semble être le meilleur matériau à utiliser en ce qui concerne l'effluent méthaniseur alors que le tissu de carbone serait meilleur pour l'effluent entrée biologique. L'acier brut ou microstructuré est peu performant avec les deux effluents, alors que la plaque de graphite donne des performances acceptables et stables dans les deux cas.

Influence de la concentration en acétate

Pour tous les matériaux et dans les deux effluents, la densité de courant augmente avec la concentration en acétate de 5 à 20 mM, tandis que le rendement faradique reste à peu près constant. Cependant, le courant observé avec le tissu de carbone dans l'effluent entrée biologique pour une concentration en acétate de 5 mM est inexplicablement élevé alors qu'il diminue pour tous les autres matériaux. Ceci pourrait laisser supposer que ce matériau est le plus adéquat pour la formation de biofilms EA dans cet effluent.

Influence du rapport surface de l'électrode/volume du réacteur

Le tissu de carbone et le feutre de graphite ont donné de bonnes performances dans les effluents entrée biologique et sortie méthaniseur respectivement. Pour confirmer l'écart des performances observé pour ces deux matériaux avec l'effluent méthaniseur, un nouveau dispositif N-Stat a été réalisé pour la formation de biofilms secondaires. Pour cette expérience, deux surfaces différentes (10 et 20 cm²) ont été choisies pour chacun des matériaux pour juger simultanément de l'effet de la taille et de la surface de l'électrode sur les performances électro-actives du biofilm. L'essai s'est déroulé pendant 33 jours sous barbotage continu d'azote et à différentes concentrations d'acétate. Les meilleurs résultats ont été obtenus pour une concentration de 5 mM. Les résultats sont présentés *Tableau 7*.

| Matériaux | J (A/m ²) | Rf (%) |
|---------------------------|-----------------------|--------|
| Tissu 10 cm ² | 1,8 | 9 |
| Tissu 20 cm ² | 2,3 | 25 |
| Feutre 10 cm ² | 1,5 | 6 |
| Feutre 20 cm ² | 1,8 | 16 |

Tableau 7: Densités de courant (J) et rendements faradiques (Rf) de biofilms secondaires formés dans un dispositif N-stat avec des électrodes en tissu et feutre de carbone de surfaces différentes.

Les densités de courant sont environ deux fois plus faibles que celles reportées sur la *Figure 52*, avec l'effluent sortie méthaniseur bien qu'elles aient été réalisées dans les mêmes conditions opératoires (les électrodes avaient 10 cm² de surface pour les expériences reportées

sur la *Figure 52*). Pour chaque matériau, la surface n'a pas une influence significative. On observe avec les plus grandes électrodes une très légère amélioration des densités de courant, surtout pour le tissu. Logiquement, les rendements faradiques sont meilleurs avec les électrodes de plus grande surface puisque les réactions électrochimiques acquièrent alors plus d'importance par rapport aux réactions parasites.

Ces résultats et ceux obtenus précédemment sont relativement proches et confortent l'idée que ces deux formes de carbone pourront être utilisés l'un et l'autre dans des systèmes de PACMs. Néanmoins la grande variabilité des résultats obtenus avec ces deux électrodes nous a amené à choisir la plaque de graphite pour la suite des expériences d'optimisation, car elle a présenté les résultats les plus stables quel que soit le milieu.

IV.2. Confirmation du choix du potentiel imposé

Nous avons observé lors des expériences présentées dans le chapitre précédent que le potentiel imposé était déterminant pour la performance des biofilms EA. En effet, la valeur du potentiel imposé détermine l'énergie disponible pour la croissance et le fonctionnement des bactéries électro-actives.

Pour confirmer ces résultats des essais ont été réalisés avec les deux effluents de référence. Six électrodes de graphite (10 cm^2) ont été introduites dans un même réacteur et polarisées individuellement à différents potentiels. Des biofilms primaires (effluent entrée biologique) et secondaires (effluent sortie méthaniseur) ont ainsi été réalisés dans une gamme de potentiels allant de $0,2 \text{ V}$ à $-0,4 \text{ V}$. Les résultats obtenus sont présentés sur la *Figure 53*.

Le démarrage immédiat de l'activité du biofilm EA formé avec l'effluent sortie méthaniseur est justifié par le fait que c'est un biofilm secondaire contrairement au biofilm formé par l'effluent entrée biologique qui est un biofilm primaire.

D'après les graphes de CA, nous remarquons que les potentiels de $-0,1 \text{ V}$ et $-0,2 \text{ V}$ permettent d'obtenir des performances les plus élevées et à peu près similaires quel que soit l'effluent ($J_{\text{max}} 4 \text{ A/m}^2$, Rf 20% avec l'effluent sortie méthaniseur et $J_{\text{max}} 8,5 \text{ A/m}^2$, Rf 38% avec l'effluent entrée biologique). Dès le premier ajout d'acétate, de fortes valeurs de densité de courant et de rendements faradiques sont obtenues. Les potentiels plus faibles ($-0,3 \text{ V}$ et $-0,4 \text{ V}$) donnent des densités de courant en moyenne légèrement plus faibles. Par contre, les biofilms formés à des potentiels plus élevés ($0,1 \text{ V}$ et $0,2 \text{ V}$) présentent des performances très faibles. Ces résultats confirment ceux que nous avons obtenus au chapitre précédent (Cf paragraphes III.2.2, III.2.4.1.1. et III.2.4.2.1.). En effet, pour les échantillons prélevés sur le site N°1 par exemple, les meilleurs biofilms avaient été obtenus à faible potentiel ($-0,2 \text{ V}$) par rapport à un potentiel plus élevé ($0,4 \text{ V}$) (Cf paragraphe III.2.2.). Ici l'intervalle optimal se précise entre $-0,2$ et $-0,1 \text{ V}$.

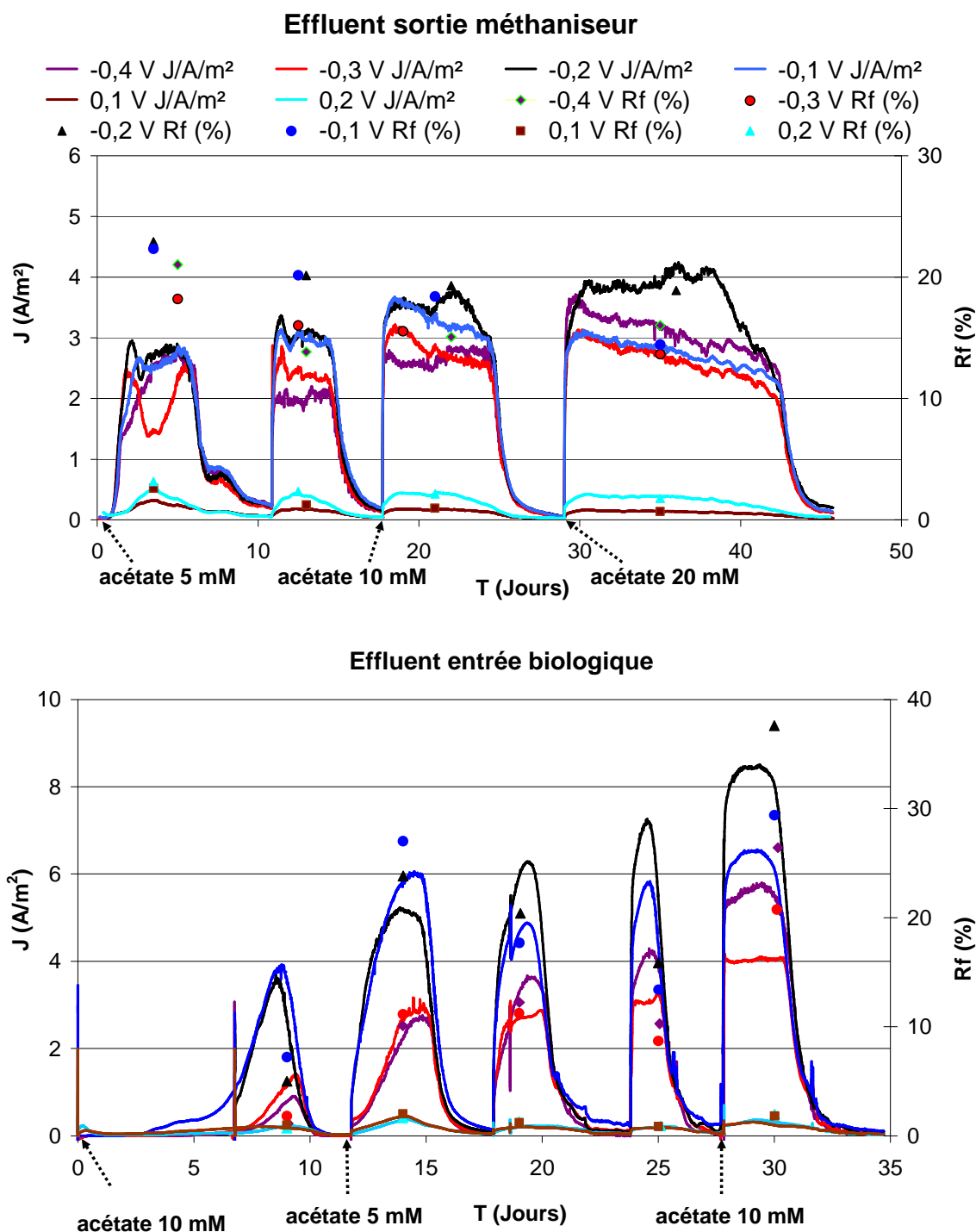


Figure 53: Effet du potentiel imposé sur les performances des biofilms EA formés avec les effluents sortie méthaniseur et entrée biologique. Réacteurs sous N₂ en continu et électrodes de graphite (10 cm²) polarisées individuellement à l'aide du dispositif N-STAT.

Malgré de meilleures performances obtenues aux potentiels -0,1 V et -0,2 V, nous avons décidé de confirmer le potentiel de -0,3 V pour la formation des biofilms destinés aux dispositifs de PACMs avec ces effluents. En effet, les expériences de voltammétries catalytiques réalisées dans le chapitre précédent avaient montré une activité optimale du

biofilm à -0,2 V. Toutefois des performances acceptables, peu éloignées des valeurs optimales, avaient été observées avec le potentiel de -0,3 V. Le choix du potentiel de -0,3 V permet de former des biofilms EA capables de fonctionner proche de l'optimum à des potentiels bas et donc susceptibles de générer des puissances maximales en pile. En effet, la puissance fournie par une pile étant le produit de l'intensité du courant par la différence de potentiel, nous espérons que le gain de 100 mV compense largement la petite perte d'intensité consentie à -0,3V par rapport à -0.2V.

IV.3. Effet de la filtration de l'effluent à 0,2 µm

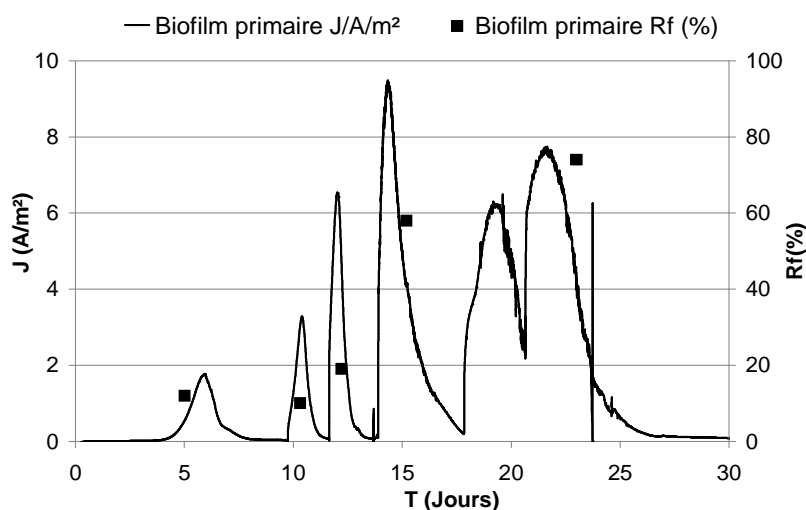
La filtration d'un milieu au-travers d'un filtre de seuil de coupure de 0,2 µm permet d'éliminer la quasi-totalité des micro-organismes qu'il contient. Plusieurs études de la bibliographie démontrent que le repiquage d'un premier biofilm EA dans un effluent stérilisé favorise la formation d'un second biofilm avec des performances améliorées car dans ces conditions, l'inoculum utilisé est enrichi en bactéries électro-actives (Kim *et al* 2005). Il n'y a ainsi plus de compétition pour la consommation du substrat entre les bactéries planctoniques et celles du biofilm. Pour vérifier cette affirmation, à partir d'un biofilm primaire formé à -0,3 V avec l'effluent sortie méthaniseur, deux biofilms secondaires sont formés dans l'effluent filtré à 0,2 µm ou non filtré. Les résultats de cette expérience sont présentés à la *Figure 54*.

Comparé au biofilm primaire dont l'activité a démarré après 4 jours, le biofilm secondaire dans l'effluent non filtré démarre plus rapidement (un jour), alors que dans l'effluent filtré il démarre beaucoup plus tard (huit jours). Le démarrage plus lent dans l'effluent filtré pourrait être expliqué par une plus faible quantité d'inoculum introduite dans le réacteur. En effet, le biofilm primaire sert d'inoculum unique dans ce cas alors que, dans l'effluent non filtré, les micro-organismes EA peuvent aussi provenir de l'effluent. Il semble donc que la stérilisation de l'effluent par filtration ne favorise pas les performances des biofilms EA, et pourrait même limiter le développement et les performances des biofilms secondaires.

Dans le chapitre précédent, toutes les expériences de repiquage avaient été réalisées dans des effluents filtrés à 0,45 µm. Ces expériences avaient montré que le repiquage permettait non seulement un démarrage plus rapide mais aussi des performances plus élevées des nouveaux biofilms. Les expériences présentées dans cette section semblent indiquer le contraire. La nature du matériau des deux filtres étant la même (acétate de cellulose), la seule différence entre les deux expériences est leur seuil de coupure. On pourrait donc supposer qu'à 0,45 µm le filtre laisserait passer des micro-organismes nécessaires non seulement au démarrage mais aussi aux performances des biofilms secondaires, ce qui n'est pas le cas à 0,2 µm.

La filtration de l'effluent était nécessaire lors des expériences du chapitre précédent car nous souhaitions étudier l'évolution des populations microbiennes par DGGE lors de repiquages successifs destinés à sélectionner et enrichir les biofilms EA. Il était donc important que les micro-organismes électro-actifs proviennent en majorité des biofilms précédents. Ces derniers résultats montrent que l'effluent non filtré permet aussi d'obtenir de bonnes performances lors des essais de repiquage. La filtration lors des repiquages sera donc abandonnée afin de simplifier la procédure, ce qui est favorable au développement de procédés industriels pour lesquels la filtration de l'effluent serait une contrainte inacceptable.

A



B

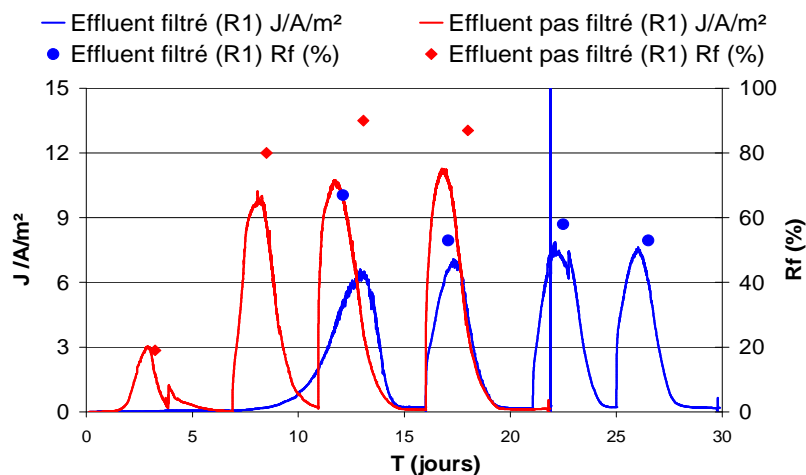


Figure 54: Effet de la filtration ou non de l'effluent lors du repiquage d'un biofilm EA primaire. Les réacteurs sont maintenus sous barbotage continu de N_2 et les électrodes en plaque de graphite sont polarisées à $-0,3$ V. A) biofilm primaire, B) repiquage du biofilm primaire dans l'effluent filtré à $0,2$ μm (courbe bleu) ou non filtré (courbe rouge).

IV.4. Effet de la composition du milieu et de la quantité de milieu synthétique.

Cette expérience a été réalisée pour évaluer la nécessité de compléter les effluents industriels par le milieu synthétique simplifié *Geobacter* utilisé jusqu'à présent lors de nos expériences (Cf paragraphe II.1.4.). Ce milieu présenté dans la littérature comme étant propice au développement des bactéries EA permettait également de compléter en azote (urée) et phosphore (acide phosphorique) les effluents papetiers carencés en nutriments afin de favoriser la croissance des bactéries.

Cette expérience était destinée à préciser la proportion optimale de milieu synthétique. Deux réacteurs contenant l'effluent sortie méthaniseur dont l'un seulement est complété par 8% de milieu synthétique (460 mL d'effluent + 40 mL de milieu synthétique) ont été testés en parallèle. Les électrodes de travail en plaque de graphite ont été polarisées à -0,3 V et les réacteurs placés sous barbotage continu de N₂. Les performances des biofilms obtenus dans ces deux conditions sont présentées **Figure 55** et comparées avec celles obtenues avec la dilution à 50% utilisée jusqu'à présent.

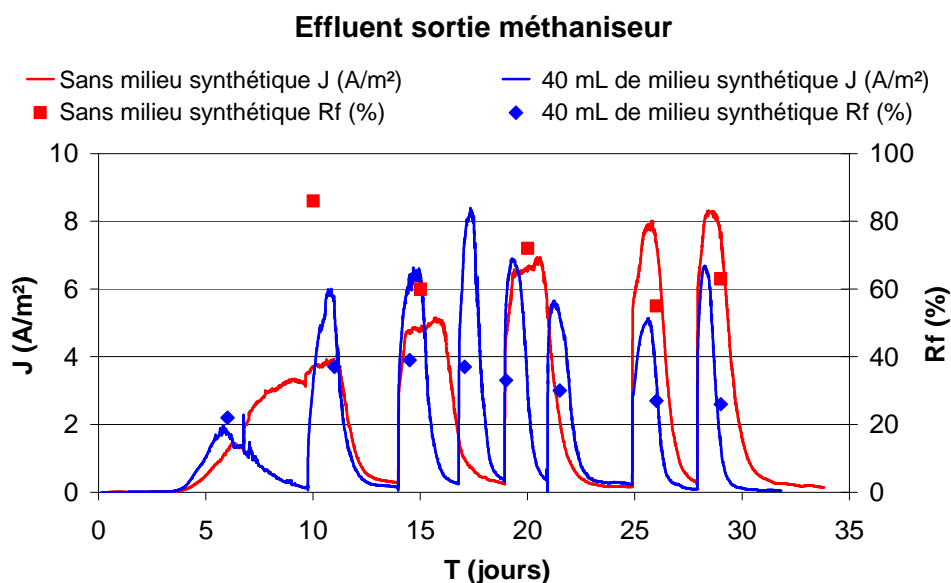


Figure 55: Biofilms primaires, effet de l'ajout du milieu synthétique à l'effluent sortie méthaniseur. Les électrodes en plaque de graphite sont polarisées à -0,3 V et les réacteurs laissés sous barbotage continu de N₂.

Les résultats montrent des performances maximales plus importantes pour le biofilm formé avec l'effluent brut ($J_{\max} = 8 \text{ A/m}^2$; $R_f = 70\%$) par rapport à celui formé avec l'effluent dilué à 92% ($J_{\max} = 7 \text{ A/m}^2$; $R_f = 40\%$). Si nous comparons ces résultats aux valeurs maximales obtenues lors de la formation d'un biofilm primaire dans les mêmes conditions opératoires mais avec une dilution de 50% (graphe A, **Figure 54**) ($J_{\max} = 9 \text{ A/m}^2$;

Rf = 75%), nous pouvons conclure que la dilution de l'effluent par le milieu synthétique ne semble pas jouer un rôle significatif. En fait, on peut craindre deux effets antagonistes : un effet positif dû à l'ajout des minéraux essentiels pour la croissance des bactéries dans les effluents, et un effet négatif dû à la diminution de la concentration en substrats organiques lorsque le volume de solution synthétique augmente. Nous réfléchissons à un autre moyen pour étudier l'effet, de l'ajout de minéraux sans diminuer la concentration des substrats organiques (DCO) disponible pour les bactéries.

IV.5. Effet de l'enrichissement de l'inoculum

Nous avons tenté de rajouter dans l'effluent sortie méthaniseur des granules prélevées à l'intérieur du méthaniseur pour enrichir l'inoculum en micro-organismes. Nous espérons ainsi optimiser les performances des biofilms EA en augmentant la diversité microbienne de l'inoculum. Pour cette expérience, deux réacteurs de 500 mL ont été inoculés avec l'effluent sortie méthaniseur. L'un des réacteurs a été enrichi avec 2 g/L de granules anaérobies. Les milieux ont été complétés avec 10 mM de KCl pour améliorer la conductivité et des ajouts successifs de 5 mM d'acétate ont été effectués. Les électrodes de travail en plaque de graphite de 10 cm² ont été polarisées à -0,3 V. Les CA obtenues sont superposées sur la *Figure 56*.

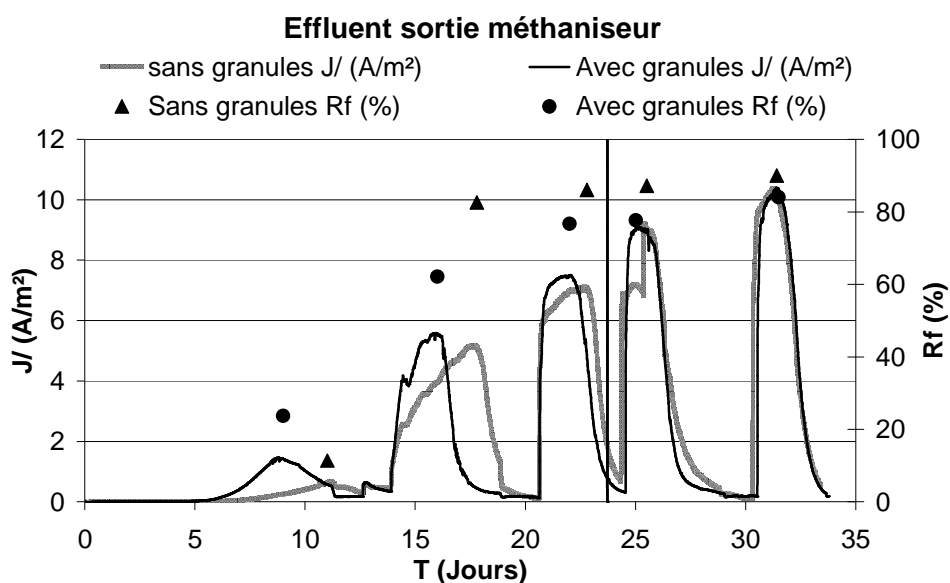


Figure 56: Biofilms primaires, effet de l'enrichissement ou non de l'effluent sortie méthaniseur par des granules sur les performances des biofilms EA. Electrodes en plaque de graphite 10 cm² polarisées à -0,3 V. Réacteurs sous barbotage continu de N₂.

Les deux courbes sont très semblables, presque superposables. Cette expérience permet de conclure qu'il n'est pas nécessaire d'ajouter dans les réacteurs des granules du méthaniseur puisqu'on n'observe pas d'incidence de cet ajout sur le développement et l'activité du biofilm EA.

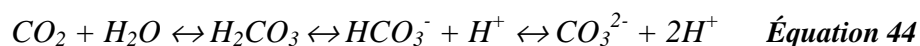
IV.6. Mise en conditions anaérobie par barbotage gazeux

Lors du chapitre précédent, nous avons observé qu'un barbotage de gaz N₂ ou de mélange N₂/CO₂ (80/20%) permettait d'améliorer les performances des biofilms EA. Plusieurs facteurs peuvent expliquer cette amélioration:

- ❖ L'établissement des conditions anoxiques dans le milieu pourrait empêcher l'oxydation du substrat (acétate + DCO de l'effluent) par les bactéries aérobies diminuant ainsi la compétition avec les bactéries électro-actives.

- ❖ L'agitation du milieu réactionnel générée par le barbotage qui pourrait favoriser la diffusion du substrat et son transfert entre le milieu et le biofilm.

- ❖ L'effet du barbotage en continu pourrait également jouer un rôle sur la concentration en ions hydrogène-carbonates dans le milieu. En effet, le barbotage N₂/CO₂ abaisse le pH du réacteur en augmentant la concentration en acide carbonique, alors que le barbotage N₂ l'augmente en éliminant le CO₂ en équilibre :



Plusieurs expériences ont été réalisées pour évaluer la validité de ces différentes hypothèses.

IV.6.1. Effets comparés du barbotage d'azote et de l'agitation

Le barbotage d'azote peut intervenir par deux mécanismes simultanés: assurer des conditions anoxiques et assurer l'agitation de la solution. Une expérience a été réalisée afin de distinguer l'influence de ces deux facteurs. Pour s'assurer de la reproductibilité des expériences, deux réacteurs identiques ont été montés en parallèle avec l'effluent sortie méthaniseur sous une polarisation de -0,3 V, sans agitation mécanique ni barbotage de N₂. Les courbes obtenues avec les deux réacteurs (*Figure 57*) montrent une faible densité de courant. Après 12 jours de fonctionnement, les deux réacteurs sont mis sous agitation mécanique à l'aide d'un barreau aimanté. Une très légère amélioration des courants est observée. Lorsque les réacteurs sont ensuite mis sous barbotage continu d'azote au jour 18, un accroissement des performances d'un facteur de 5 à 10 est obtenu. Ces résultats montrent que

l'effet positif du barbotage d'azote n'est pas lié à l'agitation mécanique, mais plutôt aux conditions anaérobies et donc à l'élimination de l'oxygène.

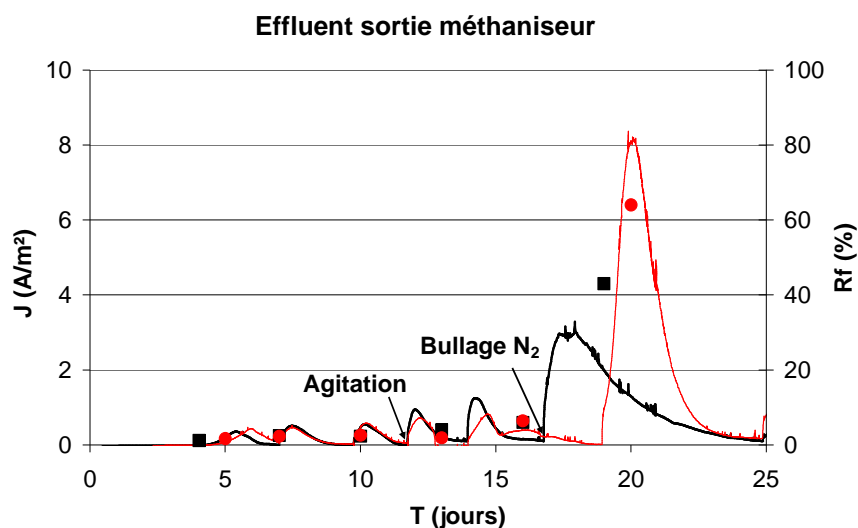


Figure 57: Effet de l'agitation puis du barbotage d'azote sur les performances des biofilms EA. Electrodes en plaque de graphite polarisées à $-0,3$ V.

Toutefois, l'élimination du CO_2 produit par la réaction d'oxydation de l'acétate entraînant par ailleurs une augmentation du pH à des valeurs élevées (9,5) l'influence du pH est donc également à considérer et a fait l'objet d'une nouvelle expérience.

IV.6.2. Effets comparés des barbotages N_2 et N_2/CO_2

Pour déterminer l'effet du pH lors du maintien des conditions anaérobies dans les réacteurs par barbotage de gaz, des essais ont été réalisés avec N_2 et N_2/CO_2 (80/20) lors de la formation de biofilms primaires avec les deux effluents sélectionnés. Pour toutes ces expériences aucun barbotage n'est effectué en début d'expérience.

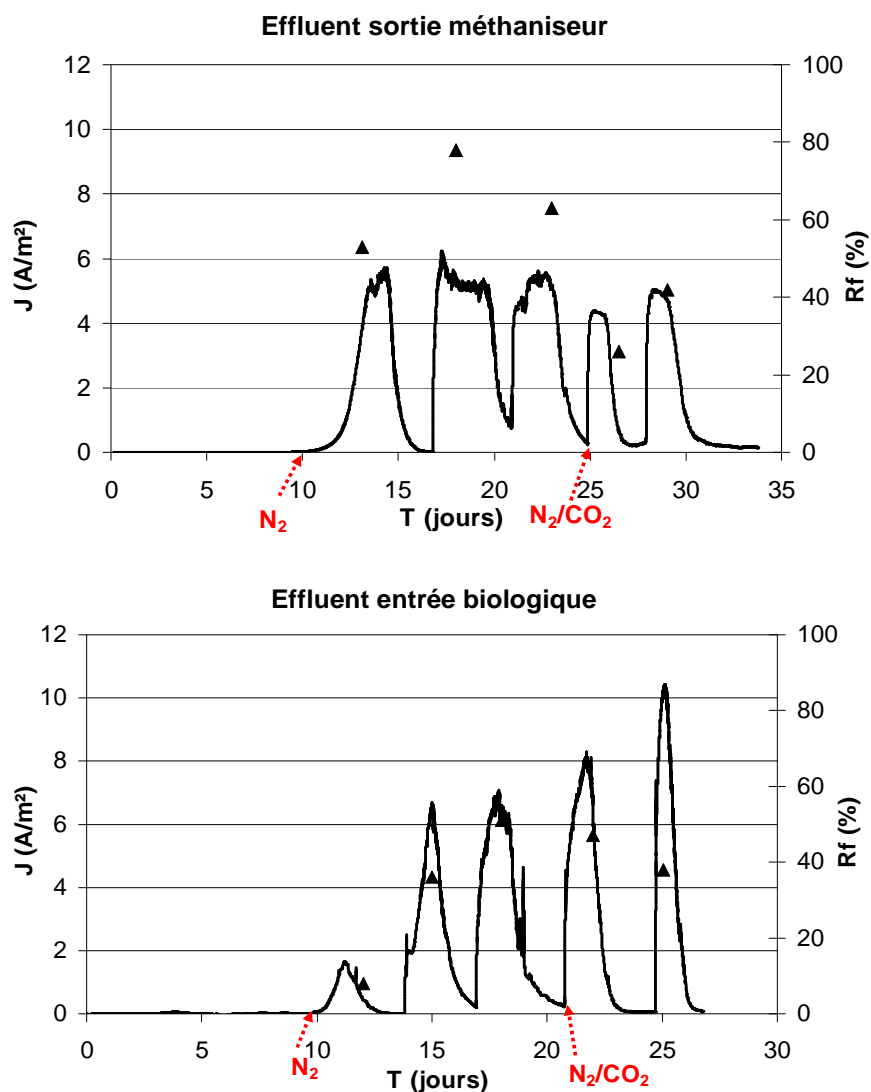


Figure 58: Effet des barbotages des gaz N_2 et N_2/CO_2 sur les performances des biofilms EA primaires.

On observe pour les deux réacteurs (**Figure 58**) l'absence d'activité des biofilms EA avant le début du barbotage de N_2 . Le premier pic de courant est observé lorsque le barbotage de N_2 est mis en route. Ce barbotage de N_2 est maintenu pendant onze jours dans les deux réacteurs. Les performances restent à peu près stables et similaires pour les deux biofilms (J_{max} de 6 à 8 A/m^2 et R_f de 50 à 80%). Les valeurs de pH s'établissent entre 9,2 et 9,5 dans les deux réacteurs. Les réacteurs sont ensuite placés sous barbotage de N_2/CO_2 au jour 21 pour l'effluent entrée biologique et 25 pour l'effluent sortie méthaniseur. La densité de courant augmente dans le cas de l'effluent entrée biologique mais les rendements faradiques restent inchangés. L'effluent sortie méthaniseur ne montre pas de modification significative des densités de courant, une légère baisse des performances est même observée: les valeurs moyennes passant de 6 à 5 A/m^2 et les rendements faradiques de 60 à 40%. Dans les deux cas, le barbotage de N_2/CO_2 entraîne une neutralisation du pH.

Les essais de barbotage avec N_2/CO_2 ne montrent pas d'amélioration des performances des biofilms par rapport au barbotage N_2 malgré la neutralisation du pH. Ces résultats montrent que l'effet positif du barbotage est lié essentiellement à l'établissement de conditions anaérobies et que les biofilms EA formés à partir d'effluents papetiers sont performants pour des pH entre 7,0 et 9,5. L'influence du pH ou de la concentration en carbonates dans le milieu ne semble pas importante sur l'efficacité de ces biofilms électro-actifs. Le barbotage de N_2 est donc suffisant pour créer des conditions anaérobies dans les réacteurs et améliorer les performances des biofilms à un coût moins élevé que le barbotage de N_2/CO_2 .

IV.6.3. Expériences témoins de l'évolution du pH et de l'abattement de la DCO sans polarisation

L'évolution du pH et de la DCO des effluents a été suivie au cours du temps dans des réacteurs équipés d'électrodes non polarisées afin de caractériser l'évolution spontanée du milieu en l'absence de réaction électrochimique. Ces expériences de contrôle ont été réalisées avec chacun des deux effluents de référence: « sortie méthaniseur » et « entrée biologique » sous différentes conditions opératoires (*Figure 59*).

Dans le cas de l'effluent sortie méthaniseur, l'évolution du pH et de la DCO est étudiée avec l'effluent brut sous barbotage continu d'azote (courbes bleues), l'effluent dilué à 60% avec un milieu synthétique simplifié⁸ sous barbotage continu d'azote (courbes rouges) et sous agitation mécanique (courbes noires). Les réacteurs sont complétés par 10 mM de KCl et 5 mM d'acétate et le pH ajusté à 7 au début des expériences.

Quelle que soit la composition du milieu réactionnel (dilution avec le milieu synthétique ou non) en condition de barbotage de N_2 ou de l'agitation mécanique, la valeur du pH mesurée quotidiennement atteint 9 après une semaine. Lorsque l'agitation mécanique est arrêtée au jour 12, on observe une diminution de la valeur du pH. Ces résultats suggèrent que l'augmentation du pH dans les réacteurs est due à l'effet de l'agitation qui favorise l'élimination du CO_2 produit par la dégradation de l'acétate. La concentration en bicarbonates du milieu synthétique ne suffit donc pas à contrôler le pH.

Dans le cas de l'effluent entrée biologique tous les réacteurs sont dilués à 50 % avec le milieu synthétique. Les différentes conditions opératoires étudiées sont: le barbotage continu de CO_2 , le barbotage continu de N_2 , l'agitation mécanique et aucun barbotage. Les mesures de pH et DCO sont réalisées quotidiennement. Sous CO_2 , le pH diminue rapidement entre 5,6 et 5,8 et la DCO diminue plus lentement (de 1200 à 800 mg/L après 16 jours). Le réacteur sous N_2 présente une diminution plus rapide de la DCO (de 1200 à 400 mg/L après 16 jours) et une augmentation encore plus rapide du pH, il est égal à 8,5 dès le premier jour

⁸ Le milieu synthétique simplifié est composé de (par L) 1,5 g de NH_4Cl ; 0,6 g de $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$; et 2g de $NaHCO_3$ (Cf paragraphe 1.4.-, chapitre II).

puis supérieur à 9,0 après une semaine. Sous agitation mécanique le pH ne dépasse pas 8 et la DCO se stabilise autour de 700 mg/L après 16 jours. Sans agitation ni barbotage, le pH du milieu évolue jusqu'à 8,7 et la DCO diminue plus rapidement par rapport à tous les autres réacteurs. Ces expériences ont été répétées et nous avons obtenu les mêmes évolutions de pH et DCO.

L'augmentation du pH et la diminution de la DCO de l'effluent sont donc observées même en l'absence de polarisation. Les biofilms EA exploitent principalement l'oxydation de l'acétate, tandis que la DCO de l'effluent leur reste peu accessible. Nous constatons donc l'effet prépondérant des bactéries planctoniques sur l'abattement de la DCO. Toutefois le phénomène peut être expliqué par le fait que les surfaces des électrodes de travail (10 cm^2) sont faibles par rapport au volume de solution à traiter (500 mL). Comme expliqué au paragraphe II.2.1., le dispositif électrochimique a été choisi afin de privilégier les densités de courant et de caractériser au mieux la cinétique des biofilms EA, mais ceci suppose de défavoriser les rendements faradiques. Les performances des PACMs en termes d'abattement de DCO devraient être évaluées avec des prototypes offrant une grande surface d'anode pour un faible volume de solution à traiter. Les expériences décrites ici montrent toutefois que les bactéries planctoniques ont un effet important sur l'abattement total de DCO.

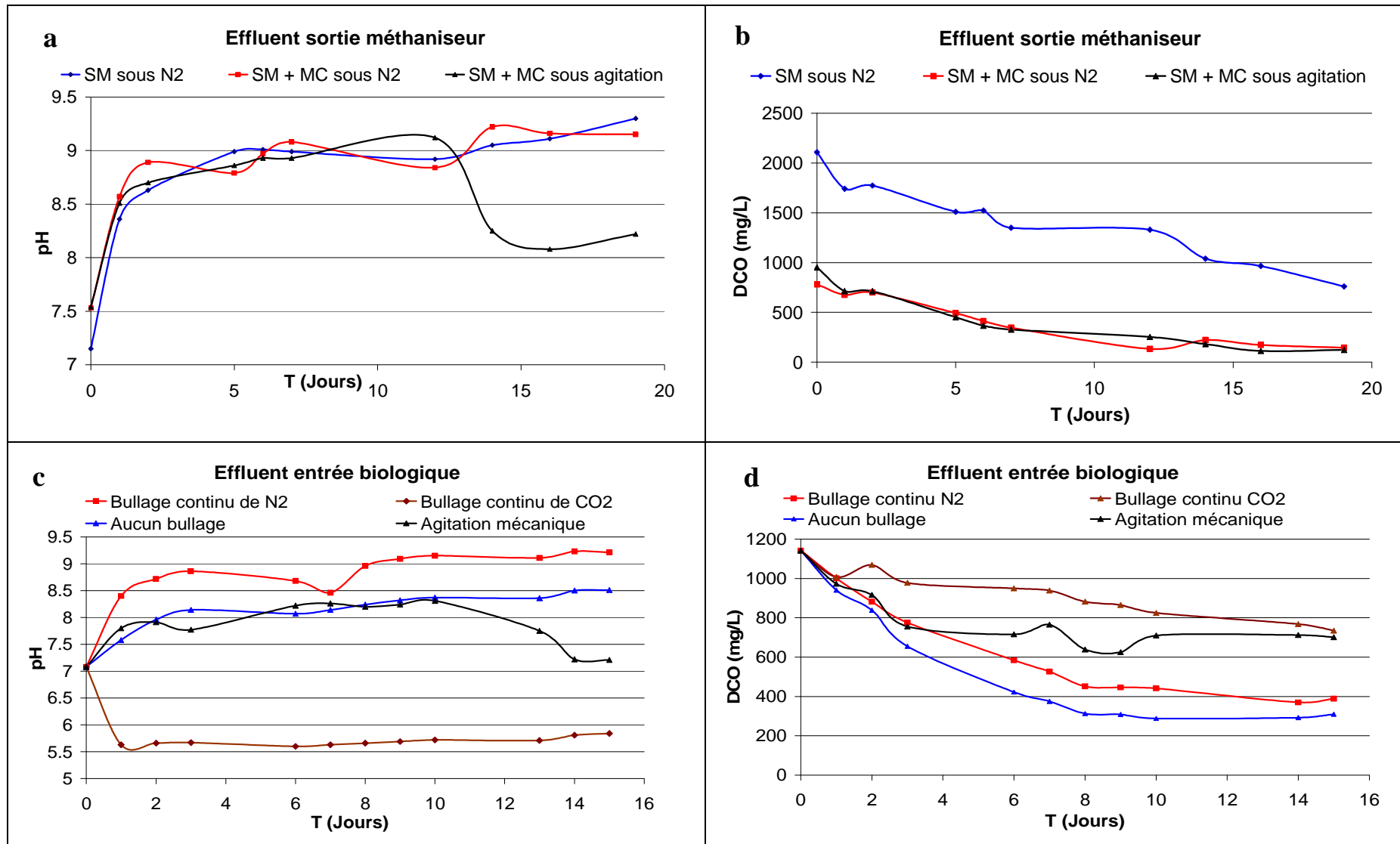


Figure 59: Evolution du pH et de la DCO lors des expériences témoins sans polarisation sous différentes conditions opératoires

IV.7. Essais de polarisation retardée pour la formation de biofilms EA

Les travaux du partenaire LGC au sein du projet *AgriElec* ont suggéré qu'une «polarisation retardée» des anodes pourrait permettre de former des biofilms EA plus performants. Le protocole de polarisation retardée consiste à laisser d'abord les biofilms se former pendant plusieurs jours sur les électrodes non polarisées et de ne les polariser que dans une seconde phase (Pocaznoi *et al.* 2012b). Pour déterminer l'effet éventuel de ce protocole sur nos biofilms, deux réacteurs ont été montés en parallèle et laissés sans polarisation pendant 14 jours avec les effluents issus du méthaniseur. L'un des réacteurs a été placé sous barbotage continu d'azote et le second laissé sans aucun barbotage. Ils ont ensuite été polarisés à -0,3 V. Après 10 jours de polarisation, le biofilm sans barbotage d'azote est placé sous barbotage. Les performances des deux biofilms obtenus sont présentées *Figure 60*.

Le biofilm obtenu après incubation sans barbotage de N₂ génère plus rapidement du courant que celui formé dans le réacteur placé sous barbotage de N₂. Il semble donc que le barbotage d'azote durant la phase d'incubation sans polarisation ralentisse le développement des biofilms EA. En effet, en éliminant l'oxygène, qui doit être l'accepteur d'électrons essentiel lorsque les électrodes ne sont pas polarisées, le développement microbien est fortement réduit, ce qui gêne le développement du biofilm dans la phase initiale d'incubation. Lorsque la polarisation est mise en route, l'électrode devient l'accepteur d'électrons privilégié, le biofilm qui est déjà formé sur l'électrode incubée en présence d'oxygène bascule rapidement son métabolisme en mode de respiration de l'anode. Au contraire, l'anode incubée sous azote possède un biofilm moins développé qui génère moins de courant.

Nous pouvons ainsi conclure que l'incubation sans barbotage d'azote favorise le développement d'un biofilm qui réagit rapidement après la polarisation. Il est aussi intéressant de constater que ce biofilm double ses performances lorsqu'il est finalement mit sous N₂ en continu. La densité de courant et le rendement faradique passent de $J_{max} = 3,2 \text{ A/m}^2$ et $R_{fmax} = 35\%$ sans barbotage à $J_{max} = 5 \text{ A/m}^2$ et $R_{fmax} = 65\%$ en présence de N₂. L'amélioration des performances s'explique par l'établissement de conditions anaérobies qui réduisent l'activité des bactéries planctoniques en compétition avec le biofilm EA.

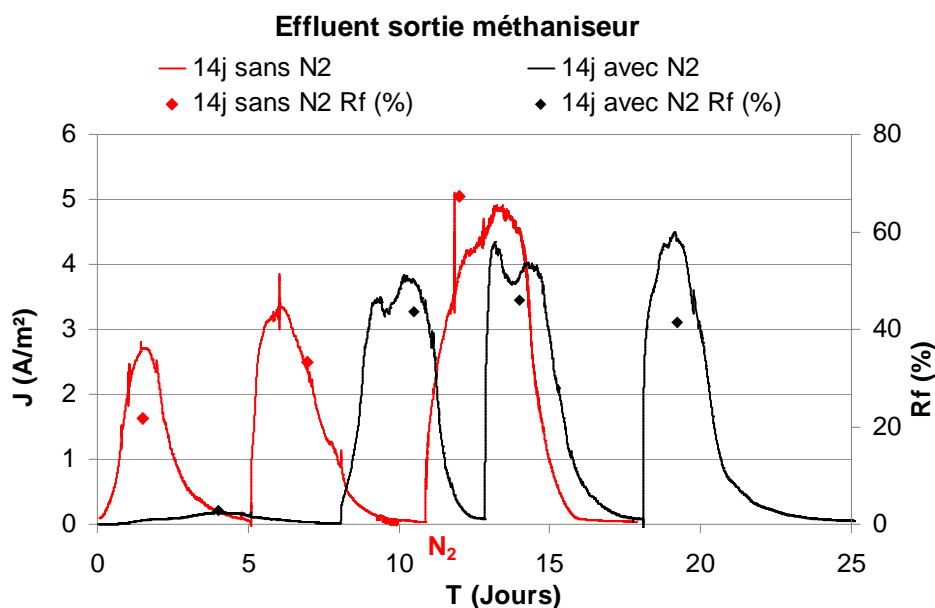


Figure 60: Formation de biofilms EA en polarisation retardée. Les réacteurs sont laissés 14 jours sans polarisation et sans barbotage continu de N_2 (courbe rouge) ou avec barbotage continu de N_2 (Courbe noire). Les électrodes sont ensuite polarisées à $-0,3$ V.

Conclusion

Ce chapitre a abordé l'optimisation de bioanodes élaborées à partir des deux sources d'inoculum sélectionnées dans des effluents papetiers. Les milieux ont été complétés en acétate afin d'évaluer l'influence de plusieurs paramètres sur les performances des biofilms. Les principaux résultats obtenus sont:

Les performances maximales dépendent de la combinaison entre nature du matériau et nature de l'effluent, les densités de courant les plus élevées sont obtenues avec le tissu de carbone dans l'effluent entrée biologique et le feutre de carbone dans l'effluent sortie méthaniseur. Ces deux matériaux ayant présenté des résultats comparables, ils pourront l'un comme l'autre être utilisés pour la conception de prototypes de piles microbiennes. Les plaques de graphite présentent des résultats corrects et plus répétables et ont donc été choisies pour continuer l'étude des paramètres en systèmes à trois électrodes.

Le potentiel optimal observé pour la formation des biofilms EA est compris entre $-0,1$ et $-0,2$ V. Néanmoins nous avons choisi de former les biofilms EA à $-0,3$ V car les performances obtenues à ce potentiel sont proches des valeurs optimales et nous espérons ainsi un effet d'acclimatation des électrodes au potentiel le plus bas possible. En effet, l'anode d'une PACM doit fonctionner au potentiel le plus faible possible pour maximiser la puissance générée. En travaillant à $-0,3$ V on perd très peu en densité de courant par rapport à $-0,2$ V et cette perte devrait être largement compensée en termes de puissance au sein d'une PACM par le gain réalisé sur le potentiel.

La stérilisation de l'effluent par filtration à 0,2 μm n'est pas nécessaire et pourrait même être néfaste pour les performances des biofilms anodiques.

La complémentation de l'effluent par un milieu synthétique n'améliore pas les performances des biofilms anodiques malgré un apport en nutriments (N et P).

Le barbotage de N_2 ou de N_2/CO_2 (80/20%) améliore très fortement les performances en établissant des conditions anaérobies qui empêchent l'oxydation aérobie du substrat. Cet effet n'est lié ni à l'agitation du liquide, ni au pH qui s'établi entre 9,2 et 9,5 sous N_2 , et autour de 7,0 sous N_2/CO_2 .

Une incubation des électrodes dans l'effluent pendant deux semaines avant la mise sous polarisation permet de diminuer le délai de démarrage de l'électro-activité du biofilm qui passe d'une moyenne de 5 jours à 1 jour. Un barbotage de N_2 pendant l'incubation gêne le développement du biofilm sur l'électrode car il lui manque un accepteur d'électrons. L'évolution du courant sous polarisation est alors plus lente.

Les expériences de contrôle réalisées sans polarisation des électrodes ont montré une évolution du pH similaire aux essais réalisés avec polarisation et des abattements de DCO importants. Les valeurs élevées des abattements spontanés de DCO nous alertent sur l'effet prépondérant des bactéries planctoniques pour l'élimination de la DCO. Ce paramètre sera donc important à considérer pour la suite des expériences.

Toutefois, le résultat de cette phase d'optimisation résulte en des valeurs maximales de 11 A/m^2 pour les densités de courant et de 90% pour les rendements faradiques. Ces résultats élevés sont néanmoins obtenus avec une complémentation de l'effluent industriel avec de l'acétate. Ils doivent être confirmés par des essais d'alimentation continue avec des effluents industriels bruts pour envisager une extrapolation ultérieure pour le traitement d'effluents

Chapitre V

Optimisation des bioanodes en conditions industrielle

Introduction

La première phase du travail de thèse présentée dans les deux chapitres précédents consistait à identifier des effluents de l'industrie papetière capables de former des biofilms électro-actifs (EA). Ainsi, des biofilms EA efficaces avec des densités de courant supérieures à 11 A/m^2 et des rendements faradiques par rapport à l'acétate de 90% ont pu être formés avec certains des échantillons papetiers sélectionnés. Des bases solides ont été posées pour définir des conditions opératoires favorables à l'obtention de biofilms anodiques optimaux. On peut citer l'utilisation d'une électrode de travail en carbone, un potentiel imposé de $-0,3 \text{ V}$, le maintien de conditions anaérobies dans les réacteurs et, si possible, la formation de biofilms secondaires par repiquage d'un biofilm primaire dans l'effluent qui ne nécessite pas de filtration préalable. Il a aussi été mis en évidence que l'utilisation d'un milieu de culture synthétique n'était pas nécessaire car elle diluait la DCO de l'effluent entraînant une chute des performances. De même, le contrôle du pH n'est pas nécessaire car les biofilms anodiques formés avaient des performances similaires pour des pH acides ou basiques.

L'objectif des travaux présentés dans le présent chapitre est de déterminer l'efficacité des biofilms anodiques formés à partir d'effluents papetiers en conditions industrielles. En d'autres termes, seraient-ils en mesure de dégrader la matière organique réelle de l'effluent plutôt que l'acétate ajouté ? Le même type d'expériences que celles réalisées avec des ajouts d'acétate ont été effectuées mais dans ce cas les réacteurs ont été alimentés uniquement avec l'effluent industriel brut qui sert à la fois de substrat et d'inoculum. Divers paramètres ont ainsi été étudiés en vue d'optimiser les propriétés catalytiques des biofilms EA obtenus dans ces conditions.

Deux modes d'alimentation des réacteurs ont été testés pour ces essais. Le mode continu qui présente l'avantage d'un apport continu de substrat. Il génère cependant des difficultés techniques pour maintenir un débit constant à cause du colmatage des tuyaux d'alimentation malgré la centrifugation préalable des effluents industriels. Le mode batch séquentiel quant-à lui permet de mieux contrôler le flux de substrat apporté au réacteur par une intervention manuelle régulière. Toutefois, il entraîne de fortes variations de concentration dans les réacteurs et il est moins bien adapté à une application industrielle pour le traitement de volumes importants d'effluents.

A notre connaissance, les expériences présentées dans ce chapitre sont les premières réalisées avec un système à trois électrodes pour l'étude des biofilms anodiques formés sous différents modes d'alimentation avec des effluents réels. En effet, les nombreuses études qui utilisent des effluents sans ajout de substrat supplémentaire avec des alimentations continues semblent avoir toujours été menées avec des dispositifs de type pile, c'est-à-dire sans contrôle du potentiel d'électrode. Les dispositifs à trois électrodes semblent jusqu'à présent réservés aux études de caractère plus fondamental réalisées en batch avec des ajouts de substrat (type acétate). Ici, au contraire, nous conservons le contrôle strict du potentiel pour étudier l'effet

sur les biofilms EA des paramètres liés à l'alimentation des effluents bruts: temps de rétention hydraulique (TRH), flux de DCO et concentration de l'effluent.

V.1. Expériences réalisées en alimentation continue

V.1.1. Effluent sortie méthaniseur

V.1.1.1. Vérification des conditions de stockage des effluents

L'effluent industriel utilisé comme substrat pour alimenter les réacteurs est prélevé une à deux fois par mois sur le site industriel et stocké en chambre froide à 4°C. Il nous a semblé important de vérifier l'évolution des échantillons (DCO, pH) au cours du stockage, pour savoir combien de temps nous pouvions utiliser un effluent prélevé sur site sans une trop grande modification de ses caractéristiques. Les évolutions des valeurs de DCO et de pH d'un effluent sortie méthaniseur brut suivies pendant un mois à 4°C en conditions anoxiques sont présentées sur la *Figure 61*.

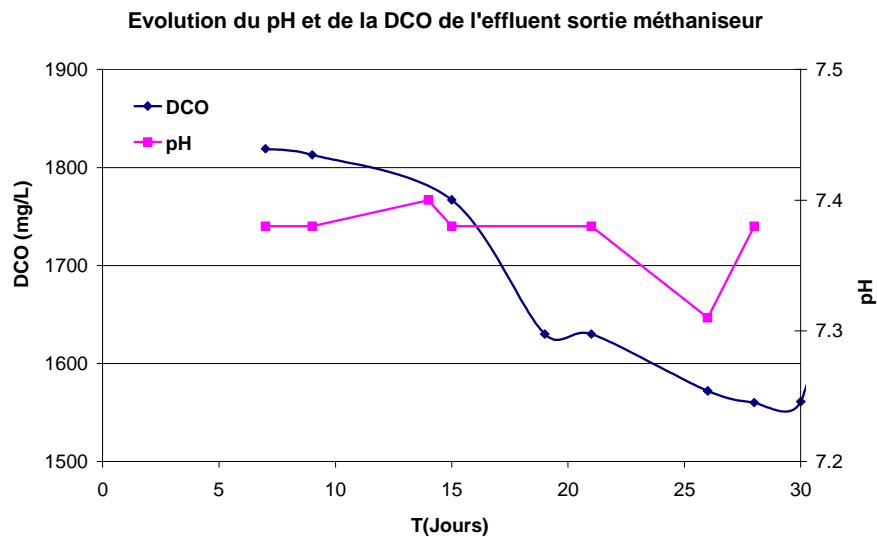


Figure 61: Evolution du pH et de la DCO de l'effluent sortie méthaniseur stocké à 4°C pendant un mois.

La DCO varie entre 1820 et 1550 mg/L et le pH reste stable entre 7,3 et 7,4. La variation relativement faible des deux paramètres durant 30 jours nous a conduits à définir un délai maximum de 30 jours pendant lequel les échantillons collectés sur site et stockés à 4°C pourront être utilisés pour les expériences. Une part significative de la DCO est liée à la présence d'acides gras volatils (AGVs) non éliminés lors de la méthanisation des effluents. Ces AGVs sont l'acide acétique (200 mg/L), l'acide propionique (98 mg/L) et l'acide butyrique (36 mg/L). On retrouve aussi à l'état de trace (< 10 mg/L) les acides lactique,

formique, isobutyrique, valérique et isovalérique. Le suivi des AGVs avec le temps montre que ces acides diminuent à 64, 29, 35 mg/L respectivement. Par contre, l'acide lactique augmente légèrement passant ainsi de 10 à 16 mg/L après une semaine de conservation de l'effluent en chambre froide.

V.1.1.2. Formation des biofilms EA en présence d'acétate

Pour favoriser la formation rapide de biofilms électro-actifs, un biofilm EA primaire a été formé sous acétate (30 jours et 4 ajouts d'acétate) puis utilisé pour former quatre biofilms secondaires en ensemençant quatre réacteurs contenant 500 mL d'effluent sortie méthaniseur. Les réacteurs ont d'abord été alimentés en batch par l'effluent sortie méthaniseur complété par 5 mM d'acétate (équivalent à 300 mg/L de DCO) puis, après une semaine, l'alimentation a été basculée en mode continu avec l'effluent brut sans acétate (**Figure 62**).

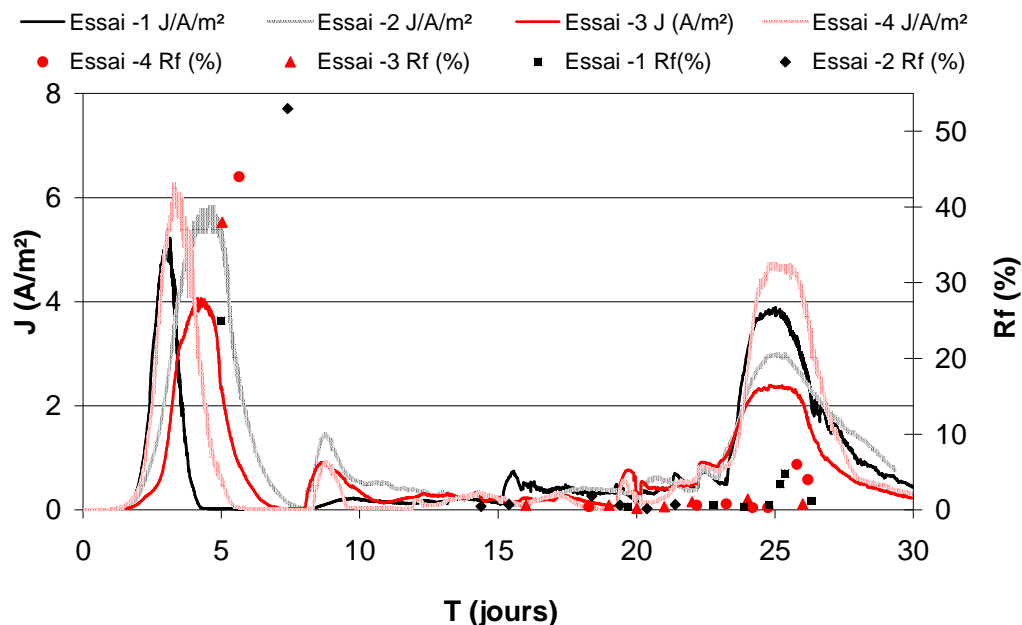


Figure 62: Performances de biofilms secondaires formés pendant une semaine (du jour 0 au jour 8) en alimentation batch sous acétate. A partir du jour 6 le réacteur passe en alimentation continue avec l'effluent brut (du jour 8 au jour 23). Au jour 23 de l'acétate est ajouté dans l'effluent, toujours en alimentation continue. Les électrodes sont des plaques de graphite 10 cm² polarisées à -0,3V.

On observe pour tous les réacteurs durant la première semaine un développement rapide de l'activité des biofilms EA, avec des pics de courant de 4 à 6 A/m² liés à l'oxydation de l'acétate introduit dans le milieu. Les rendements faradiques calculés pour ces pics varient entre 28 et 55%. A partir du jour 8, les réacteurs sont alimentés en continu avec l'effluent brut (DCO de l'ordre de 1500 mg/L) avec un TRH de 24 h. On observe une chute de près de 90% des performances de tous les biofilms pendant les 15 jours d'alimentation en continu. Au jour 23, nous avons ajouté 10 mM d'acétate dans l'effluent qui alimente les réacteurs en continu

pour déterminer si les faibles performances observées étaient dues à la nature du substrat ou à une perte de l'efficacité des biofilms. Les densités de courant ont augmenté jusqu'à des maximums de 2,5 à 4,5 A/m² pour les quatre électrodes. Cette augmentation du courant avec l'ajout d'acétate montre clairement que le substrat apporté par l'effluent brut est difficilement oxydable par ces biofilms EA. On suppose que les micro-organismes constituant le biofilm primaire sont majoritairement acéto-dépendants car formés en présence d'acétate. Ils seraient donc peu adaptés à l'oxydation des substrats plus complexes contenus dans l'effluent papetier. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons décidé de former de nouveaux biofilms directement à partir de l'effluent industriel brut sans ajout préalable d'acétate.

V.1.1.3. Formation de biofilms EA avec l'effluent brut

Le but de cette expérience est de former un biofilm EA directement avec un effluent sortie méthaniseur brut (DCO = 1500 mg/L). Le réacteur est inoculé avec 500 mL d'effluent. Il est laissé en batch sans alimentation pendant une semaine pour favoriser la colonisation de l'électrode par les micro-organismes, puis alimenté en continu avec l'effluent brut pendant près de 65 jours. L'évolution de la densité de courant avec le temps est présentée sur la **Figure 63**.

Malgré quelques aléas expérimentaux dus aux bouchages fréquents des tuyaux qui ont parfois fait chuter le courant, nous constatons tout au long de l'expérience que la densité de courant maximale évolue entre 3 et 4 A/m².

Cette expérience met en évidence l'importance des conditions opératoires initiales de formation d'un biofilm EA sur son activité. En effet, il apparaît clairement qu'il est possible de former et maintenir pendant une longue durée les performances d'un biofilm EA avec un effluent réel si et seulement si celui-ci est conditionné à ce milieu complexe dès le départ.

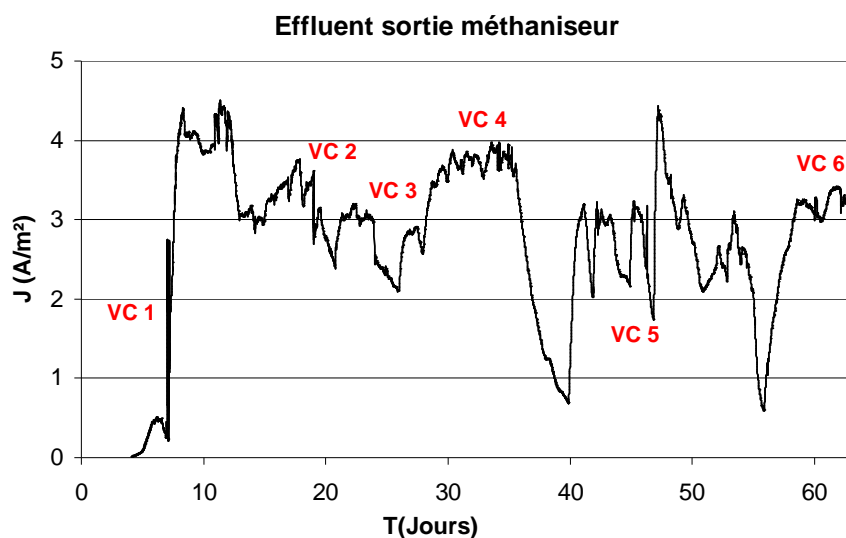


Figure 63: Biofilm EA primaire formé avec l'effluent sortie méthaniseur brut sous barbotage de N₂ en continu. Le réacteur est laissé une semaine en batch puis alimenté en continu avec un TRH de 24 h. VCx = voltammétries cycliques réalisées aux différents points indiqués sur le graphe.

V.1.1.3.1. Voltammétries cycliques à différents stades du développement du biofilm

La chronoampérométrie a été interrompue à plusieurs reprises lors de la formation du biofilm pour effectuer des mesures de voltammétrie cyclique à la vitesse de balayage de 1 mV/s. Toutes les VC présentent un plateau de courant maximal qui débute à des potentiels compris entre -0,2 et 0,1 V en fonction du stade de développement du biofilm (*Figure 64*).

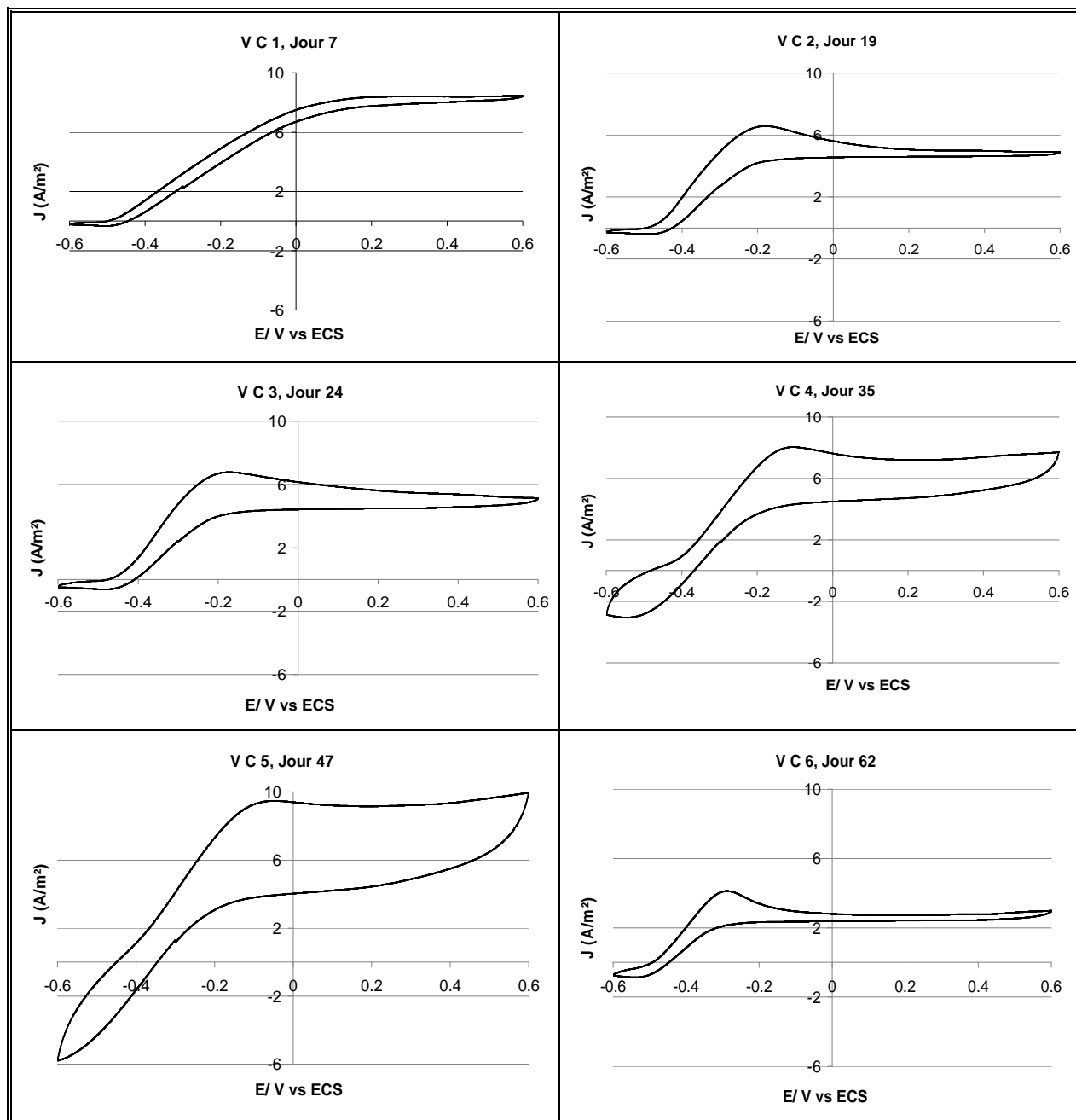


Figure 64: Voltammétries cycliques à 1 mV/s obtenues lors de la formation du biofilm de la *Figure 63*

Les densités de courant maximum de 3 à 10 A/m² sont atteintes pour des potentiels de -0,2 à -0,1 V. Les différentes VCs présentent au potentiel de -0,3 V des densités de courant similaires à celles relevées sur les CA aux moments du tracé. Les VCs rendent donc bien compte du comportement stationnaire du biofilm au moment de leur tracé.

Lors de la première voltammétrie (VC1), le biofilm n'est pas encore mature car le J_{max} obtenu à -0,3 V est seulement de 2 A/m² et le maximum de courant est obtenu pour des potentiels très élevés à partir de 0,1 V. Les deuxièmes et troisièmes voltammétries (VC2 et VC3) sont très semblables, le biofilm a déjà atteint sa maturité car la densité de courant maximale de 6 à 7 A/m² est obtenue dès -0,2 V. Avec les voltammétries suivantes (VC4 et VC5), on observe l'apparition d'un effet capacitif qui augmente de VC4 à VC5. Ce phénomène pourrait être lié à l'épaississement du biofilm dû à une accumulation des ions. On observe aussi l'apparition de phénomènes de réduction avec des densités de courant entre -3 et -6 A/m² pour des gammes de potentiels de -0,4 à -0,6 V. Ces courants pourraient caractériser la présence d'un produit précédemment accumulé dans le biofilm lors de l'étape d'oxydation qui ensuite se réduit; ce phénomène serait lié au ralentissement de la diffusion due à l'épaisseur du biofilm. Ils pourraient aussi être dus à l'apparition d'un nouveau médiateur redox capable d'intervenir dans des réactions de réduction. Enfin, notons que la voltammétrie VC6 présente un biofilm complètement mature car J_{max} (4 A/m²) est obtenu dès -0,3 V.

La voltammétrie VC1 présente un profil général différent de toutes les autres car sur ces dernières un pic d'oxydation apparaît autour de -0,2 V qu'on n'observe pas sur la VC1. Ce pic est caractéristique d'une étape limitante de transfert de charge récemment décrite dans la bibliographie (Strycharz *et al.* 2011).

V.1.1.3.2. Voltammétries cycliques à différentes vitesses de balayage

Au jour 35 de l'expérience de formation du biofilm (*Figure 63*), des voltammétries ont été réalisées à différentes vitesses de balayage de 100 à 1 mV/s (*Figure 65*). Toutes ces voltammétries présentent une même allure, avec des phénomènes capacitifs plus prononcés à forte vitesses de balayage. Jusqu'à 10 mV/s, on observe une réponse remarquable du biofilm qui ne bouge pratiquement pas lorsqu'on augmente la vitesse de balayage. Le biofilm répond très rapidement et les voltammétries présentent une bonne évaluation des propriétés stationnaires puisque le courant obtenu à -0,3 V a la même valeur que celui mesuré en CA. Pour des vitesses de balayage plus élevées, de 20 à 100 mV/s, les courants capacitifs, dont l'intensité est proportionnelle à la vitesse de balayage, sont observés. L'apparition d'un courant de réduction qui augmente avec la vitesse de balayage fait émettre l'hypothèse d'une limitation de diffusion dans le biofilm épais. Un produit généré pendant le balayage en oxydation et qui n'a pas le temps de diffuser hors du biofilm, pourrait être réduit sur l'électrode. Notre hypothèse est confortée par l'absence de ce pic de réduction à des vitesses

de balayage lentes qui laissent le temps à ce produit de diffuser hors du biofilm avant que les potentiels les plus faibles ne soient atteints.

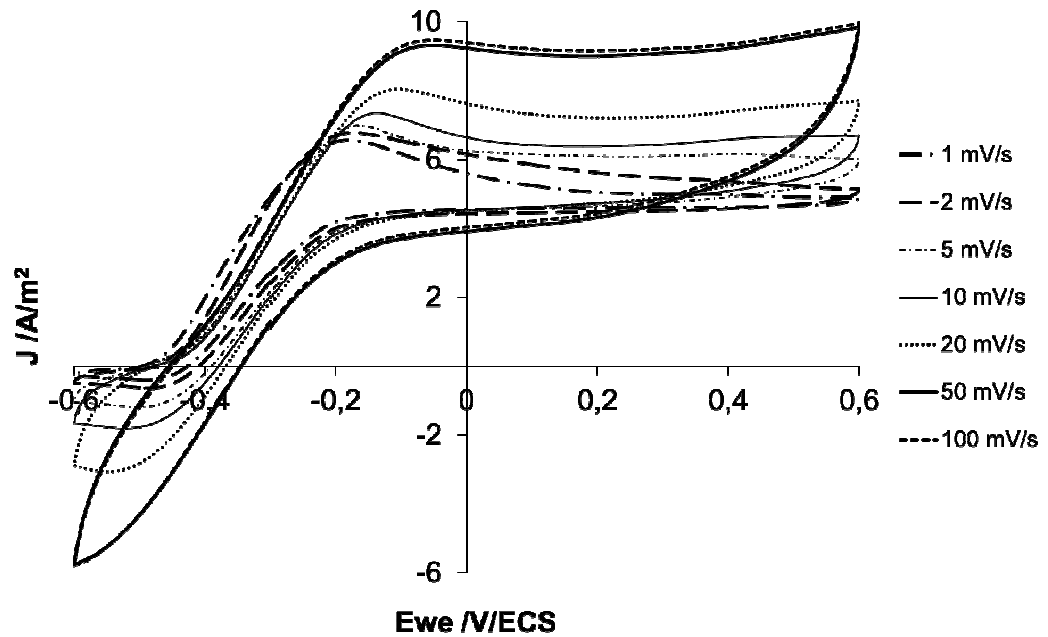


Figure 65: Voltammétries cycliques à différentes vitesses de balayage au jour 32 sur la CA de la Figure 63.

V.1.1.4. Suivi de l'abattement de DCO de l'effluent brut et du rendement faradique

Un deuxième biofilm a été formé et testé pendant près de 45 jours avec l'effluent sortie méthaniseur brut dans les mêmes conditions que précédemment en vue d'étudier ses performances en termes d'abattement de DCO et de rendement faradique (*Figure 66*).

La densité de courant maximale se stabilise dans la même gamme que le biofilm précédent (*Figure 63*) entre 4 et 4,5 A/m² (*Figure 66*).

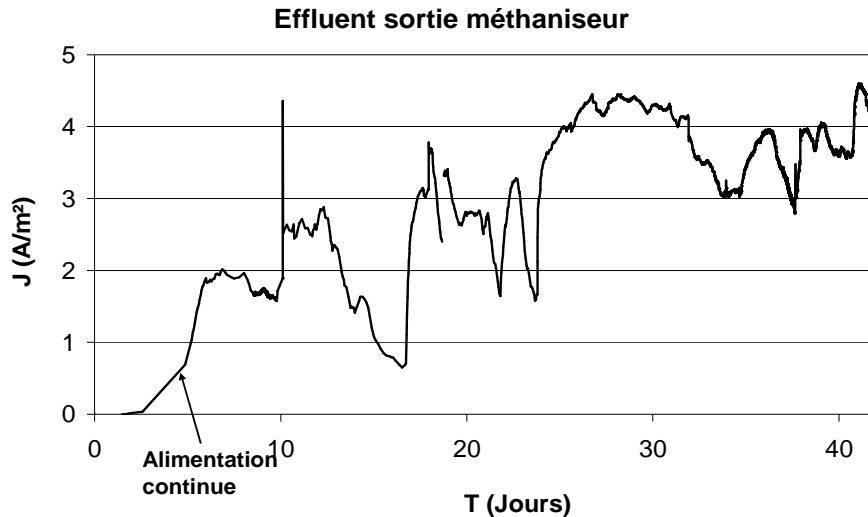


Figure 66: Biofilm EA primaire formé avec l'effluent sortie méthaniseur brut à $-0,3V$ et sous barbotage de N_2 continu. Le réacteur est laissé en mode batch pendant 5 jours puis mis en alimentation continue avec un TRH de 24 h.

Les performances de ce biofilm en termes d'abattement de DCO et rendement faradique sont présentées dans le **Tableau 8**. Les moyennes sont calculées à partir de 3 à 5 valeurs mesurées pour chaque semaine d'expérience. Pendant les 3 premières semaines, la valeur moyenne de l'abattement de DCO reste stable autour de 20%. Pendant les deux dernières semaines, un effluent frais est utilisé pour alimenter le réacteur, on observe un doublement de la valeur de l'abattement de la DCO qui passe à 40%. Le rendement faradique diminue en conséquence de 25% à 13% pendant les mêmes périodes car le courant n'augmente pas. Ces performances restent faibles par rapport à celles des expériences réalisées en alimentation batch avec ajout d'acétate pour la formation de biofilms primaires (10 A/m² de densité de courant et 90% de rendement faradique (Cf figure paragraphe IV.5), mais elles sont meilleures que celles des biofilms formés sous acétate puis alimentés en continu avec l'effluent brut (**Figure 62**).

| Valeur moyenne | Semaine 2 | Semaine 3 | Semaine 4 | Semaine 5 |
|------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| DCO entrée (mg/L) | 1091 | 1200 | 1505 | 1274 |
| DCO résiduelle (mg/L) | 921 | 1063 | 804 | 842 |
| Abattement DCO ($\pm 6\%$) | 19 | 21 | 47 | 35 |
| Rf ($\pm 1\%$) | 22 | 30 | 15 | 12 |

Tableau 8: Performances du biofilm EA présenté **Figure 66**.

La voltammétrie réalisée à la vitesse de 1 mV/s en fin d'expérience (Jour 42) présente une vague d'oxydation qui atteint un plateau autour de 6 A/m² à partir de -0,3 V (*Figure 67*).

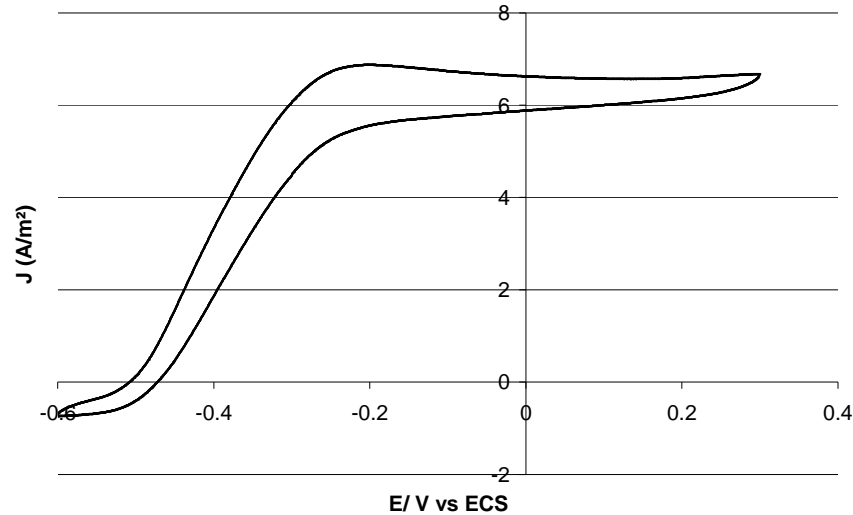


Figure 67: Voltammétrie cyclique réalisée au jour 43 avant l'arrêt de l'expérience de CA de la Figure 66.

Le courant mesuré à -0,3 V (6,5 A/m²) est supérieur à celui mesuré en CA (4,5 A/m²). Ceci pourrait être expliqué par le fait que la voltammétrie a été réalisée sur une pente ascendante de la CA et a débuté par un balayage en réduction. Le balayage en réduction présente en effet une densité de courant similaire à celle observée sur la CA au potentiel de -0,3 V, alors que le balayage retour (en oxydation) plus d'une heure plus tard, donne un courant plus élevé (6,5 A/m²). Ceci nous laisse supposer que le biofilm s'est développé un peu plus durant la réalisation de la VC qui dure au total plus de 2 heures (3 cycles), nous présentons le second cycle

L'observation de l'électrode réalisée au microscope électronique à balayage (MEB) en fin d'expérience montre une forte colonisation (*Figure 68*). On distingue dans le biofilm des bactéries engluées dans une couche très épaisse que l'on suppose être des exopolymères, ainsi que de nombreux filaments. Les pilis présentés dans la littérature comme propices au transfert d'électrons dans les biofilms EA épais ne font que quelques dizaines de nanomètres de diamètres (Reguera *et al.* 2006). Les filaments observés sur ces photos sont plus gros que les pilis décrits dans la littérature et pourraient correspondre à des bactéries filamenteuses. Ils semblent interconnecter les bactéries entre elles mais leur participation ou non au transfert d'électrons n'a pas été déterminé.

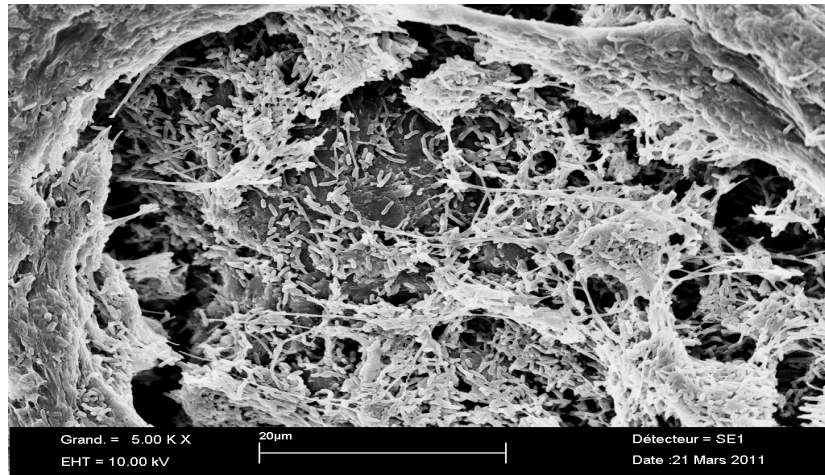
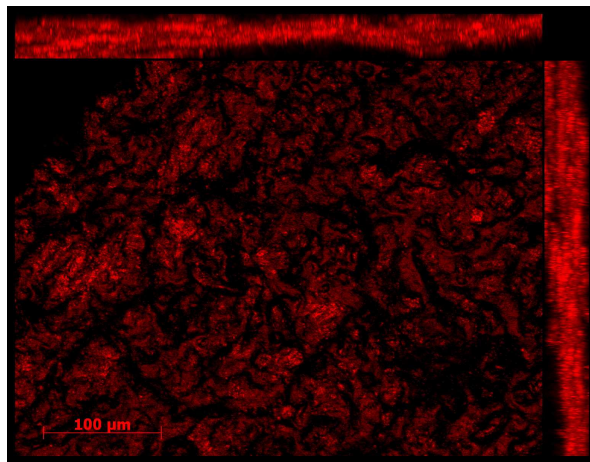


Figure 68: Photo au MEB de la surface de l'électrode de la **Figure 66** à la fin de l'expérience. Photo réalisée par le LGC.

La caractérisation au microscope en épifluorescence de l'électrode en fin d'expérience (**Figure 69**) confirme l'observation déjà faite précédemment au MEB à savoir que le biofilm est constitué en partie d'une épaisse couche de polymères. Celle-ci a été différenciée des micro-organismes grâce à un marquage spécifique permettant de différencier les micro-organismes et la matrice extracellulaire d'un biofilm et représentée séparément du biofilm sur la photo B.

A



B

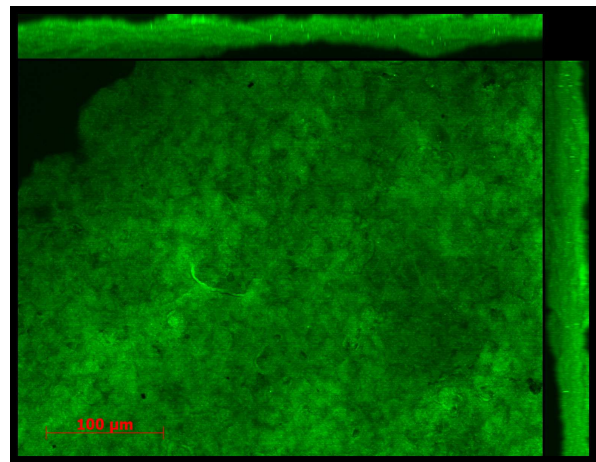


Figure 69: Photos de microscopie à épifluorescence de la surface de l'électrode de la **Figure 66** en fin d'expérience. A) Micro-organismes uniquement, B) Micro-organismes + matrice. Photo réalisée par le LGC.

V.1.1.5. Effet du temps de rétention hydraulique (TRH) à flux de DCO variable

Deux expériences ont été réalisées avec des biofilms primaires. Les réacteurs de 500 mL ont été inoculés avec l'effluent sortie méthaniseur sans aucun ajout de substrat supplémentaire, laissés cinq jours en batch pour favoriser la colonisation de l'électrode puis placés en alimentation continue avec l'effluent sortie méthaniseur brut à différents TRH (*Figure 70*).

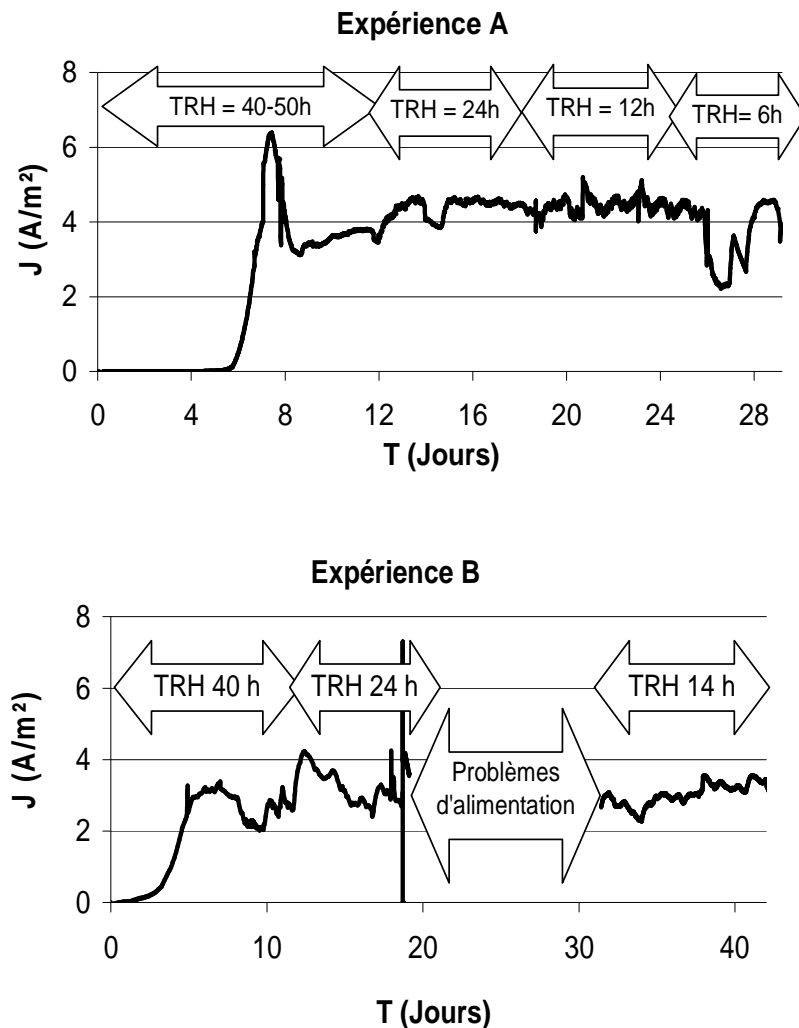


Figure 70: Densités de courant en fonction du TRH avec l'effluent sortie méthaniseur brut. Les conditions anaérobies sont maintenues par barbotage continu de N₂. Les électrodes sont en plaque de graphite 10 cm²; potentiel imposé -0.3 V. Les expériences A et B sont réalisées à 1 an d'intervalle.

Les valeurs de TRH varient de 48 à 6 heures suivant le débit appliqué (0,25L/jour à 2 L/jour) alors que la DCO de l'effluent évolue spontanément dans les conditions de stockage de 1600 à 1300 mg/L pour l'expérience A. La *Figure 70* indique que la densité de courant reste stable autour de $4,5 \pm 0,5$ A/m² pendant les 28 jours d'expérience malgré le flux journalier de DCO qui augmente de 0,4 à 2,4 g/jour. Le même profil est observé pour

l'expérience B avec une densité de courant constante autour de $4 \pm 0,5$ A/m² pour des TRH entre 41 h et 14 h, une DCO en entrée entre 1300 et 1080 mg/L et un flux de DCO journalier entre 0,3 et 1,4 g/jour pendant les 30 jours d'expérience (10 jours pendant lesquels des difficultés d'alimentation ont été rencontrées ne sont pas pris en compte).

Les performances des deux biofilms en termes de rendement faradique et d'abattement de DCO sont présentées dans le **Tableau 9**.

D'après le **Tableau 9** les abattements de DCO restent constants (de 21 à 25%) alors que le rendement faradique diminue (de 25% à 7%) lorsque le TRH diminue de 48 à 6 h pour l'expérience A. Ces paramètres varient dans le même ordre avec l'expérience B: l'abattement de DCO varie peu (de 21 à 33%) alors que le rendement faradique diminue de 16 à 4% pour des TRH entre 41 et 14 h. A la lumière de ces résultats, on peut conclure que le TRH n'est pas un facteur limitant pour l'abattement de la DCO dans ces conditions expérimentales.

| Expérience A | | | | |
|------------------------------|----------|----------|----------|---------|
| Valeur moyenne par semaine | TRH 48 h | TRH 24 h | TRH 12 h | TRH 6 h |
| Flux de DCO (g/jour) | 0.4 | 0.7 | 1,3 | 2,4 |
| DCO entrée (mg/L) | 1623 | 1443 | 1389 | 1284 |
| DCO résiduelle (mg/L) | 1257 | 1145 | 1097 | 893 |
| Abattement DCO ($\pm 6\%$) | 23 | 21 | 22 | 20 |
| Rf ($\pm 1\%$) | 25 | 20 | 12 | 7 |

| Expérience B | | | |
|------------------------------|----------|----------|----------|
| Valeur moyenne par semaine | TRH 41 h | TRH 24 h | TRH 14 h |
| Flux de DCO (g/jour) | 0.3 | 0.5 | 1,4 |
| DCO entrée (mg/L) | 1200 | 1080 | 1300 |
| DCO résiduelle (mg/L) | 978 | 813 | 1009 |
| Abattement DCO ($\pm 6\%$) | 21 | 25 | 33 |
| Rf ($\pm 1\%$) | 16 | 12 | 4 |

Tableau 9: Evolution du Rendement faradique (Rf) et de l'abattement de la DCO des expériences présentés **Figure 70**.

La constance de l'abattement de DCO observée ici alors que le TRH diminue est un résultat différent de ceux présentés dans de nombreuses études qui stipulent que l'abattement

de DCO est proportionnel au TRH (Liu *et al.* 2004; Min et Logan 2004; You *et al.* 2006; Huang *et al.* 2009; Di Lorenzo *et al.* 2010). Cette différence peut être expliquée par la faiblesse du rapport entre surface de l'électrode et volume des réacteurs (10 cm² pour 500 mL). Le choix d'un faible rapport surface/ volume a été effectué pour avoir une distribution de courant la plus uniforme possible à la surface de l'électrode et ne pas pénaliser le développement des biofilms par un manque de nutriments. Grâce à ce choix nous avons obtenu des densités de courant parmi les plus élevées pour un effluent brut malgré la faible quantité de substrats facilement assimilable contenue dans l'effluent papetier. Cette hypothèse est appuyée par les densités de courant qui restent constantes avec la variation du TRH.

Ce choix entraîne par contre des rendements faradiques faibles car la transformation de la DCO due au processus électrochimique est faible (proportionnelle à la surface de l'électrode et en compétition avec les transformations de DCO spontanées qui ont lieu dans le milieu). Il faut noter que les rendements faradiques ont été calculés par rapport à l'abattement global de la DCO (Cf. *Équation 40*), ces valeurs indiquent donc la contribution exacte des processus électrochimiques dans les abattements de DCO. D'après les valeurs de rendements faradiques observés pour les deux expériences, l'impact électrochimique sur l'abattement de la DCO est faible entre 25 et 7% dans l'expérience A et 16 et 4% dans l'expérience B.

Pour les deux expériences, les rendements faradiques diminuent avec un apport en substrat de plus en plus élevé. La diminution du rendement faradique avec le TRH avait déjà été observée par Huang *et al.* (2009) avec les effluents papetiers. Avec une PACM équipée d'une cathode à air, ces auteurs avaient obtenu des rendements faradiques entre 13 et 39% en augmentant le TRH de 2 à 25 h. Ils ont conclu, de manière logique, que des TRH élevés étaient nécessaires pour oxyder une grande proportion de matière organique dans l'effluent (Huang *et al.* 2009).

De faibles rendements faradiques sont généralement obtenus dans les PACMs qui utilisent des effluents réels. On peut citer quelques exemples de rendements obtenus avec des PACMs équipées de cathodes à air en alimentation continue présentés dans la bibliographie : 12% avec un effluent provenant d'un clarificateur primaire (Liu *et al.* 2004) ou 27% avec un effluent domestique pour un TRH de 3,4 h (Cheng et Logan 2006b). Plusieurs hypothèses dont nous partageons les raisonnements ont été proposées pour expliquer ce phénomène. Il a été suggéré d'une part qu'une fraction importante de la matière organique de l'effluent était perdue dans des réactions qui ne génèrent pas d'électricité, telles que les respirations aérobie ou anaérobie qui utilisent des accepteurs d'électrons présents dans l'effluent (nitrate, sulphate...). D'autre part, l'augmentation de la biomasse avec le temps dans les réacteurs augmente la DCO de l'effluent, faussant ainsi les calculs de rendement (Min et Logan 2004; Liu *et al.* 2004). Pour étayer ces hypothèses, nous avons réalisé des expériences de contrôle avec des électrodes non polarisées dans les mêmes conditions d'alimentation. Ces expériences ont donné des gammes d'abattement de la DCO similaires à celles obtenues avec des électrodes polarisées, ce qui confirme la faiblesse de la contribution électrochimique à l'abattement de la DCO.

Des voltammétries ont été réalisées à 1 mV/s aux jours 19 pour les expériences A et B (*Figure 71*).

Au potentiel de -0,3V, les densités de courant ne sont que légèrement supérieures à celles obtenues durant les différentes CAs (5 A/m² au lieu de 4 A/m² au jour 19). La vitesse de balayage de 1 mV/s est par conséquent suffisamment lente pour rendre compte des caractéristiques stationnaires des électrodes. Des courants maximaux de 6,5 A/m² pour l'expérience A et 8 A/m² pour l'expérience B auraient pu être obtenus si les électrodes avaient été polarisées à -0.1 V.

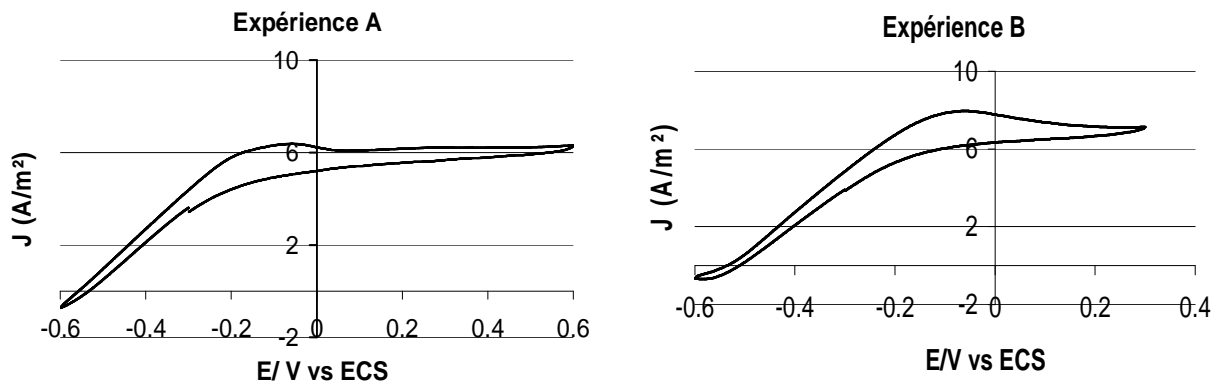


Figure 71: Voltammétries cycliques (1 mV/s) réalisées à J_{max} aux jours 19 pour les deux biofilms EA présentés sur la CA *Figure 70*.

Des photos au MEB réalisées à la fin de l'expérience A sont présentées sur la *Figure 72*. Ces images montrent une forte densité de micro-organismes ayant une même forme et englobés dans une matrice d'exopolymères.

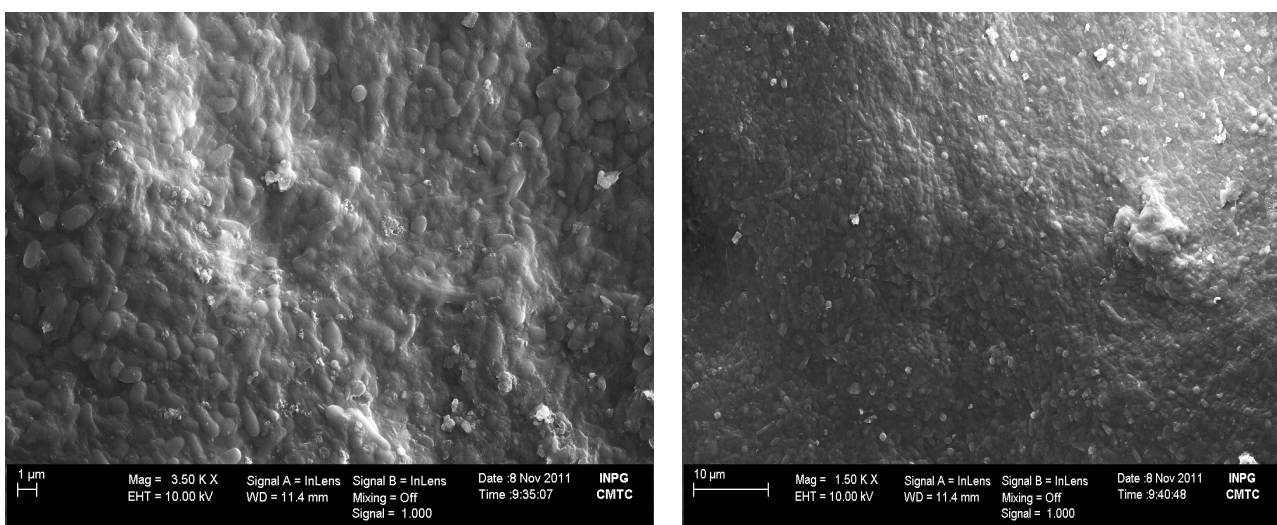


Figure72: Photos au MEB de l'électrode à la fin de l'expérience A à 2 grossissements 3,5 KX et 1,5 KX.

V.1.1.6. Effet du temps de rétention hydraulique (TRH) à flux de DCO constant

Pour ces expériences, deux biofilms primaires ont été formés en parallèle dans deux réacteurs électrochimiques de 500 mL. Chaque réacteur contient de l'effluent sortie méthaniseur brut. Les réacteurs sont placés en alimentation continue avec l'effluent brut à différents TRH pour un même flux de DCO. L'évolution du courant avec le temps pour les deux expériences est présentée sur la *Figure 73*.

Ces deux expériences présentent des évolutions de densités de courant presque superposables. Pendant les dix-huit premiers jours, le TRH est de 24 h, on observe des valeurs de J_{max} qui atteignent $2,8 \text{ A/m}^2$ et $3,5 \text{ A/m}^2$ pour les expériences A et B respectivement. Le débit d'alimentation est progressivement augmenté et simultanément la DCO en entrée est diminuée de façon à ce que le flux de DCO reste proche. On peut ainsi avoir un TRH qui diminue tout en conservant stable le flux de DCO.

La densité de courant diminue avec le TRH malgré le flux de DCO constant. Les valeurs moyennes des densités de courant pour les deux expériences passent ainsi à $1,8 \text{ A/m}^2$ pour un TRH de 18h à $0,9 \text{ A/m}^2$ pour un TRH de 12h. Lorsque la concentration de l'effluent est restaurée à des valeurs supérieures à 1000 mg/L de DCO et le TRH à 24h, les densités de courant retrouvent leurs valeurs maximales ($3,2 \text{ A/m}^2$ pour l'expérience A et $3,8 \text{ A/m}^2$ pour l'expérience B).

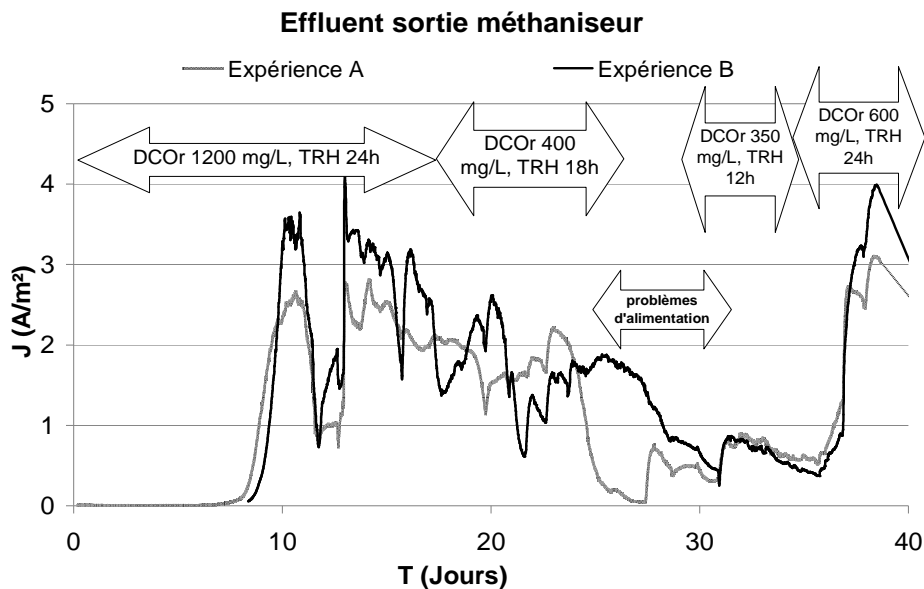


Figure 73: Densités de courant en fonction du temps pour deux biofilms EA primaires formés en parallèle pendant 40 jours en alimentation continue, à flux de DCO constant. Les réacteurs sont sous N_2 en continu tout au long de l'expérience. Les électrodes en plaques de graphite de 10 cm^2 sont polarisées à -0.3 V . DCOr = DCO résiduelle dans les réacteurs.

En complément des expériences présentées au paragraphe V.1.1.5., ces expériences montrent que la densité de courant est limitée par une faible concentration en substrat organique résiduelle dans le réacteur même si la charge organique journalière est maintenue constante en augmentant le TRH. En effet, dans les expériences précédentes, la DCO résiduelle dans le réacteur était maintenue à des valeurs élevées supérieures à 800 mg/L, ce qui a permis de maintenir la densité de courant constante. Dans ces expériences, lorsque la DCO résiduelle est supérieure à 600 mg/L, J_{max} reste à des valeurs maximales. Il commence à diminuer pour une valeur de 400 mg/L pour chuter drastiquement en dessous de cette valeur.

Les rendements faradiques restent faibles pour ces expériences à flux de DCO constant. Néanmoins, la diminution des performances des biofilms EA avec la DCO résiduelle dans le réacteur est confirmée. Cette évolution suit celle de J_{max} présentée dans le paragraphe précédent. En effet, quelque soit le TRH, les rendements faradiques diminuent drastiquement pour une DCO résiduelle de 350 mg/L. Ils ré-augmentent à partir du jour 37, lorsque la DCO résiduelle est ramenée à 600 mg/L.

| Valeur moyenne | TRH=24 h; 20 jours | | | TRH=18 h; 9 jours | | | TRH=12 h; 7 jours | | | TRH=24 h; 7 jours | | |
|------------------------|-----------------------|----------|----------|----------------------|----------|----------|----------------------|----------|----------|----------------------|----------|----------|
| Flux DCO (g/j) | 0,8 | | | 0,5 | | | 0,5 | | | 0,5 | | |
| DCO entrée (mg/L) | 1600 | | | 800 | | | 500 | | | 1000 | | |
| DCO résiduelle (mg/L) | 1200 | | | 400 | | | 350 | | | 600 | | |
| Expériences | A | B | T | A | B | T | A | B | T | A | B | T |
| J_{max} | 3,5 | 2,8 | | 2,2 | 1,8 | | 0,8 | 0,9 | | 3,8 | 3,2 | |
| Abat DCO ($\pm 6\%$) | 37 | 45 | 34 | 37 | 30 | 28 | 34 | 36 | 30 | 31 | 31 | 32 |
| Rf ($\pm 1\%$) | 3 | 10 | | 9 | 13 | | 4 | 2 | | 13 | 6 | |

Tableau 10: Performances de biofilms EA formés en parallèle et présentés sur la **Figure 73** (A= expérience A et B = expérience B) et d'une expérience témoin réalisée dans les mêmes conditions opératoires avec des électrodes non polarisées (T = expérience témoin).

Une expérience de contrôle a été réalisée dans les mêmes conditions opératoires avec des électrodes non polarisées pour comparer les valeurs d'abattement de DCO. Elles sont présentées dans le **Tableau 10**. On constate, comme précédemment (Cf paragraphe V.1.1.5) que les abattements de DCO ont le même ordre de grandeur pour les expériences avec et sans polarisation. Nous avons alors relevé le faible rapport surface d'électrode/volume de solution pour ces expériences (10 cm² pour 500 mL) qui pouvait expliquer l'effet non déterminant des biofilms EA sur les performances du traitement de l'effluent.

Des voltammétries ont été réalisées à 1 mV/s au jour 12 pour les deux expériences de la *Figure 73* et sont présentées sur la *Figure 74*. Les deux biofilms donnent des courbes ayant la même allure. Les densités de courants observées à -0,3 V sont en accord avec les valeurs des CAs au jour 12 (entre 2 et 2,5 A/m²). Les deux biofilms EA formés en parallèle semblent donc similaires.

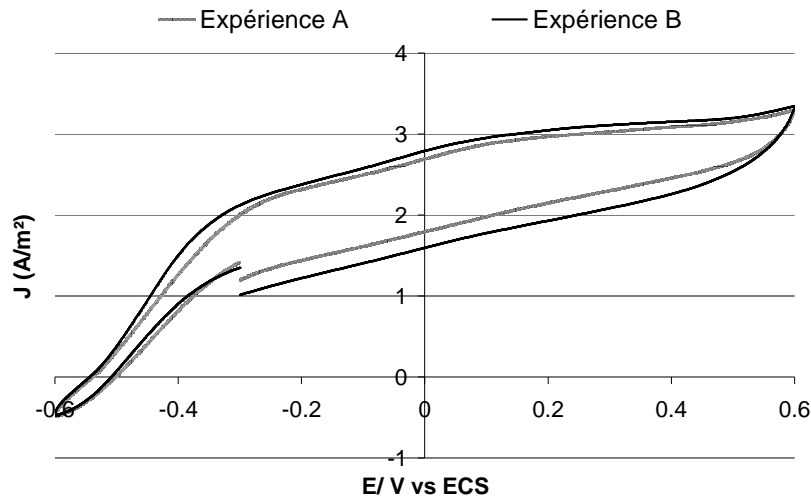


Figure 74: Voltammétries cycliques (1mV/s) réalisées au jour 12 pour les 2 expériences de la *Figure 73*.

V.1.1.7. Effet de la concentration de l'effluent

Les expériences présentées dans cette section sont destinées à définir les valeurs optimales de la DCO d'un effluent pour une activité maximale d'un biofilm EA. Les expériences A et B présentées sur la *Figure 75* ont été réalisées. Les électrodes issues des expériences présentées sur la *Figure 63* ($J_{\max}=4,5$ A/m², 65 jours) pour l'expérience A et sur la *Figure 73* ($J_{\max}=4$ A/m², 40 jours) pour l'expérience B ont été utilisées comme bioanodes. Ces électrodes ont simplement été transférées dans de nouveaux réacteurs puis placés en alimentation continue avec l'effluent sortie méthaniseur brut à un TRH maintenu à 24 h. La DCO de l'effluent varie entre 500 et 5000 mg/L soit un flux entre 0,3 et 2,5 g/jour pour l'expérience A, alors qu'elle se situe entre 540 et 4000 mg/L soit un flux entre 0,3 et 1,8 g/j pour l'expérience B. Chaque valeur de concentration est maintenue pendant une ou deux semaines.

Les électrodes étant déjà colonisées par des biofilms matures, les densités de courant commencent à augmenter immédiatement après le début de l'alimentation continue pour s'établir entre 2 et 3,5 A/m² après une semaine d'expérience (*Figure 75*).

On observe sur les CAs une chute brutale des densités de courant lorsque la DCO passe en-dessous de 800 mg/L ou au-dessus de 5000 mg/L pour l'expérience A. Ces limites sont de 650 mg/L et 4000 mg/L pour l'expérience B. Les densités de courant maximales entre 2 et 3,8 A/m² sont obtenues pour une DCO de l'effluent entre 1300 et 2800 mg/L pour

l'expérience A et entre 1000 to 2000 mg/L pour l'expérience B. Parallèlement, une expérience dans laquelle les électrodes sont introduites mais pas colonisées est réalisée dans les mêmes conditions expérimentales pour servir de témoin.

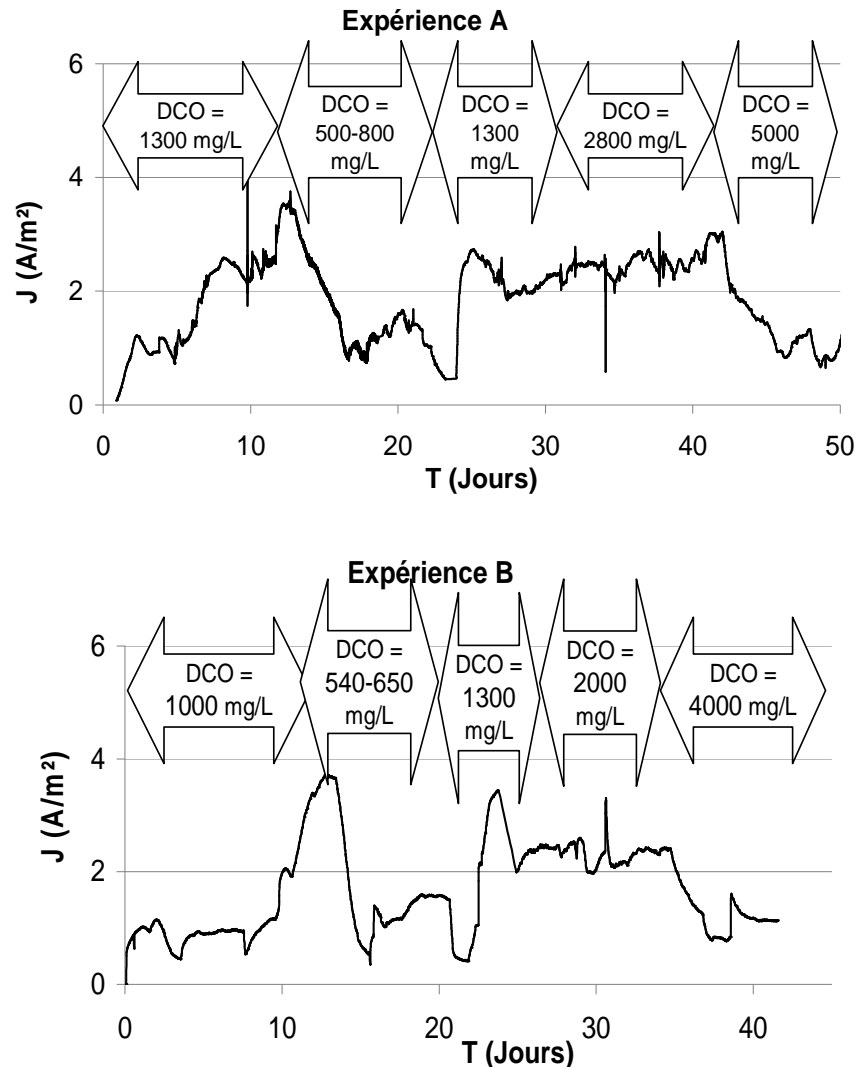


Figure 75: Densités de courant en fonction du temps pour deux biofilms EA en fonction de la concentration de l'effluent. Les électrodes sont des plaques de graphite de 10 cm² polarisées à -0,3 V. Les réacteurs sont laissés sous barbotage de N₂ en continu et alimentés avec l'effluent sortie méthaniseur au TRH de 24 h

Les performances des deux biofilms EA pour les différentes valeurs de DCO sont présentées **Tableau 11**.

Les valeurs de rendements faradiques et abattements de DCO sont les moyennes calculées sur au moins 5 mesures. Les rendements faradiques varient entre 2 et 16%, alors que les abattements de DCO varient entre 24 et 55%. Les performances diminuent avec l'augmentation de la DCO en entrée et donc de la DCO résiduelle. Ceci pourrait être expliqué par une limitation cinétique de la dégradation de la matière organique. Le TRH de 24h choisi

pour ces expériences ne semble pas avoir été suffisant aux micro-organismes pour dégrader une proportion importante des substrats complexes difficilement dégradables présents dans l'effluent.

| Expérience A | | | | | |
|--------------------------|-------|----------|-------|--------|-------|
| Flux de DCO (g/j) | 0,7 | 0,3 | 0,7 | 1,4 | 2,5 |
| DCO entrée (mg/L) | 1300 | 500-800 | 1300 | 2800 | 5200 |
| DCO résiduelle (mg/L) | 800 | 300 -500 | 800 | 1300 | 3900 |
| Jmax (A/m ²) | 3,5 | 1,6 | 2,6 | 2,6 | 0,9 |
| Abattement de DCO (%) | 34± 7 | 36 ± 10 | 55± 5 | 36 ± 2 | 24± 2 |
| Rf (± 1%) | 16 | 11 | 14 | 4 | 2 |

| Expérience B | | | | | | | | | | |
|--------------------------|----------|----|------------|----|----------|----|-----------|----|----------|----|
| Flux de DCO (g/j) | 0,4 | | 0,3 | | 0,8 | | 0,7 | | 1,8 | |
| DCO entrée (mg/L) | 1000 | | 450-650 | | 1300 | | 2000 | | 4000 | |
| DCO résiduelle (mg/L) | 650 | | 300 | | 500 | | 1300 | | 2200 | |
| Jmax (A/m ²) | 3,8 | | 1,6 | | 3,5 | | 2,6 | | 0,8 | |
| Abattement de DCO (%) | 27± 7 | 25 | 41 ± 10 | 18 | 54± 5 | 52 | 37 ± 2 | 31 | 45± 2 | 38 |
| Rf (± 1%) | 19 | | 11 | | 14 | | 6 | | 2 | |

Tableau 11: Rendements faradiques (Rf) et abattements de DCO produits par les biofilms présentés sur la **Figure 75**. Les valeurs en rouge représentent les abattements de DCO de l'expérience témoin.

De très faibles rendements faradiques sont observés aux valeurs élevées de DCO en entrée (4% à 2800 mg/L et 2% à 5200 mg/L pour l'expérience A ; 6% à 2000 mg/L et 2% à 4000 mg/L pour l'expérience B). Ce phénomène a déjà été décrit dans la bibliographie (Min *et al.* 2005b; Liu *et al.* 2005a) et les hypothèses avancées par les différents auteurs restent très souvent les mêmes. Rabaey *et al.* (2005) a supposé qu'à des flux de DCO élevés, la méthanogénèse comptait pour la majorité de la matière organique dégradée. Nous n'avons pas effectué de mesures de méthane à la sortie des réacteurs pour valider cette hypothèse. Il est aussi possible qu'une DCO élevée cause une inhibition par l'excès de substrat des bactéries EA (Rabaey *et al.* 2005). Di Lorenzo *et al.* (2010) expliquent que cette saturation du milieu par le substrat à des flux de DCO élevés induirait une compétition entre les bactéries EA et planctoniques dans la consommation du substrat (Di Lorenzo *et al.* 2010). L'expérience

témoin réalisée en parallèle à l'expérience B présente des valeurs d'abattements de DCO de même ordre que celles en présence du biofilm EA, ce qui conforte cette hypothèse.

On pourrait aussi avancer tout simplement comme Min *et al.* (2005) que plus la concentration du substrat est élevée, plus le temps nécessaire pour sa dégradation complète est long (Min *et al.* 2005b). Comme évoqué plus haut, dans les expériences présentées ici, le TRH de 24 h choisi était peut-être insuffisant pour que les bactéries EA aient pu transférer de manière optimale les électrons issus de la dégradation de l'effluent.

Ces expériences confirment la limitation de la densité de courant par une DCO résiduelle de l'effluent trop faible déjà mise en évidence lors de l'expérience sur l'effet du TRH à flux de DCO constant (Cf paragraphe V.1.1.6.). Elles apportent comme information complémentaire qu'une DCO élevée en entrée et par conséquent une DCO résiduelle trop importante fait chuter les performances des biofilms EA par inhibition par le substrat.

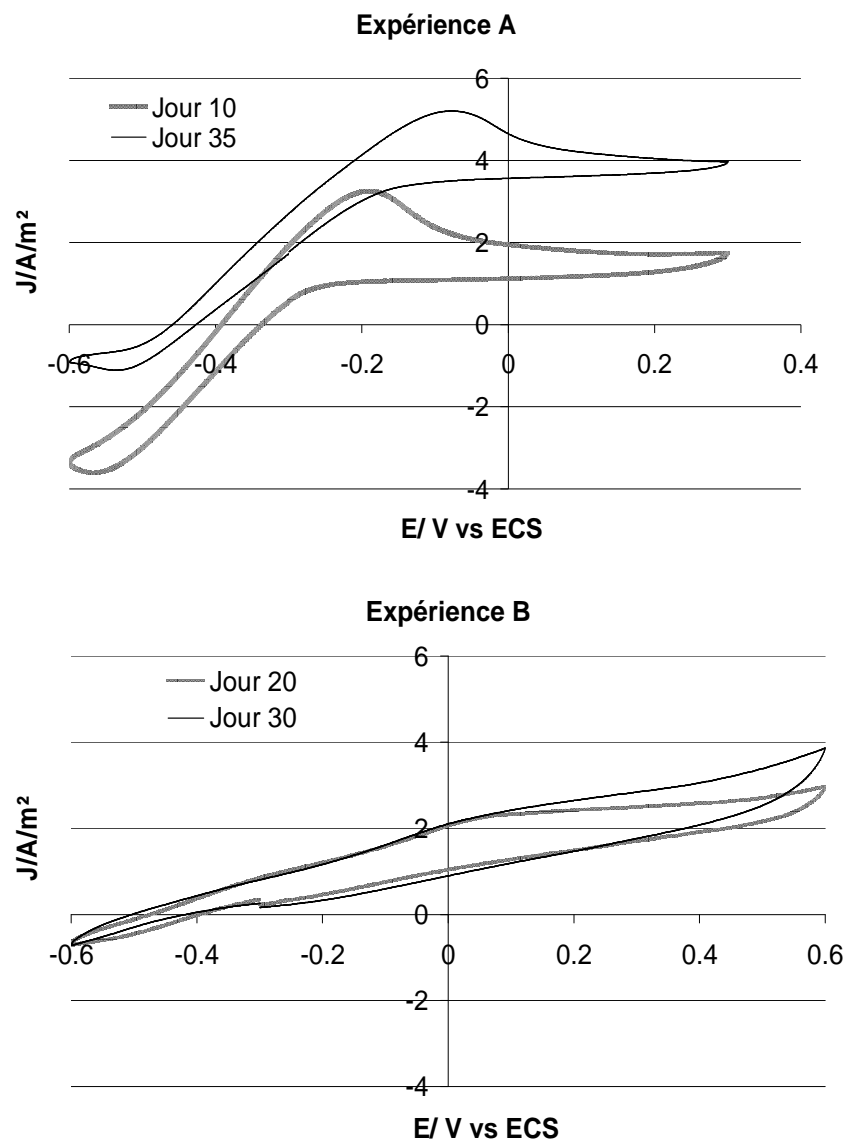


Figure 76: Voltammétries cycliques réalisées à différents jours lors de la formation des biofilms de la Figure 75. Elles sont réalisées à 1 mV/s entre -0,6 V et 0,6 V.

Les CAs ont été interrompues à différents temps pour réaliser des voltammétries et suivre ainsi l'évolution des performances des biofilms EA au cours du temps (**Figure 76**).

Ces voltammétries réalisées à différents stades de formation du biofilm EA ont la même allure pour un biofilm donné. Les voltammétries de l'expérience B réalisées à dix jours d'intervalle sont superposables alors qu'on observe une amélioration des performances du biofilm EA de l'expérience A du jour 10 au jour 35. L'amélioration des performances de ce biofilm prouve sa robustesse car il reste efficace malgré près de 110 jours de fonctionnement.

L'expérience A présente, sur la voltammétrie du jour 10, un courant de réduction élevé (-3,6 A/m²) moins prononcé sur celle du jour 35 (-1,1 A/m²). Ceci pourrait être expliqué par un changement de la composition de l'effluent au jour 35. En effet, au jour 35, les effluents en entrée et en sortie du méthaniseur sont mélangés en vue d'obtenir une DCO plus élevée en entrée de réacteur (2800 mg/L). Ceci aurait pu réduire la proportion d'un constituant que l'on suppose présent dans l'effluent sortie méthaniseur qui pourrait être responsable de ce courant de réduction.

V.1.2. Caractérisations microbiologiques (DGGE)

L'identification des populations microbiennes a été réalisée par le LEMiRE sur les biofilms présentés sur les **Figure 66**, **Figure 70-B**, **Figure 73**, et **Figure 75-A**.

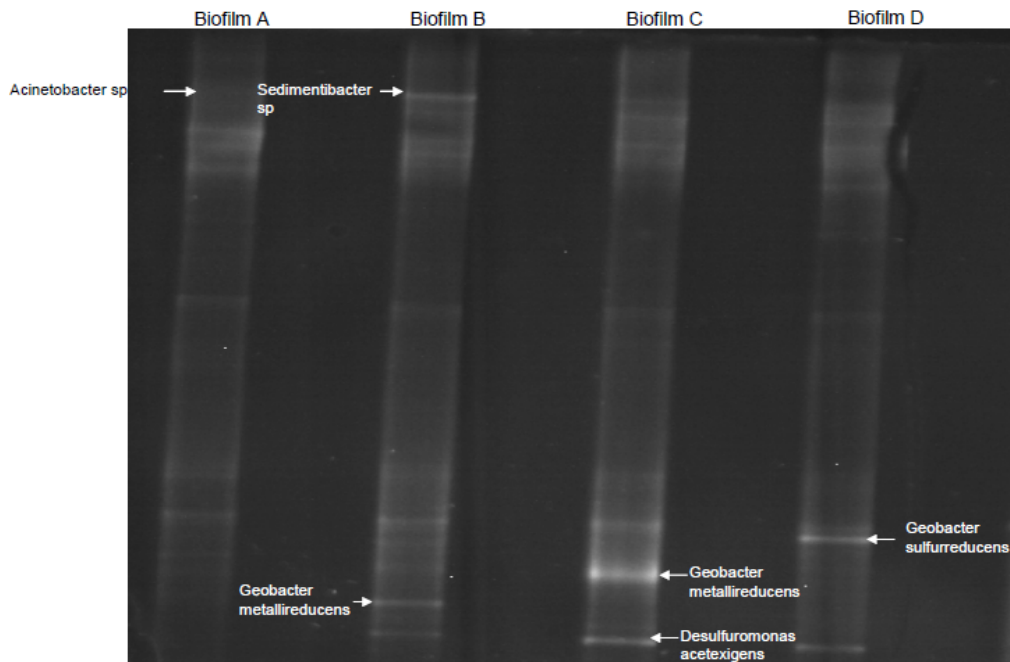


Figure 77: Profils DGGE des biofilms EA formés en alimentation continue avec l'effluent brut. Biofilm A = biofilm de la **Figure 73**, Biofilm B = biofilm de la **Figure 75-A**, Biofilm C = biofilm de la **Figure 70-B**, Biofilm D = biofilm de la **Figure 66**. Expérience réalisée par le LEMIRE.

Parmi les différentes bandes observées sur les profils DGGE, seules les séquences de quatre espèces ont pu être formellement identifiées à raison d'une ou deux espèces par

électrode, il s'agit de *Geobacter metallireducens*, *Geobacter sulfurreducens*, *Sedimentibacter* sp. et *Desulfomonas acetexigens*. Ces espèces avaient déjà été identifiées lors des expériences réalisées en batch avec ajout d'acétate. On peut donc penser qu'elles sont caractéristiques de l'effluent et que leur présence n'est pas fonction de l'ajout ou non d'acétate. Il faut encore noter que la présence d'acétate (environ 200 mg/L) dans l'effluent brut renforce cette hypothèse. Nous avons toutefois constaté que les biofilms formés avec ajout d'acétate ne sont pas capables de s'adapter ensuite à l'utilisation de l'effluent brut (**Figure 62**). L'explication de ce manque d'adaptabilité ne réside donc pas dans le développement de populations microbiennes significativement différentes suivant que l'on ajoute ou pas de l'acétate. Il faut donc plutôt penser que les mêmes populations réagissent différemment en fonction de la nature du substrat. Pour les besoins d'optimisation de l'activité des biofilms EA en conditions industrielles, il faudra donc se tourner vers d'autres paramètres que la seule composition microbienne des biofilms.

V.1.3. Effluent entrée biologique

Avec l'effluent «entrée biologique» qui avait également été retenu pour les expériences d'optimisation, nous avons réalisé le même type d'expériences qu'avec l'effluent sortie méthaniseur, pour évaluer son aptitude à former des biofilms EA. Deux d'entre elles sont présentées ci-dessous.

V.1.3.1. Formation d'un biofilm EA avec l'effluent brut

Un réacteur de 500 mL a été laissé en batch pendant 10 jours puis alimenté en continu pendant 30 jours avec un TRH de 24h.

Un faible courant est observé à partir du jour 5, puis le courant augmente rapidement après la mise en route de l'alimentation continue au jour 10 pour se stabiliser entre 5 et 6 A/m² (**Figure 78**). Durant le mois d'expérience, les performances moyennes ont varié entre 15 et 20% pour le rendement faradique, et 22 à 37% pour l'abattement de DCO. Les chutes de courant autour des jours 16 et 20 sont les conséquences d'arrêts d'alimentation dus à l'encrassement des tuyaux.

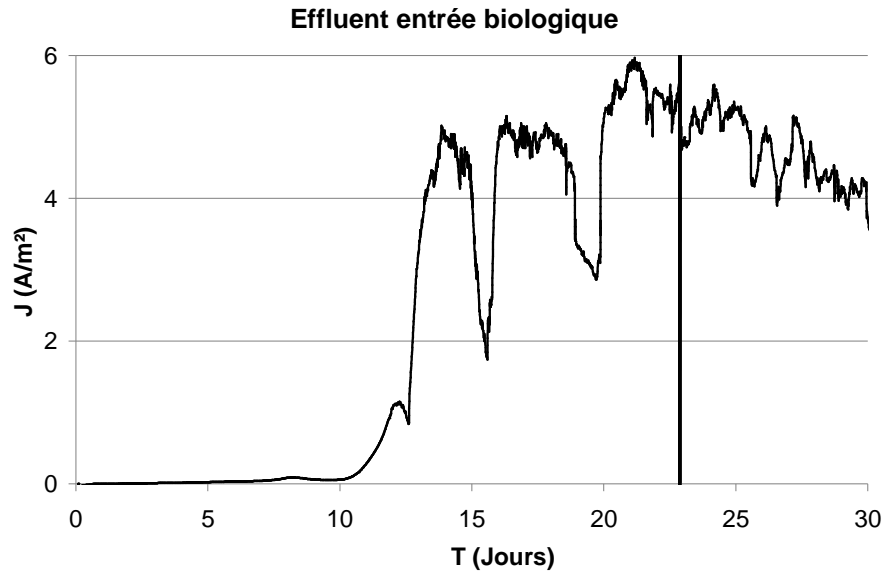


Figure 78: Formation d'un biofilm EA avec l'effluent entrée biologique en alimentation. L'électrode de graphite est polarisée à $-0,2V$.

L'effluent entrée biologique conduit à une densité de courant constante et stable entre 4 et 6 A/m^2 pendant les 30 jours d'expérience. Cette observation pourrait être expliquée par la valeur de la DCO résiduelle dans le réacteur qui est supérieure à 600 mg/L tout au long de l'expérience (**Tableau 12**). Ce résultat est cohérent avec l'observation faite avec l'effluent sortie méthaniseur selon laquelle le courant commençait à chuter pour des concentrations organiques résiduelles seulement inférieures à 400 mg/L . Au-dessus de cette valeur, le courant restait stable.

| Valeur moyenne | Semaine 1 | Semaine 2 | Semaine 3 | Semaine 4 |
|------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| DCO entrée (mg/L) | 839 | 996 | 1136 | 1164 |
| DCO résiduelle (mg/L) | 771 | 622 | 716 | 908 |
| Abattement DCO ($\pm 6\%$) | 22 | 37 | 36 | 22 |
| R_f ($\pm 1\%$) | 0.4 | 12 | 20 | 19 |

Tableau 12: Rendements faradiques (R_f) et abattements de DCO produits par les biofilms présentés sur la **Figure 78**.

V.1.3.2. Effet du flux de DCO sur les performances du biofilm EA

L'effet du flux de DCO apporté au réacteur est présenté sur la **Figure 79**. Cette expérience confirme que la densité de courant n'est pas liée au flux de matière organique

apporté au réacteur mais plutôt à la DCO résiduelle présente dans le réacteur, comme observé avec l'effluent sortie méthaniseur. En effet, d'après le **Tableau 13**, pour un même flux de DCO de 200 mg/L les valeurs de J_{max} sont très différentes en fonction de la DCO résiduelle dans le réacteur. Pour une DCO résiduelle de 355 mg/L, la densité de courant est de 0,15 A/m² alors que pour une valeur de 600 mg/L, la densité augmente à 2,5 A/m². Cette expérience confirme qu'une DCO résiduelle inférieure à 400 mg/L est préjudiciable aux performances des biofilms EA quelque soit l'effluent.

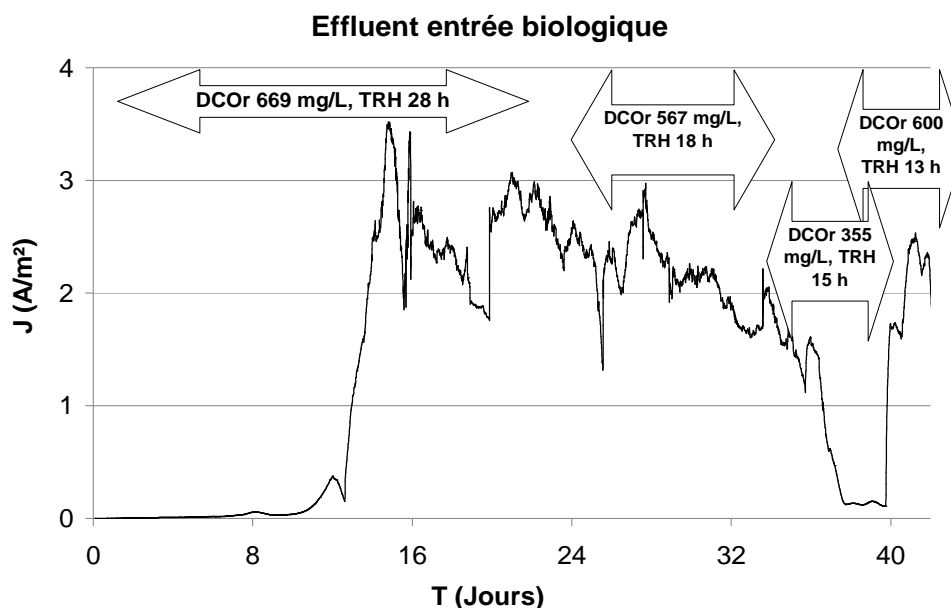


Figure 79: Effet du TRH à flux de DCO variable sur les performances d'un biofilm EA formé avec l'effluent entrée biologique.

| Valeur moyenne | TRH=28 h; 20 jours | TRH=18h; 10 jours | TRH=15h 6 jours | TRH=13 h, 4 jours |
|------------------------------|-----------------------|----------------------|--------------------|----------------------|
| J_{max} | 3.5 | 2.5 | 0.15 | 2.5 |
| DCO entrée (mg/L) | 1038 | 830 | 620 | 800 |
| Flux DCO (g/j) | 0.6 | 0.3 | 0.2 | 0.2 |
| DCO résiduelle (mg/L) | 669 | 567 | 355 | 600 |
| Abattement DCO ($\pm 6\%$) | 30 | 31 | 43 | 20 |
| Rf ($\pm 1\%$) | 16 | 13 | 6 | 4 |

Tableau 13: Performances du biofilm EA présenté sur la **Figure 79**.

Les performances obtenues avec l'effluent entrée biologique évoluent de la même façon que celles enregistrées avec l'effluent sortie méthaniseur (Cf *Tableau 8*). En effet, lorsque le flux de DCO apporté au réacteur diminue, le taux d'abattement de DCO augmente alors que le rendement faradique diminue.

V.2. Alimentation en batch séquentielle

Nous avons eu recours à ce mode d'alimentation afin de résoudre les difficultés rencontrées pour maintenir un débit d'alimentation constant lors des essais en alimentation continue à cause de l'encrassement des tuyaux. L'alimentation batch séquentielle consiste à remplacer manuellement et régulièrement une partie de l'effluent présent dans les réacteurs en fonction du TRH souhaité. Elle permet de mieux maîtriser les temps de séjour, mais entraîne des pics de concentration lors des remplacements d'effluent. L'effet de quelques paramètres jugés importants lors des essais précédents en alimentations batch avec acétate et en continu avec l'effluent brut ont été à nouveau examinés avec ce mode d'alimentation à partir de l'effluent sortie méthaniseur brut.

V.2.1. Polarisation retardée des électrodes - effet du barbotage de N₂

La polarisation retardée des électrodes déjà examinée en alimentation batch avec acétate avait permis d'obtenir un démarrage plus rapide de l'activité des biofilms. Il avait aussi été mis en évidence qu'il était préférable que les conditions anaérobies (par barbotage continu de N₂) ne soient initiées dans les réacteurs qu'après la polarisation (*Figure 60*).

Cette expérience a été refaite avec l'effluent brut en alimentation batch séquentielle. Deux essais ont été réalisés en parallèle avec des réacteurs contenant 500 mL d'effluent sortie méthaniseur laissés en batch et sans polarisation pendant 15 jours, l'un sous barbotage continu de N₂ et l'autre sans aucun barbotage. Ensuite, les réacteurs ont été laissés en batch mais les électrodes polarisées à -0,3 V pendant 5 jours puis, mis en alimentation batch séquentielle avec l'effluent brut. Ayant montré précédemment que les meilleures performances de biofilms EA étaient obtenues pour des TRH élevés, nous avons choisi pour cette expérience un TRH de 96 h (250 mL/500 mL d'effluent sont remplacés toutes les 48 h).

V.2.1.1. Biofilm formé sous barbotage continu de N₂ dès le début

On observe sur la *Figure 80* à partir du jour 5 des pics de densités de courant correspondants aux renouvellements d'effluent dans les réacteurs. La densité de courant maximale augmente progressivement pour se stabiliser entre 3 et 3,5 A/m² à partir du jour 19 tandis qu'un courant de base s'établit à 2 A/m².

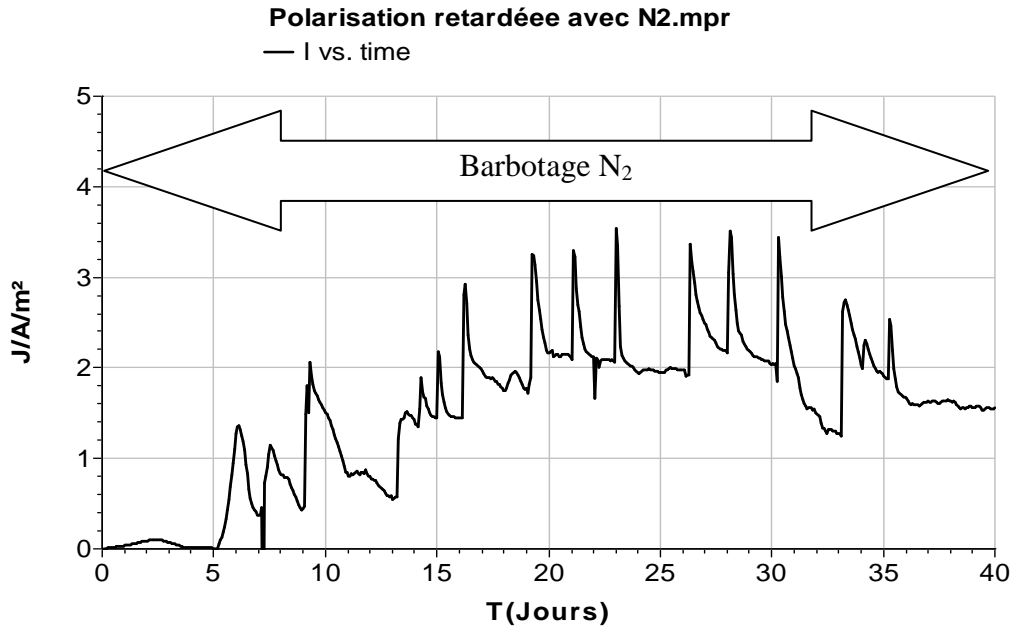


Figure 80: Biofilm primaire formé sous polarisation retardée de 14 jours et sous barbotage continu de N₂. Electrode de graphite polarisée à -0,3V.

L'évolution des paramètres: pH, abattement de la DCO et rendement faradique est résumée dans le **Tableau 14**.

| Valeur moyenne | Semaine 2 | Semaine 3 | Semaine 4 | Semaine 5 |
|-----------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| pH | 8,6 | 8,9 | 9,2 | 9,3 |
| DCO entrée (mg/L) | 1760 | 1660 | 1583 | 1645 |
| DCO résiduelle (mg/L) | 868 | 1015 | 1039 | 1099 |
| Abattement DCO (± 6%) | 19 | 24 | 20 | 15 |
| Rf % (± 1%) | 16 | 13 | 14 | 24 |

Tableau 14: Evolution du pH, rendement faradique et abattement de DCO au cours du temps pour l'expérience de la **Figure 80**.

Le suivi de ces paramètres met en évidence des rendements faradiques relativement faibles entre 13 et 24% qui augmentent avec la DCO résiduelle de l'effluent. Le réacteur étant sous barbotage continu de N₂, le pH reste élevé entre 8,6 et 9,3. Les valeurs d'abattement de DCO restent faibles entre 15 et 24%, malgré le TRH élevé choisi pour cette expérience.

On observe pour cette expérience l'apparition des pics de courant aussitôt les 250 mL d'effluent rajoutés dans le réacteur. Ces pics de courant évoluent ensuite progressivement vers

un palier. Ils pourraient correspondre à l'oxydation des matières organiques facilement biodégradables, par exemple les acides organiques, présents dans l'effluent (Cf paragraphe V.1.1.1.) alors que le courant de base pourrait correspondre à l'oxydation des composés plus lentement métabolisés par le biofilm.

Des voltammétries à 1 mV/s réalisées sur l'électrode au début de la polarisation (jour 5), et en fin d'expérience (lorsque le courant est retombé à zéro) sont présentées sur la **Figure 81**. La voltammétrie au jour 5 (courbe en noir) correspond au biofilm formé sans polarisation depuis 15 jours. La présence du biofilm sur l'électrode est mise en évidence par le léger pic d'oxydation observé autour de 0,05 V avec une densité de courant faible de 0,2 A/m². La voltammétrie réalisée à la fin de l'expérience (courbe en gris) révèle un couple redox centré autour de -0,4 V avec un pic d'oxydation d'une valeur de 0,6 A/m². Ce pic pourrait correspondre à une nouvelle protéine dans le biofilm mature qui n'était pas présente dans le biofilm sans polarisation. On observe pour les deux voltammétries de faibles vagues de réduction. La différence de ces deux voltammétries montre l'effet important de la polarisation sur les caractéristiques des biofilms.

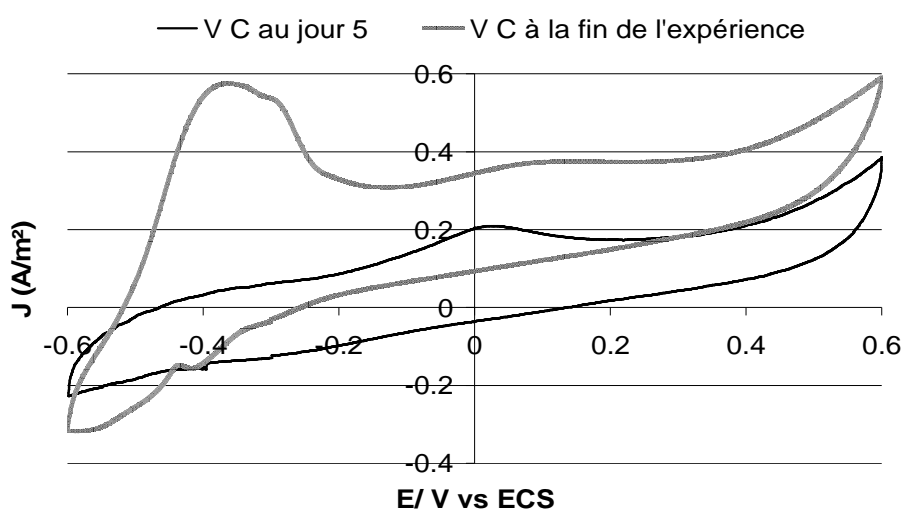


Figure 81: Voltammétries cycliques effectuées au début et à la fin de l'expérience d'alimentation Fed-batch lors de la CA **Figure 80** à 1 mV/s à partir de -0,3 V/ECS et entre -0,6 V et 0,3 V.

V.2.1.2. Biofilm formé sans barbotage continu de N₂ dès le début

Le biofilm formé pendant les 14 premiers jours sans polarisation et sans barbotage d'azote réagit rapidement et plus intensément que le précédent lorsque l'électrode est polarisée. En effet, le premier pic atteint 0,7 A/m² alors qu'il n'était que de 0,1 A/m² pour le biofilm précédent. Pendant les 19 premiers jours de polarisation pendant lesquels le réacteur est resté sans barbotage de N₂, les densités de courant sont inférieures à celles obtenues avec le biofilm formé sous N₂. La densité de courant maximale atteinte est de 1,8 A/m² avec un

courant de base qui s'établit à 1 A/m^2 . A partir du jour 19, le réacteur est placé sous barbotage continu de N_2 . Ceci entraîne une augmentation de la densité de courant maximum entre 2,5 et 3 A/m^2 et un courant de base à $1,5 \text{ A/m}^2$ proches de ceux de l'expérience sous N_2 depuis le départ.

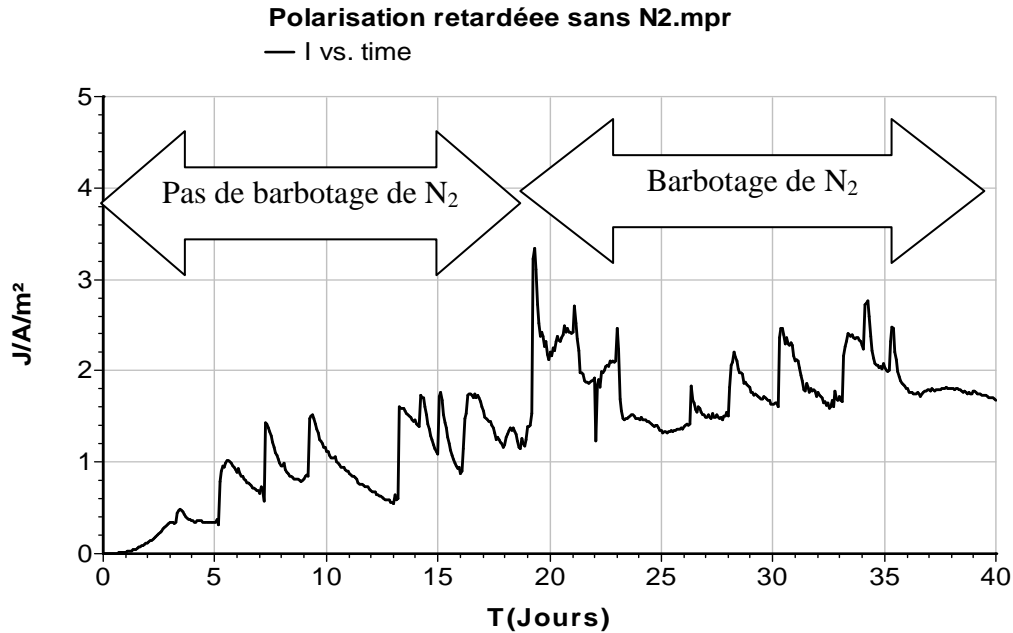


Figure 82: Biofilm primaire formé sous polarisation retardée de 14 jours. Les barbotages ou non de N_2 sont indiqués sur le graphe. Electrode de graphite polarisée à $-0,3\text{V}$.

L'évolution des paramètres pH, abattement de la DCO et rendement faradique est résumée dans le **Tableau 15**.

| Valeur moyenne | Semaine 2 | Semaine 3 | Semaine 4(N_2) | Semaine 5(N_2) |
|------------------------------|-----------|-----------|---------------------------|---------------------------|
| pH | 7,6 | 7,4 | 8,3 | 8,9 |
| DCO entrée (mg/L) | 1766 | 1660 | 1720 | 1564 |
| DCO résiduelle (mg/L) | 852 | 952 | 915 | 1163 |
| Abattement DCO ($\pm 6\%$) | 38 | 26 | 36 | 28 |
| Rf % ($\pm 1\%$) | 7 | 6 | 8 | 8 |

Tableau 15: Evolution des caractéristiques pH, rendement faradique et abattement de DCO au cours du temps du biofilm de la **Figure 82**.

On observe que le pH augmente rapidement de 7,6 à 8,9 lorsque le barbotage de N_2 est mis en route. Malgré l'augmentation de la densité de courant, le taux d'abattement de la

DCO et le rendement faradique restent stables lorsque le barbotage de N_2 est mis en place. Ce comportement est différent de celui qui avait été observé lors des expériences en alimentation batch avec ajout d'acétate dans l'effluent. En effet, sous polarisation retardée, les performances du biofilm (J , R_f) étaient améliorées par les conditions anaérobies. L'apport quotidien d'un nouvel effluent dans le réacteur pourrait expliquer cette différence de comportement.

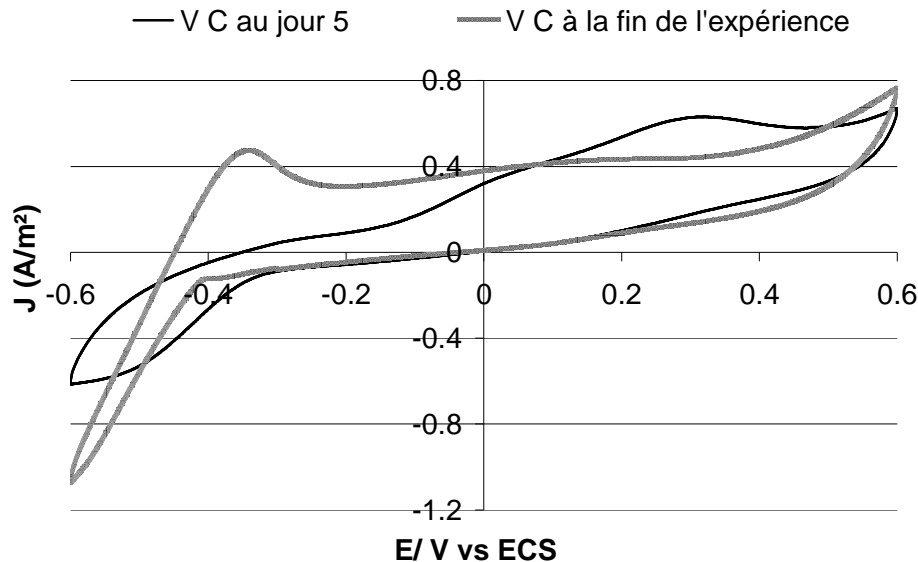


Figure 83: Voltammétries cycliques effectuées au début et à la fin de l'expérience d'alimentation batch séquentielle lors de la CA **Figure 82** à 1 mV/s à partir de $-0,3 \text{ V/Ref}$ et entre $-0,6 \text{ V}$ et $0,3 \text{ V}$.

La voltammétrie réalisée au jour 5 au début de la polarisation présente des vagues d'oxydo-réduction qui prouvent l'existence d'un biofilm sur cette électrode. A la fin de l'expérience, lorsque le courant est retombé à zéro la voltammétrie montre une évolution du biofilm. En effet, le pic d'oxydation est déplacé vers des valeurs plus négatives plus précisément de $0,3 \text{ V}$ à $-0,3 \text{ V}$, le potentiel à circuit ouvert passe de $-0,35$ à $-0,45 \text{ V}$ et la vague de réduction est plus prononcée.

Ces expériences sur l'effet de la polarisation retardée avec ou sans barbotage d'azote indiquent qu'il n'est pas nécessaire de polariser une électrode dans des conditions anaérobies pour favoriser la formation de biofilms EA. En effet, des biofilms EA efficaces ont été obtenus après incubation sans polarisation initiale, avec des démarrages rapides (temps de latence de moins d'un jour) lorsque les électrodes sont polarisées. Lorsque ce mode opératoire est choisi, il est préférable d'établir les conditions anaérobies du réacteur (barbotage de N_2) après que le biofilm ait été formé. L'amélioration des performances du biofilm EA dans ces conditions a été mise en évidence de façon plus distincte en alimentation batch avec acétate.

V.2.2. Contrôle du pH par barbotages de N₂ ou CO₂

Lors des expériences en alimentation batch avec ajout d'acétate ou en continu sans acétate, nous avons démontré que des conditions anaérobies favorisent les performances d'un biofilm EA. Néanmoins, pour ces expériences, le pH dans les réacteurs se stabilise à des valeurs supérieures à 9,0 par l'extraction du CO₂ du milieu. Les expériences présentées dans cette section ont pour but de vérifier si les conditions anaérobies favorisent également les performances dans des conditions de pH neutres. Pour cela, deux réacteurs de 500 mL ont été inoculés avec l'effluent sortie méthaniseur et démarrés en parallèle sous un barbotage continu de N₂, avec les électrodes polarisées à -0,3 V dès le début de l'expérience. L'un des réacteurs est laissé sous barbotage continu de N₂ et le second réacteur soumis à différentes conditions de barbotage avec les gaz N₂ et CO₂. Lors de ces expériences, les évolutions du pH, de la DCO, de la DBO₅, du calcium, du carbone organique total (COT), du carbone inorganique (CI) et des acides gras volatils (AGV) ont été suivies pendant deux semaines. Un réacteur témoin non polarisé préparé et alimenté exactement dans les mêmes conditions a été suivi pour comparaison. Le TRH pour ces expériences a été maintenu à 96 h.

V.2.2.1. Contrôle du pH par barbotage continu de N₂

La densité de courant reste faible tout au long de l'expérience avec un maximum de 2 A/m² malgré une DCO résiduelle autour de 1000 mg/L (*Figure 84*).

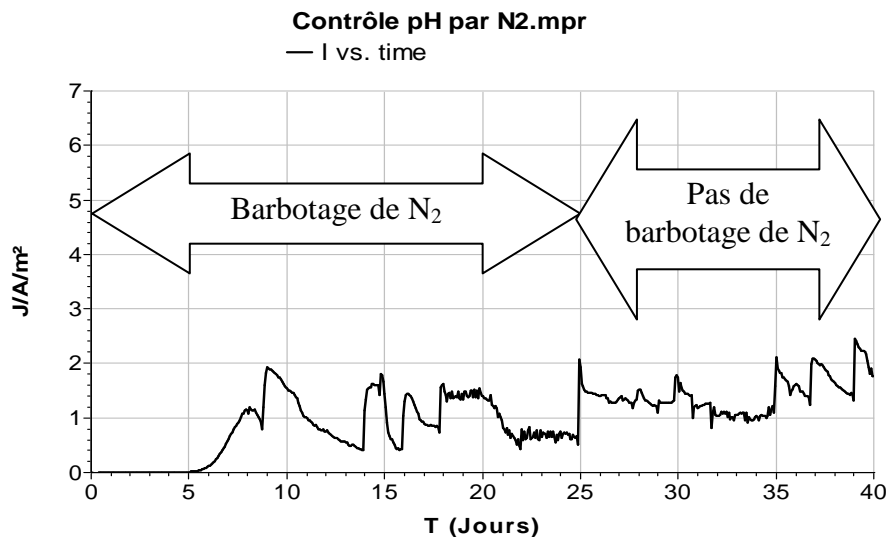


Figure 84: Biofilm formé avec l'effluent sortie méthaniseur en alimentation fed batch. L'électrode de graphite est polarisée à -0,3V.

Les abattements de DCO et rendements faradiques sont présentés dans le *Tableau 16*.

| Valeur moyenne | Semaine 2 (avec N ₂) | Semaine 3 (avec N ₂) | Semaine 4 (sans N ₂) | Semaine 5 (sans N ₂) |
|------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| pH | 8,4 | 8,9 | 7,9 | 7,2 |
| DCO entrée (mg/L) | 1766 | 1653 | 1743 | 1713 |
| DCO résiduelle (mg/L) | 957 | 1081 | 1098 | 929 |
| Abattement DCO ($\pm 6\%$) | 23 | 11 | 30 | 32 |
| Rf ($\pm 1\%$) | 8 | 19 | 11 | 13 |

Tableau 16: Moyennes hebdomadaires des différents paramètres pH, rendement faradique et abattement de DCO lors de l'expérience CA de la **Figure 84**.

Sous les conditions anaérobies maintenues pendant les trois premières semaines, les valeurs moyennes hebdomadaires d'abattement de la DCO se situent entre 11 et 23% et du rendement faradique entre 8 et 19%. Lorsque le barbotage de N₂ et donc les conditions anaérobies sont supprimées, on observe une augmentation de l'abattement de DCO à 32%, qui s'explique par la contribution des bactéries aérobies à la dégradation de la DCO. Le rendement faradique diminue alors autour de 12% puisque les bactéries aérobies sont en compétition avec les bactéries EA. Le pH diminue rapidement de 8,9 à 7,2 à cause de l'accumulation du CO₂ qui n'est plus éliminé par le barbotage d'azote.

Ces résultats montrent que les conditions anaérobies liées au barbotage d'azote sont favorables au rendement faradique, en raison de l'absence d'O₂ comme accepteur alternatif d'électrons.

V.2.2.2. Contrôle du pH par barbotages de CO₂ et N₂

Cette expérience a été réalisée en vue d'évaluer l'effet du pH sur les performances des biofilms EA dans des conditions anaérobies et de tenter d'éviter l'entartrage important des contre-électrodes (grilles de Pt/Ir) constaté lors des expériences en alimentation continue ou fed batch avec l'effluent brut sous N₂. Le barbotage de CO₂ dans les réacteurs permettrait de maintenir un pH neutre ou légèrement acide et donc de retarder ou d'éviter l'entartrage. Le contrôle du pH dans les différents réacteurs est réalisé par des barbotages de N₂ et/ou CO₂ sous différentes conditions :

- ❖ Pendant les 20 premiers jours, le barbotage de CO₂ est réalisé 15 minutes par jour dans le réacteur ;
- ❖ Du jour 20 au jour 30, un barbotage de N₂ est maintenu en continu entre les différents barbotages de CO₂ de 15 minutes par jour ;
- ❖ A partir du jour 30, le barbotage de CO₂ est maintenu en continu.

La chronoampérométrie obtenue est présentée **Figure 85**. La densité de courant varie en fonction des conditions de barbotage des gaz. Durant les 20 premiers jours, les barbotages ponctuels de CO_2 permettent de stabiliser le pH autour de 7, la densité de courant moyenne est de 3 A/m^2 . Durant les 10 jours suivants pendant lesquels le réacteur est sous barbotages ponctuel de CO_2 et de N_2 en continu, le pH moyen est de 9,14 et la densité de courant moyenne de 5 A/m^2 . A partir du jour 30, lorsque le réacteur est maintenu sous barbotage continu de CO_2 , la densité de courant redescend à $3,5 \text{ A/m}^2$ sous l'effet du pH qui s'acidifie à 6,4. La plus forte densité de courant est donc obtenue pour un pH basique (≈ 9).

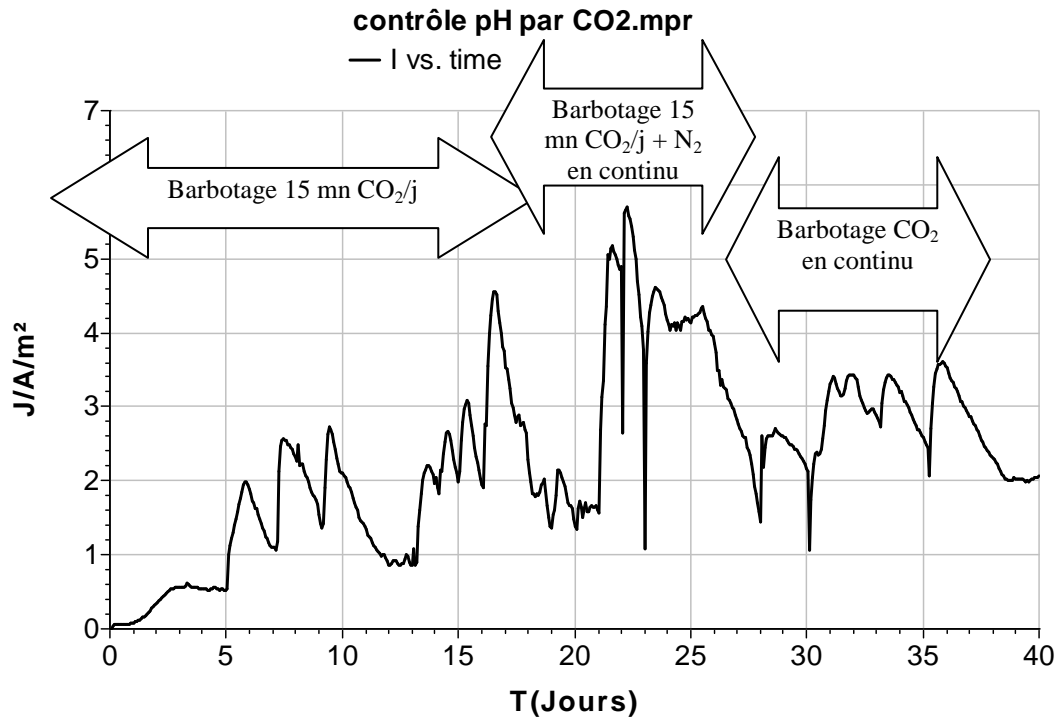


Figure 85: Effet du contrôle du pH par différentes conditions de barbotage de CO_2 sur la densité de courant. L'électrode de graphite est polarisée à $-0,3\text{V}$.

Les performances du biofilm EA en fonction des différentes conditions de barbotage des gaz sont résumées dans le **Tableau 17**.

| Valeur moyenne | Semaine 2 (CO ₂ 15 min/J) | Semaine 3 (CO ₂ 15 min/J) | Semaine 4 (CO ₂ 15 min/J + N ₂ continu) | Semaine 5 (CO ₂ continu) |
|-----------------------|---|---|---|--|
| pH | 7 | 6,8 | 9,14 | 6,4 |
| DCO entrée (mg/L) | 1766 | 1655 | 1572 | 1645 |
| DCO résiduelle (mg/L) | 768 | 791 | 1229 | 1157 |
| Abattement DCO (± 6%) | 43 | 22 | 40 | 8 |
| Rf% (±1%) | 12 | 18 | 14 | 42 |

Tableau 17: Evolution des paramètres pH, rendement faradique et abattement de DCO lors de l'expérience CA de la **Figure 85**.

Les rendements faradiques ne sont pas significativement différents pour les barbotages ponctuels de CO₂ (15 minutes par jour) avec ou sans N₂ en continu. L'abattement de la DCO varie entre 22 et 43% alors que les rendements faradiques se situent entre 12 et 18%. Des performances différentes sont observées lorsque le barbotage de CO₂ est continu: le rendement faradique passe à 42% alors que l'abattement de la DCO chute à 8%. Ces résultats indiquent qu'un pH acide est défavorable à l'abattement de la DCO mais favorable au rendement faradique. Il limite ainsi les réactions parasites.

Les voltammétries cycliques réalisées au début de l'expérience (jour 5) et à la fin de l'expérience lorsque le courant est revenu à zéro (**Figure 86**) renseignent sur l'évolution du biofilm au cours du temps. On observe que le pic à 0,2 V (J= 0,8 A/m²) pour la voltammétrie au jour 5 disparaît sur la voltammétrie finale, tandis que deux couples redox centrés vers -0,3 et -0,35 V apparaissent au contraire en fin d'expérience. Par ailleurs, le potentiel en circuit ouvert est amélioré pour le biofilm en fin d'expérience, de -0,42 à -0,5 V et la vague de réduction est nettement diminuée. L'apparition de couples redox sur les VCs des biofilms en fin d'expérience pas observés en début d'expérience met en évidence l'existence d'un biofilm sur l'électrode.

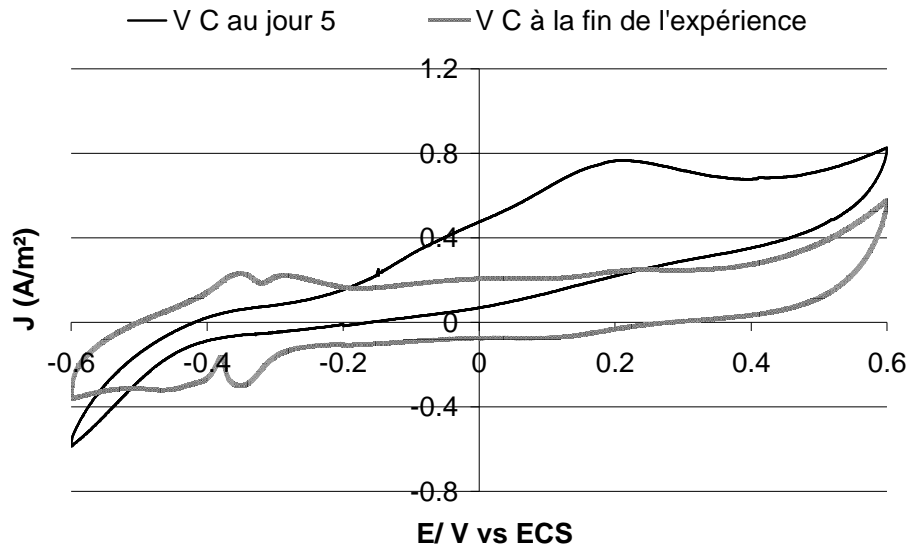


Figure 86: Voltammétries effectuées au début et à la fin de l'expérience d'alimentation fed-batch lors de la CA Figure 85 à 1 mV/s à partir de -0,3 V et entre -0,6 V et 0,6 V.

V.2.2.3. Expériences témoins sans polarisation

Pour évaluer les contributions respectives des biofilms EA et de la flore microbienne non EA sur l'abattement de la DCO de l'effluent et confirmer ainsi l'explication des faibles rendements faradiques, un réacteur témoin alimenté avec l'effluent sortie méthaniseur a été réalisé exactement dans les mêmes conditions que précédemment (Figure 85) avec les mêmes conditions de barbotage des gaz N_2 et CO_2 . Des électrodes ont été introduites dans ce réacteur mais maintenues sans aucune polarisation. Cet essai a ainsi servi de contrôle aux variations de pH et d'abattement de DCO observées au cours du temps lors des expériences sous polarisation (Tableau 18).

Lors du barbotage initial de CO_2 15 minutes par jour, le pH s'établit entre 6,5 et 7, comme lors de l'essai avec une électrode polarisée. Les valeurs d'abattement de DCO sont très proches de celles de l'expérience sous polarisation. Durant la semaine 4, le CO_2 est bullé 15 minutes par jour entre les barbotages de N_2 en continu et le pH s'élève à 9,14. On observe un abattement de DCO deux fois plus faible par rapport à l'expérience sous polarisation. Sous barbotage continu de CO_2 , les valeurs d'abattement de DCO redeviennent équivalentes à celles observées sous polarisation.

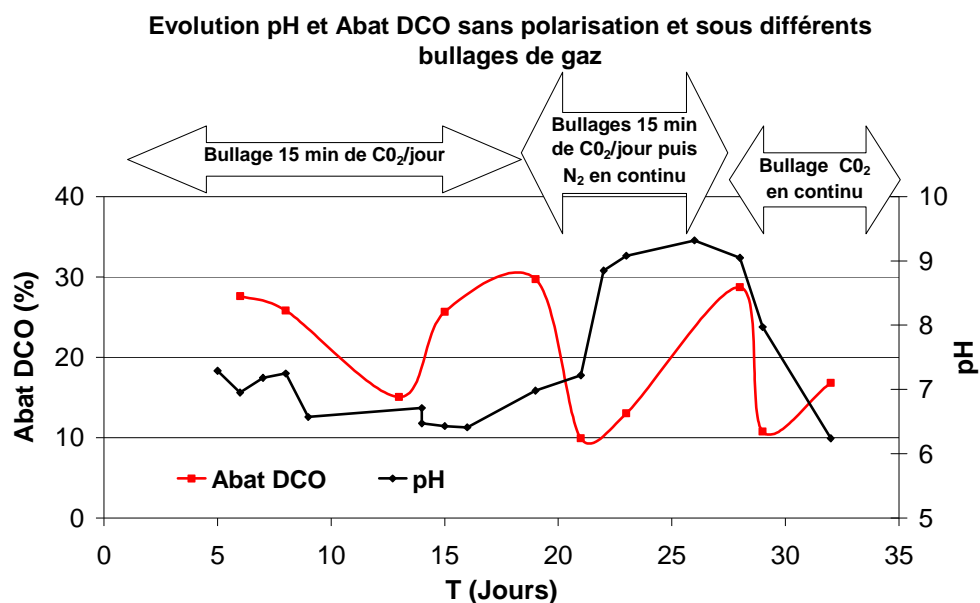


Figure 87: Evolution du pH et de l'abattement de la DCO lors de l'expérience témoin sans polarisation sous différents barbotages de gaz.

| Valeur moyenne | Semaine 2 (CO ₂ 15 min/J) | Semaine 3 (CO ₂ 15 min/J) | Semaine 4 (CO ₂ 15 min/J +N ₂ continu) | Semaine 5 (CO ₂ continu) |
|-----------------------|---|---|---|--|
| pH | 7,05 | 7,1 | 9,08 | 7,11 |
| DCO entrée (mg/L) | 1760 | 1700 | 1766 | 1688 |
| DCO résiduelle (mg/L) | 732 | 1132 | 948 | 1332 |
| Abattement DCO (± 6%) | 34 | 28 | 17 | 14 |

Tableau 18: Evolution du pH et de l'abattement de la DCO lors de l'expérience témoin sous différents barbotages de gaz.

Pour compléter les analyses présentées dans les **Tableau 17** et **Tableau 18**, l'évolution des paramètres physico-chimiques (DBO₅, carbone organique total (COT) et carbone inorganique (CI)) a été suivie pendant deux semaines et comparée à celle de l'effluent brut. Elle est présentée dans le **Tableau 19**. Les analyses de l'effluent brut montrent que le biofilm a été alimenté dans des conditions stables. En effet, on n'observe pas de variations importantes de ces paramètres dans le temps. Les diminutions de la DBO₅, du COT et du CI sont plus prononcées en sortie du réacteur sous polarisation (biofilm EA) qu'en sortie du réacteur témoin.

En conclusion, il faut retenir que la polarisation des électrodes n'entraîne pas d'amélioration significative de l'abattement de la DCO par rapport aux contrôles sans polarisation dans les conditions de nos expériences. Ceci explique le faible rendement

faradique observé lors de ces expériences. Comme dit précédemment, la faible surface spécifique des électrodes par rapport au volume des réacteurs (10 cm² pour 500 mL) ne permet donc pas au processus électrochimique d'avoir un impact majeur sur l'abattement de DCO qui est déjà important de façon spontanée. En revanche, on observe une amélioration significative de l'abattement du COT et du CI ainsi qu'une amélioration moins significative de l'abattement de la DBO₅ sous polarisation par rapport au témoin non polarisé. L'impact de l'électrochimie sur les paramètres COT, CI et DBO et non sur la DCO est difficilement compréhensible.

| Valeur moyenne | Semaine 4 | | | Semaine 5 | | |
|-------------------------|---------------|---|--------|---------------|---------------------------|--------|
| | | (CO ₂ /N ₂ continu) | | | (CO ₂ continu) | |
| Réacteurs | Effluent brut | Biofilm EA | Témoin | Effluent brut | Biofilm EA | Témoin |
| DBO ₅ (mg/L) | 383 | 317 | 364 | 579 | 401 | 422 |
| COT (mg/L) | 322 | 141 | 195 | 391 | 194 | 255 |
| CI (mg/L) | 367 | 188 | 209 | 411 | 410 | 456 |

Tableau 19: Moyenne sur deux semaines de l'évolution des différents paramètres physico-chimiques de l'effluent brut, Biofilm EA: réacteur sous polarisation, T: réacteur témoin.

V.2.3. Etude de l'effet des nutriments

Lors du traitement biologique par des procédés conventionnels, les effluents papetiers sont complétés par des nutriments azotés (urée) et phosphorés (acide phosphorique), en raison de leur faible teneur en ces éléments. Pour permettre une meilleure croissance de bactéries responsables de ce mode de traitement, la proportion DCO/N/P de complémentation est de 200/5/1.

Pour les expériences précédentes en batch, nous avons choisi de compléter les effluents avec un milieu synthétique type *Geobacter* simplifié (Cf paragraphe II.1.4.). Ce milieu apportait notamment ces éléments N et P et était déjà utilisé par de nombreux chercheurs pour favoriser la croissance de bactéries électro-actives dans des expériences de PACMs (Liu *et al.* 2008; Huang et Logan 2008a; Dumas *et al.* 2008b; Yuan *et al.* 2011). Les expériences réalisées en batch n'ont pas permis de conclure sur l'effet réel de l'apport des nutriments sur les performances des biofilms EA, nous avons soulevé un problème simultané de dilution de l'effluent par le milieu synthétique.

Les expériences présentées dans cette section sont destinées à tester la méthode industrielle de complémentation des effluents par l'urée et l'acide phosphorique en évitant

tout effet de dilution. Pour cela, des solutions très concentrées urée (10g/L) et acide phosphorique pur (85%) diluée au centième ont été utilisées. Nous vérifierons ainsi si cette méthode peut être également bénéfique à la technologie des piles microbiennes comme ils semblent l'être pour les méthodes de traitement conventionnelles et si oui dans quelle proportion ?

Pour réaliser cette expérience, trois réacteurs ont démarrés en parallèle avec l'effluent sortie méthaniseur complété en nutriments à des proportions différentes. L'un des réacteurs est complété par la proportion industrielle (DCO/N/P = 200/5/1), le second avec un cinquième de cette proportion (DCO/N/P = 200/1/0,2) et le troisième est inoculé uniquement avec l'effluent brut sans aucune complémentation. Après 24 jours d'expérience, les conditions de complémentation sont inversées, les réacteurs avec nutriments sont alimentés avec l'effluent brut et les nutriments sont rajoutés dans le réacteur alimenté avec l'effluent brut.

Les réacteurs sont alimentés en batch séquentielle avec un TRH de 48 h (changement de la moitié du volume de l'effluent des réacteurs tous les jours) et placés sous barbotage continu de N₂.

V.2.3.1. Biofilm formé initialement sans nutriments

La *Figure 88* présente la CA obtenue lors de la formation du biofilm alimenté par l'effluent brut, puis complété en nutriments (DCO/N/P = 200/5/1), à partir du jour 24. L'activité du biofilm EA démarre après une semaine d'alimentation en mode batch séquentielle et se stabilise autour de 3 A/m². Le taux d'abattement de DCO est d'environ 10%, et le rendement faradique dépasse 30% sur la troisième semaine. L'ajout de nutriments dans l'effluent entraîne plus qu'un doublement brusque de la densité de courant et du rendement faradique. Cette augmentation pourrait s'expliquer par un stockage transitoire du carbone organique sous forme de biopolymères extracellulaires dans les biofilms carencés en nutriments azotés et phosphorés (Wingender *et al.* 1999; Laspidou et Rittmann 2002). Le niveau très élevé du rendement faradique (80%) pourrait ainsi s'expliquer par l'oxydation de ces composés organiques accumulés dans le biofilm en absence de nutriments. L'ajout de nutriments entraînerait une croissance cellulaire et un déstockage progressif de ces composés organiques, expliquant la baisse de courant observée ensuite sur la CA. L'effet positif de l'ajout de nutriments pourrait donc être seulement transitoire.

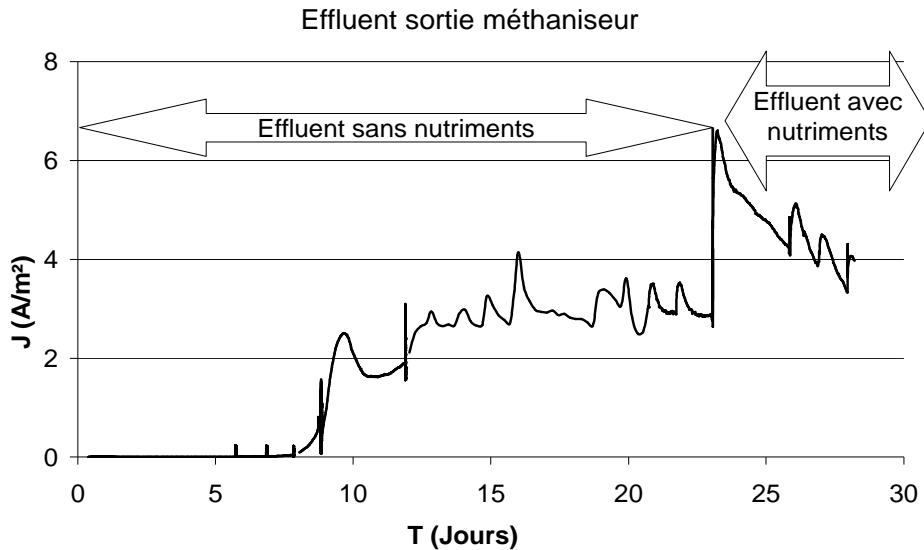


Figure 88: CA obtenue lors de l'étude de l'effet des nutriments: effluent sans nutriments du jour 0 au jour 24, puis avec nutriments (DCO/N/P = 200/5/1) à partir du jour 24.

| Valeur moyenne | Semaine 1 | Semaine 2 | Semaine 3 | Semaine 4 (+ nutriments) |
|------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------------------------|
| DCO entrée | 1635 | 1460 | 1434 | 1233 |
| DCO résiduelle | 1420 | 1309 | 1103 | 1022 |
| Abattement DCO ($\pm 6\%$) | 7 | 11 | 14 | 11 |
| Rf ($\pm 1\%$) | 4 | 21 | 34 | 80 |

Tableau 20: Effet des nutriments. Effluent sans nutriments du jour 0 au jour 24, puis avec nutriments à partir du jour 24.

La voltammétrie réalisée à la fin de l'expérience est en accord avec la valeur de la densité de courant observée sur la CA au même moment. On observe un pic d'oxydation centré à $-0,2$ V lié à une limitation qui pourrait être due à un épaissement du biofilm en cohérence avec l'accumulation de matière organique évoquée précédemment.

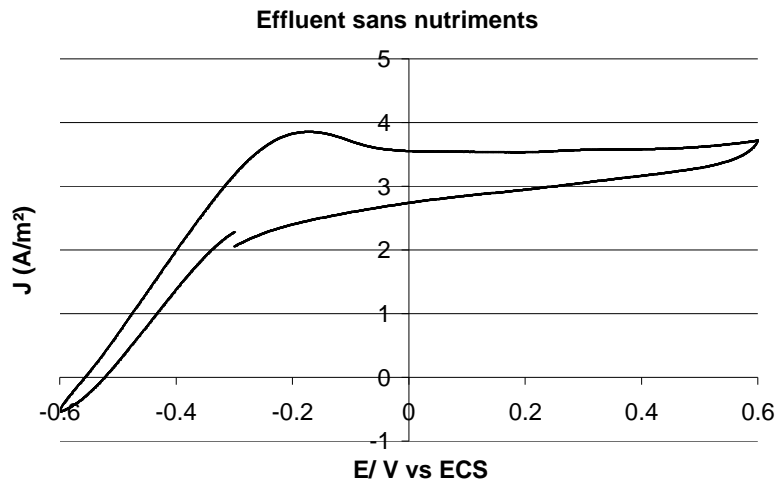


Figure 89: Voltammétrie cyclique à 1 mV/s à partir de -0,3 V et entre -0,6 V et 0,6 V, effectuée sur l'électrode à la fin de l'expérience d'alimentation Fed-batch présentée Figure 88.

V.2.3.2. Biofilms formés avec les nutriments

La **Figure 90** présente la CA obtenue lors de la formation du biofilm alimenté par les effluents complétés en nutriments (DCO/N/P = 200/5/1 et 200/1/0,2), puis sans nutriments à partir du jour 24. Pour tous les réacteurs placés sous barbotage continu de N_2 , le pH varie entre 8,5 et 9,5. On observe que l'activité du biofilm formé avec l'effluent complété avec un rapport DCO/N/P = 200/5/1 démarre après 6 jours alors que celui complété avec 5 fois moins de nutriments démarre après 10 jours. Cependant, malgré un démarrage plus lent, ce second biofilm produit plus de courant: la densité de courant évolue entre 4 et 6 A/m^2 pendant près de 15 jours, contre 3 à 4 A/m^2 avec le premier. A partir du jour 25, les deux biofilms sont alimentés avec l'effluent brut, on observe pour l'un comme l'autre une diminution de la densité de courant qui se stabilise à 3,5 A/m^2 . Le taux moyen d'abattement de DCO se situe autour de 10% dans toutes les conditions d'alimentation. Les valeurs des rendements faradiques varient pour les 2 expériences autour de 30% et atteignent parfois plus de 40%.

Ces résultats montrent que l'ajout de nutriments dans une proportion 5 fois plus faible que les complémentations industriels permet d'augmenter la densité de courant et le rendement faradique mais on n'observe pas d'effet sur l'abattement de la DCO.

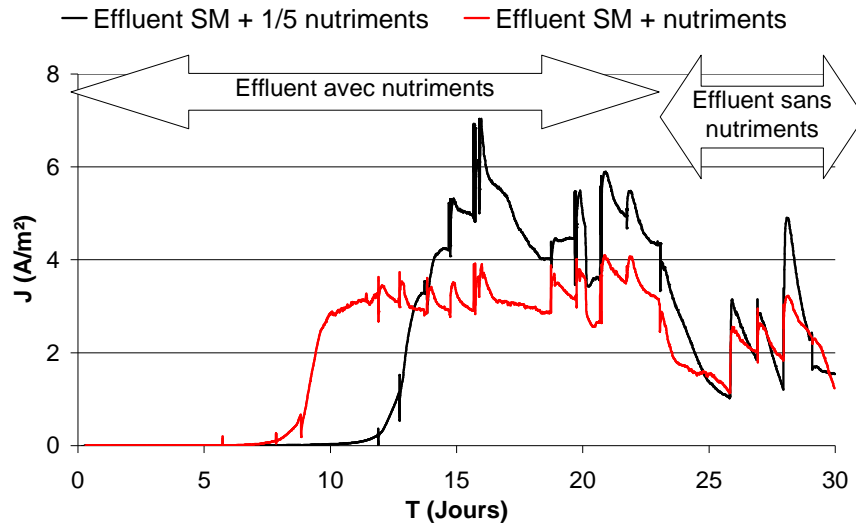


Figure 90: CAs enregistrées lors de l'étude de l'effet des nutriments. Du jour 0 au jour 26, effluent avec nutriments à 2 proportions différentes puis à partir du jour 26, l'effluent sans nutriments est utilisé.

| Valeur moyenne | Semaine 1 | Semaine 2 | Semaine 3 | Semaine 4 (sans nutriments) |
|------------------------------|-----------|-----------|-----------|--------------------------------|
| DCO entrée | 1630 | 1463 | 1455 | 1135 |
| DCO résiduelle | 1369 | 1205 | 1050 | 696 |
| Abattement DCO ($\pm 6\%$) | 6 | 11 | 11 | 9 |
| Rf ($\pm 1\%$) | 4 | 23 | 29 | 26 |

Tableau 21: Effet des nutriments. Du jour 0 au jour 26, effluent avec nutriments à la proportion industrielle puis à partir du jour 26, l'effluent sans nutriments

| Valeur moyenne | Semaine 1 | Semaine 2 | Semaine 3 | Semaine 4 (sans nutriments) |
|------------------------------|-----------|-----------|-----------|--------------------------------|
| DCO entrée | 1635 | 1463 | 1455 | 1135 |
| DCO résiduelle | 1415 | 1258 | 1110 | 776 |
| Abattement DCO ($\pm 6\%$) | 8 | 7 | 11 | 18 |
| Rf ($\pm 1\%$) | 0.4 | 29 | 46 | 24 |

Tableau 22: Effet des nutriments. Du jour 0 au jour 26, effluent avec nutriments à 1/5 de la proportion industrielle puis à partir du jour 26, l'effluent sans nutriments

Les voltammétries réalisées au jour 30 sur les deux électrodes sont présentées sur la **Figure 91**. Les potentiels en circuit ouvert des deux électrodes sont à peu près similaires

autour de $-0,5$ V mais le plateau du courant donné par le biofilm formé avec 1/5 de nutriments (courbe noire) commence dès $-0,3$ V alors qu'il ne commence qu'à $-0,1$ V avec le biofilm formé avec la dose industrielle de nutriments (courbe rouge). Cependant, le biofilm formé avec 1/5 de nutriments semble être moins performant aux potentiels plus élevés et fatigue plus vite.

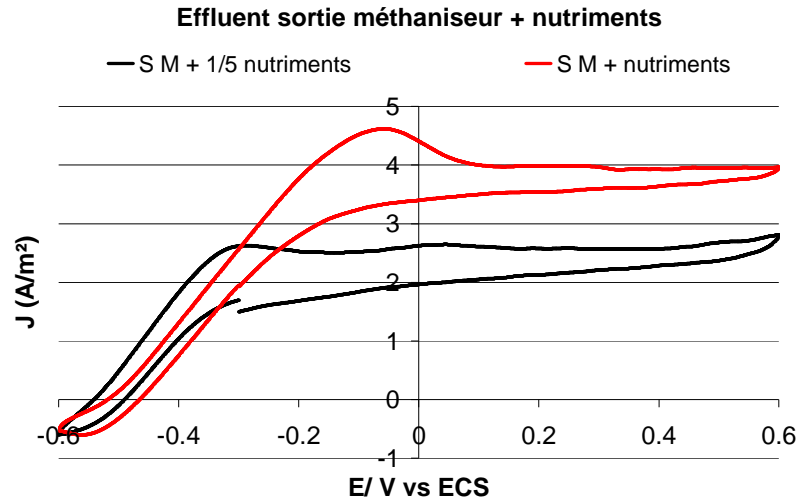


Figure 91: Voltammétries cycliques effectuées sur les électrodes à la fin des expériences d'alimentation fed-batch lors des CA de la **Figure 90** à 1 mV/s à partir de $-0,3$ V/Ref et entre $-0,6$ V et $0,6$ V

Conclusion

L'objectif des travaux présentés dans ce chapitre était la recherche des conditions optimales pour l'utilisation des bioanodes en présence d'effluents papetiers bruts. Plusieurs points essentiels ont pu être dégagés de cette étude:

Il est possible de former et maintenir pendant une longue durée les performances d'un biofilm EA avec un effluent industriel si et seulement si celui-ci est formé dans l'effluent dès le départ. Un biofilm préformé sous acétate devient acéto-dépendant et n'apparaît plus capable de dégrader de la matière organique plus complexe contenue dans l'effluent industriel.

Lorsqu'on augmente le débit d'alimentation de l'effluent dans le réacteur sans modifier la composition de l'effluent, on augmente le flux de DCO. Les expériences réalisées en diminuant le TRH de 48 à 6 heures indiquent que la densité de courant et l'abattement de la DCO restent constants alors que le rendement faradique diminue. Ces résultats ont mis en évidence le faible impact de l'électrode sur la consommation de DCO. Les conditions électrochimiques choisies pour ces expériences à savoir faible surface d'électrode (10 cm²)

pour un grand volume de solution (500 mL) associé à un abattement significatif de DCO qui se produit de façon spontanée expliquent la faiblesse de cet impact.

L'étude des performances des biofilms EA à flux de DCO constant (débit et concentration variant de façon inverse) ont mis en évidence qu'une dilution trop importante de l'effluent diminue les performances du biofilm. En effet, on a observé pour des DCO résiduelles inférieures ou égales à 400 mg/L que le courant commençait à chuter.

L'étude de la concentration de l'effluent a montré qu'au-delà de 800 à 1000 mg/L de DCO en entrée, le courant n'augmentait plus. Ce niveau optimal de la DCO de l'effluent a permis de confirmer une limitation uniquement par une concentration faible en substrat organique résiduelle en équilibre avec le biofilm EA plutôt que par le flux de DCO introduit dans les réacteurs. Pour des valeurs de DCO de l'effluent plus élevées, les faibles performances observées peuvent s'expliquer par une inhibition du substrat comme l'avait déjà suggéré (Rabaey *et al.* 2005). Le faible taux d'abattement de la DCO a été expliqué par une limitation cinétique de la dégradation de la matière organique. En effet, dans ces conditions d'expérience, le TRH de 24 h ne semble pas avoir été suffisant aux micro-organismes pour dégrader une proportion importante de la matière organique de l'effluent.

Nous avons confirmé qu'il n'était pas nécessaire de polariser l'électrode dès le départ de l'expérience pour favoriser la formation de biofilms EA. En effet, des biofilms EA efficaces ont été obtenus après incubation sans polarisation initiale, avec des démarrages rapides (temps de latence de moins d'un jour) lorsque les électrodes sont basculées sous polarisation.

Les rendements faradiques calculés par rapport à l'abattement de la DCO restent faibles (<25%) pour toutes ces expériences. La majorité de la DCO est donc éliminée dans des processus autres qu'électrochimiques. Cette hypothèse a été confirmée par des expériences témoins sans polarisation pour lesquelles les abattements de DCO sont du même ordre de grandeur que ceux des expériences polarisées. Par ailleurs, les taux moyens d'abattement de la DCO de l'effluent sont de 20%, et ne dépassent pas 40%. Ces taux ne dépassent pas significativement ceux obtenus lors des expériences de contrôle sans polarisation. Comme dit précédemment les conditions électrochimiques strictes choisies pour ces expériences expliquent cette faible activité.

Pour favoriser la densité de courant et le rendement faradique lorsque la polarisation retardée est utilisée, il est préférable d'établir les conditions anaérobies dans le réacteur par barbotage de gaz après que le biofilm ait été formé. Après la première phase de formation du biofilm qui est favorisée par la présence d'oxygène, le barbotage d'azote permet de l'éliminer et de limiter ainsi la compétition des micro-organismes aérobies avec le biofilm EA.

Le contrôle du pH par barbotage de gaz N₂ et CO₂ a mis en évidence qu'un pH neutre ou légèrement acide généré par le barbotage de CO₂ n'améliorait pas la densité de courant mais était favorable au rendement faradique, en raison de la diminution de l'abattement de la DCO.

Il est apparu que l'ajout de nutriments dans l'effluent industriel a un effet sur les performances des biofilms EA. Néanmoins, une proportion 5 fois plus faible que celle utilisée lors des procédés de traitement biologique industriels a permis d'obtenir de meilleurs densité de courant et rendements faradiques. Par ailleurs, les variations du courant et du rendement faradique laissent supposer un rôle important de biopolymères organiques stockés dans les biofilms EA

Ce chapitre nous a permis de définir les conditions optimales de formation des bioanodes en conditions industrielles. On peut désormais les expérimenter en piles avec des rapports surface/volume plus élevés.

Chapitre VI

Conception et évaluation de piles microbiennes dans des effluents papetiers

Introduction

Les chapitres précédents ont permis de définir les paramètres optimaux pour la formation de biofilms électro-actifs à partir d'effluents papetiers en conditions de laboratoire puis industrielles. Ce dernier chapitre présente les essais de mise en œuvre de ces biofilms dans des prototypes de piles microbiennes. Le but des expériences est de vérifier les performances des biofilms formés sous les différentes conditions optimisées dans des systèmes de piles. Dans un premier temps, des tests ont été effectués avec la première version de prototype décrite au chapitre II (*Figure 33*). Avec cette version du prototype, nous avons testé la polarisation immédiate ou retardée, les performances de différentes cathodes développées par la société PaxiTech ainsi que l'effet de l'ajout ou non des nutriments dans l'effluent.

Une deuxième version de prototype plus aboutie, prenant en compte les défauts de la version 1. Avec cette seconde version, nous avons étudié les performances des différentes membranes (ioniques ou non collées sur la cathode), l'effet des conditions anaérobies sous pH acide ou basique, l'effet des biofilms secondaires et nous avons comparé la formation des biofilms sous polarisation (système à 3 électrodes) ou directement dans les piles connectées à une résistance (système à 2 électrodes).

VI.1. Première version du prototype

La première version du prototype a été adaptée d'un design existant conçu pour des essais de piles à membrane échangeuse de protons (PEMFC) par le partenaire PaxiTech. Ses différents composants ont été présentés dans le chapitre II (*Figure 33*). Le prototype de base a été modifié de telle sorte qu'on puisse y introduire une électrode de référence afin de former des biofilms EA sous polarisation directement dans les piles.

VI.1.1. Conditions expérimentales

Les essais en piles ont été réalisés avec les deux effluents de référence, à savoir l'effluent «sortie méthaniseur» et l'effluent «entrée biologique». Les prototypes de pile d'une contenance de 100 mL sont alimentés en continu ou en batch séquentiel avec ces effluents stockés à 4°C et, complétés lors de certaines expériences par de l'acétate ou des nutriments (urée et phosphate).

Pour les expériences en alimentation continue, les cellules électrochimiques (réacteurs de 500 mL ou prototypes de 100 mL) sont préalablement laissés en batch pendant une semaine. La mise en conditions anaérobies se fait par barbotage de gaz dans l'effluent stocké à 4°C. Au contraire, en mode batch ou batch séquentiel le barbotage est réalisé en continu dans les prototypes. Les bioanodes sont formées sur des tissus de carbone de 25 cm²

polarisés à $-0,3$ V, la cathode à air jouant le rôle de contre-électrode dans ce cas. Après formation du biofilm, les deux électrodes sont connectées au-travers d'une résistance externe sans modifier les modes d'alimentation (Cf paragraphe II.2.4). La plupart des expériences utilisent une cathode à air dite «standard» qui est composée d'une électrode en carbone contenant $0,5$ mg/cm² de particules de platine et 20% de PTFE sur laquelle est collée thermiquement une membrane en polyoléfine.

VI.1.2. Effluent sortie méthaniseur (SM)

VI.1.2.1. Comparaison du mode d'alimentation (batch vs continu)

Les performances de la pile sont testées sous deux modes d'alimentation: en batch avec des cycles d'ajout d'acétate dans l'effluent et en continu avec l'effluent brut seul ou complété par de l'acétate.

Les densités maximum de courant obtenues lors de la formation des biofilms ainsi que la densité de puissance lors de la caractérisation en pile sont présentés dans le *Tableau 23*.

| Formation du biofilm sous polarisation | Modes d'alimentation | Jmax (A/m ²) (lors de la formation du biofilm) | Puissance maximale (mW/m ²) de la pile | Jmax (A/m ²) sous Pmax |
|--|---------------------------------------|--|--|-------------------------------------|
| 45 jours de polarisation | Effluent brut en continu | 2 | 20 puis 560 avec une cathode neuve | 0,13 puis 1,5 avec la cathode neuve |
| Electrode pas polarisée pendant 15 jours puis polarisée pendant 12 jours | Effluent + 10 mM d'acétate en continu | 1 | 204 | 0,75 |
| 7 jours de polarisation | Effluent + 10 mM acétate en batch | 0,8 | 100 | 0,3 |

Tableau 23: Performances du prototype lors de la formation du biofilm EA et de la caractérisation en pile en fonction du mode d'alimentation. La cathode standard a été utilisée (0,5 mg/cm² de Pt, 20% PTFE + membrane polyoléfine).

On constate que malgré l'ajout d'un substrat facilement dégradable dans l'effluent (acétate), les performances des piles restent faibles quel que soit le mode d'alimentation (batch ou continu). La meilleure performance de 560 mW/m² est obtenue pour le biofilm

formé avec l'effluent brut pendant une longue période (6 semaines) et avec une cathode neuve, la caractérisation étant faite une heure après l'insertion de la nouvelle cathode. Cette valeur est ponctuelle et s'effondre rapidement après quelques jours de fonctionnement de la cathode (*Figure 92*). Les différentes caractérisations de cette pile sont présentées dans les paragraphes suivants.

Caractérisation de la pile formée en alimentation continue avec l'effluent brut

Le biofilm est formé pendant 45 jours sous polarisation directement dans la pile utilisée comme un montage à 3 électrodes, la cathode standard servant alors de contre-électrode (*Figure 92*).

Le prototype est laissé une semaine en batch puis placé en alimentation continue (TRH 10 h) sans modifier la polarisation. La densité de courant maximale atteint 2 A/m², avec des moyennes de 22% pour l'abattement de DCO et 12% pour le rendement faradique. A partir du jour 45, la polarisation est arrêtée, le système est basculé en pile en connectant les deux électrodes (anodes et cathodes) au travers de différentes résistances (dans la gamme 1 Ω à 10 kΩ), ceci pour tracer les courbes de polarisation et de puissance. Aux jours 46 (cathode neuve 1) et 49 (cathode neuve 2), le prototype est démonté, la cathode remplacée puis une nouvelle caractérisation est faite. Les courbes de polarisation et de puissance ainsi obtenues sont présentées sur la *Figure 92*.

Au jour 45, lorsque la polarisation est arrêtée, la pile produit une très faible puissance de 20 mW/m² (courbes vertes). Les caractérisations individuelles des électrodes indiquent que les performances de la cathode sont considérablement dégradées (courbes vertes). Le prototype est démonté, on constate la présence à la surface de la cathode d'une épaisse couche de matière friable qui ressemble à du tartre. Comme le montrent les photos de la cathode prises après 24h et 45 jours (*Figure 93*), cette couche commence à se former dès 24 h après l'alimentation du prototype puis s'épaissit progressivement avec le temps. La formation de cette couche qui gêne la diffusion des protons vers les sites actifs de la cathode peut expliquer la chute importante des performances de la pile après seulement 24 h de fonctionnement de 560 à 84 mW/m² (courbes rouge et noire).

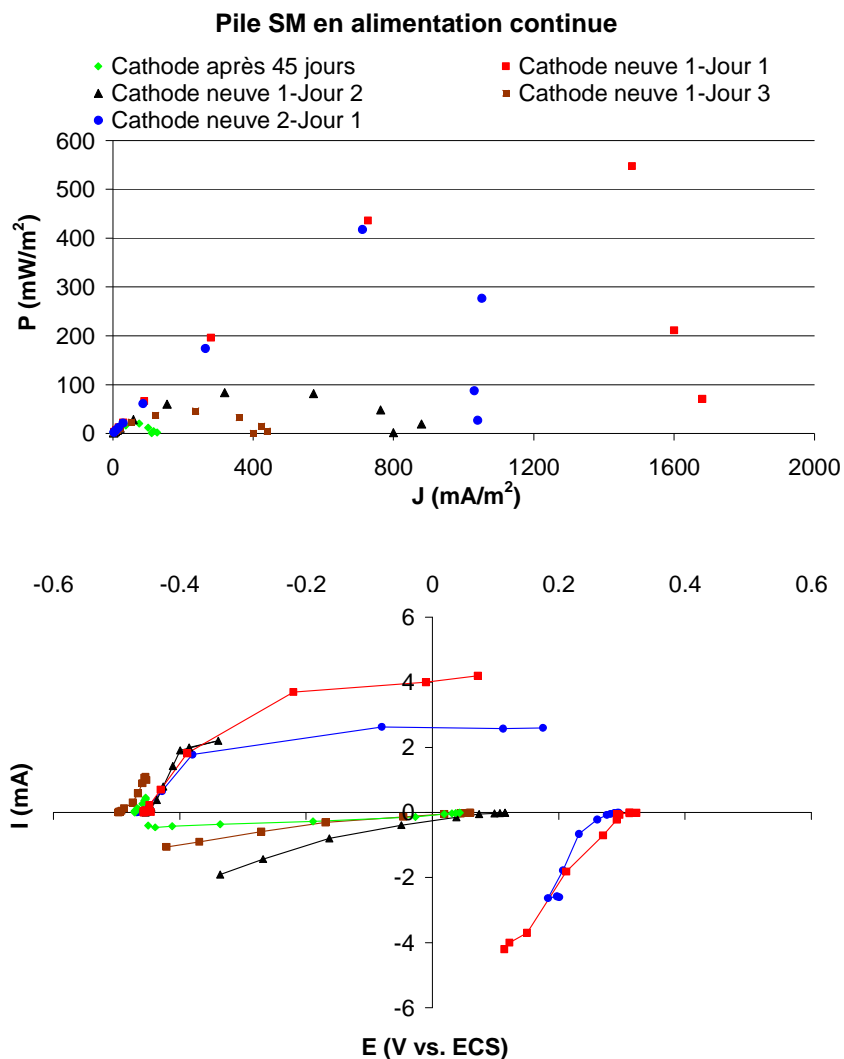


Figure 92: Caractérisation de la pile et des deux électrodes à la fin des 45 jours de formation du biofilm (verte), juste après le changement de la cathode (rouge), 24h après le changement de la cathode (bleu), 48h après le changement de la cathode (marron). La pile est alimentée en continu avec l'effluent sortie méthaniseur(SM) brut. Expérience réalisée au LGC.

A



B



Figure 93: Photos représentant l'état d'encrassement de la cathode après 24h (A) et 45 jours (B) d'alimentation en continu de la pile avec l'effluent sortie méthaniseur brut. Photos réalisées au LGC.

Plusieurs méthodes ont été testées pour nettoyer la cathode, sans jamais parvenir à retrouver les puissances initiales (jour 0). Nous avons essayé :

- ❖ Le passage de l'effluent à très fort débit pour tenter de décoller le tartre. Après plus de 2 heures de haut débit (2 litres/heure), aucun effet n'a été observé sur la puissance de la pile.
- ❖ Le nettoyage de la cathode avec une solution de HCl à pH 1 n'a pas non plus donné d'amélioration de la puissance
- ❖ La production des composés chlorés (chlore, hypochlorite) sur la cathode par électrolyse dans le but de la rendre «anti biofouling» a donné une légère amélioration, la puissance passant de 80 à 100 mW/m².

Les anodes en tissu de carbone observées au MEB à la fin de l'expérience (**Figure 94**) présentent une colonisation bactérienne importante autour des fibres de carbone qui constituent l'électrode. Ceci pourrait justifier de la robustesse de l'anode qui continue à fonctionner malgré l'entartrage de la cathode.

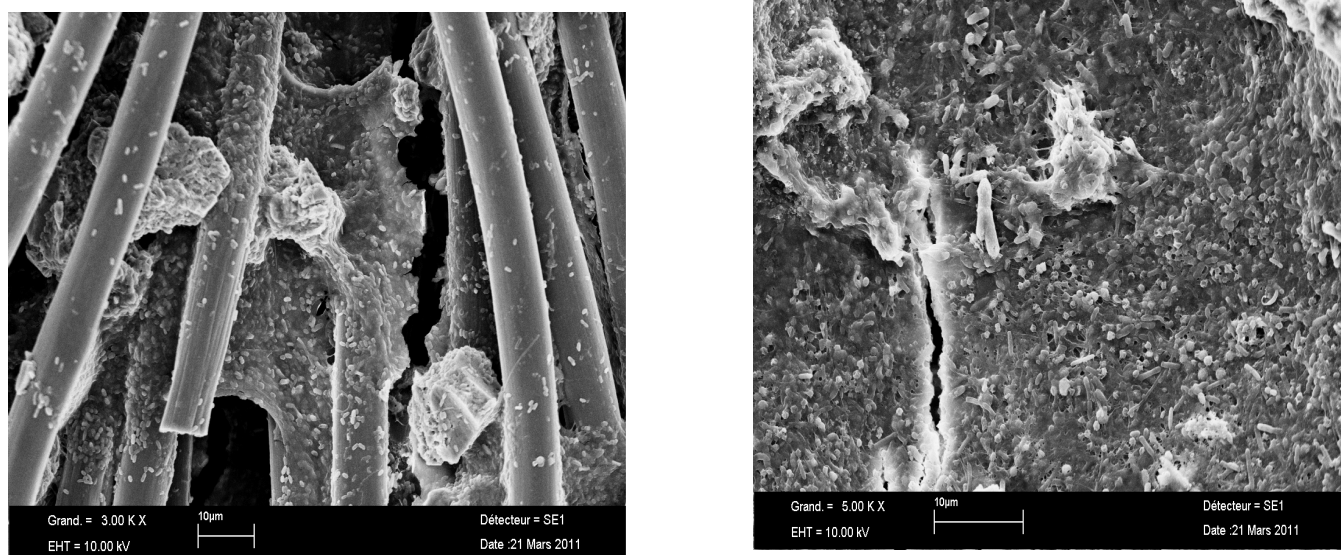


Figure 94: Photos MEB de l'anode colonisée à la fin de la caractérisation à 2 grossissements différents. Photos réalisées par le LGC.

VI.1.2.2. Etude de différentes cathodes à air

Différentes cathodes avec des charges variables en Pt et en PTFE ont été testées avec le premier prototype de pile. A cet effet, un biofilm a été formé pendant 3 semaines sous alimentation continue (TRH 24h) avec l'effluent sortie méthaniseur brut. Durant la formation de ce biofilm, le pH a varié entre 7 et 7,4, la densité de courant maximale était de 1,4 A/m², l'abattement moyen de la DCO de 32% et le rendement faradique de 25%. Les performances hebdomadaires moyennes du biofilm sont regroupées dans le **Tableau 24**.

| Valeur moyenne | Semaine 1 | Semaine 2 | Semaine 3 |
|------------------------------|-----------|-----------|-----------|
| DCO entrée (mg/L) | 1647 | 1461 | 1455 |
| DCO résiduelle (mg/L) | 1350 | 974 | 919 |
| Abattement DCO ($\pm 6\%$) | 26 | 33 | 37 |
| Rf ($\pm 1\%$) | 18 | 31 | 19 |

Tableau 24: Performances du biofilm EA formé en alimentation continue (TRH 24h) avec l'effluent sortie méthaniseur brut à -0,3 V et sous barbotage continu de N₂.

Les différentes cathodes fournies par PaxiTech ont toutes été testées successivement avec ce biofilm anodique dans les mêmes conditions expérimentales durant une semaine chacune. Les performances vis-à-vis de la réduction de l'oxygène de chaque cathode (courbes $I = f(I)$) ainsi que les puissances maximales obtenues sont résumées dans le **Tableau 25**.

| Alimentation continue | | | |
|---|--|-----------------------|-----------------------------------|
| N° cathode | Charge en Pt (mg /cm ²) | Charge en PTFE (%) | Puissance (mW/m ²) |
| 1 | 2 | 60 | 121 |
| 2 | 0,7 | 60 | 30 |
| 3 | 1,9 | 40 | 160 |
| 4 | 0,8 | 20 | 10 |
| 5 | 0,5 | 20 | 90 |
| Alimentation batch + 10 mM d'acétate | | | |
| 5 | 0,5 | 20 | 65 |
| 3 | 1,9 | 40 | 147 |

Tableau 25: Performances de la pile avec différentes cathodes en alimentation continue avec l'effluent brut ou batch avec l'effluent complétementé avec de l'acétate.

Les puissances maximales obtenues sont restées faibles comparées à celles obtenues lors de l'expérience précédente sous le même mode d'alimentation (Cf **Figure 92**). Les courbes de polarisation présentées **Figure 95** montrent l'effet positif de la charge croissante en platine.

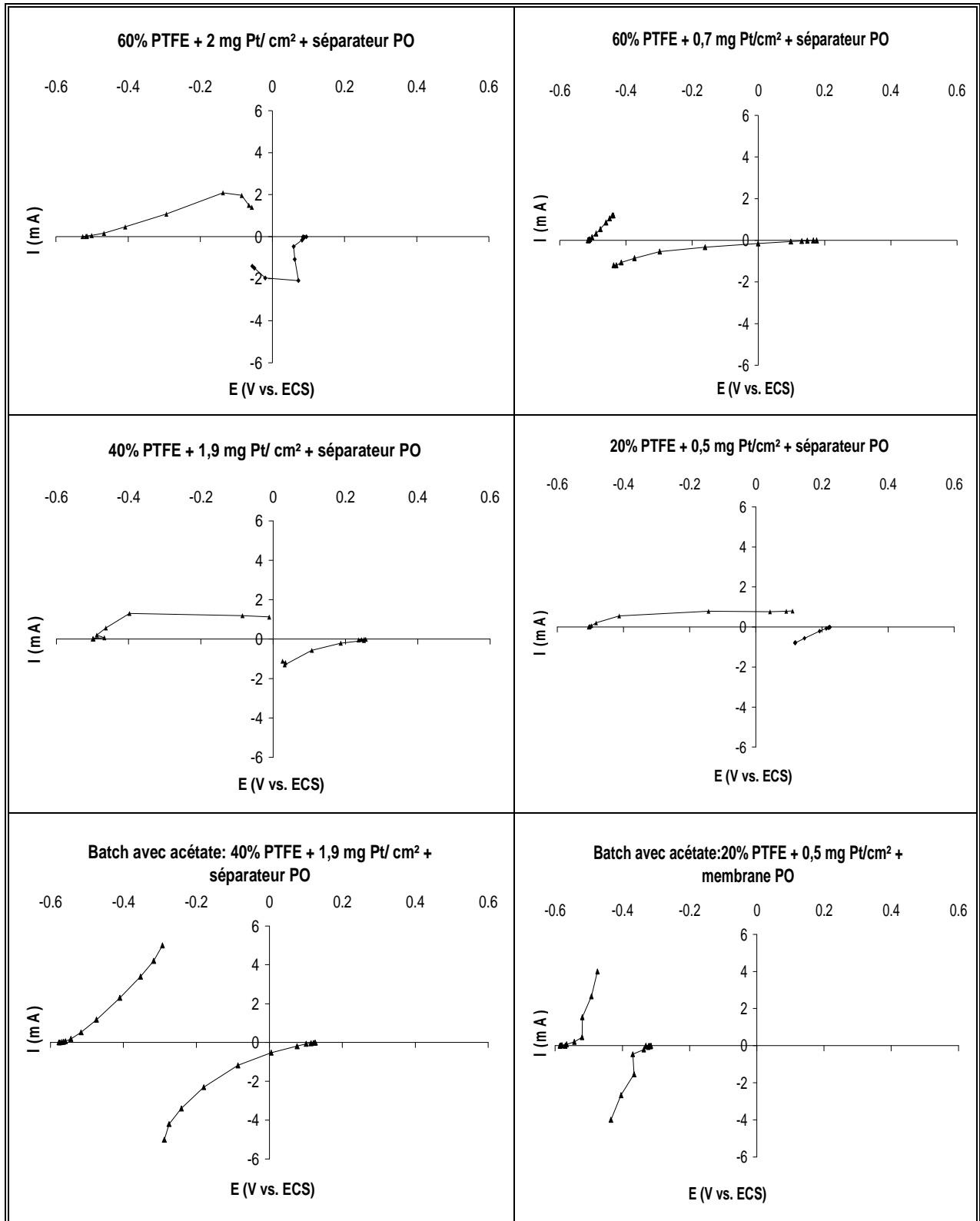


Figure 95: Caractérisations intensité-potential de l'anode et de la cathode réalisées lorsque la pile génère les puissances maximales.

La bioanode présente des performances acceptables malgré les mauvaises performances de certaines cathodes. Les cathodes qui révèlent des courbes de polarisation acceptables (N°3 et N°5) ont permis d'obtenir les meilleures performances globales en terme

de densité de puissance. La différence de qualité des cathodes pourrait être expliquée par le fait qu'elles avaient déjà été utilisées pour des essais en piles à hydrogène par PaxiTech.

D'une manière générale, il ressort de cette expérience que quel que soit le mode d'alimentation (continue avec effluent brut ou batch avec acétate), plus la charge en platine est importante, plus les performances de la pile sont élevées et stables.

Ce constat avait déjà été mis en évidence par des tests effectués à PaxiTech sur l'effet de la charge en platine sur les performances des cathodes dans une pile à hydrogène. Dans ce cas le compartiment anodique est alimenté en continu avec de l'hydrogène, l'anode est un tissu de carbone de 25 cm² chargé de 1 mg Pt/cm² et 60% de PTFE. Le compartiment cathodique est alimenté avec de l'air en continu avec une électrode en tissu de carbone de 25 cm² contenant 20% de PTFE et différentes charges de platine. L'électrolyte est du chlorure de potassium 100 mM. Les résultats obtenus sont présentés sur la *Figure 96*. On observe clairement une amélioration des performances avec la charge en platine.

Malgré ce constat, nous avons choisi de maintenir comme standard pour la suite des expériences la cathode chargée à 0,5 mg/cm² en platine et 20% PTFE sur laquelle est soudée une membrane en polyoléfine, déjà utilisée dans les expériences présentées au paragraphe VI.1.2.1. L'objectif de ce choix est de rester dans les mêmes conditions que la plupart des cathodes utilisées dans la bibliographie et de limiter le coût de fabrication.

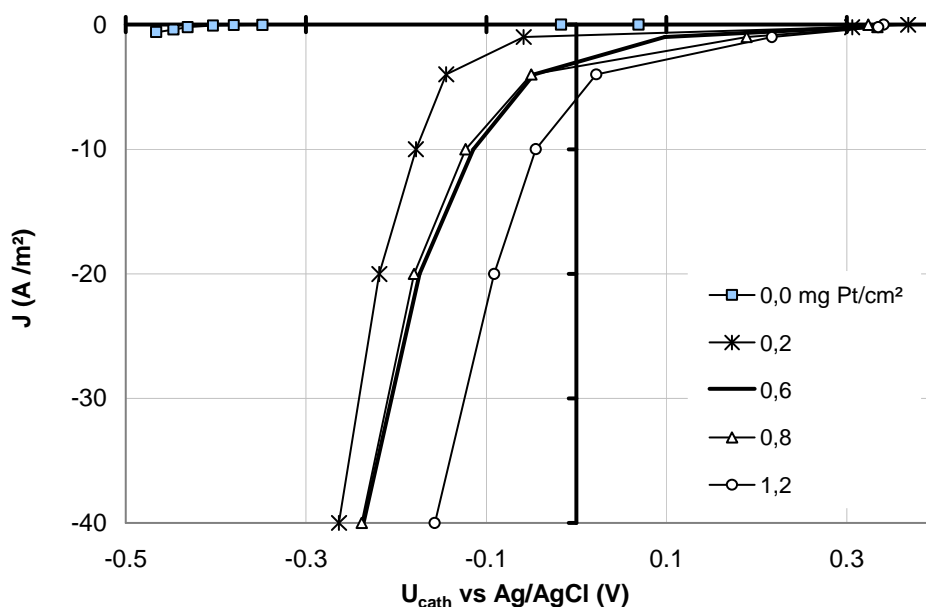


Figure 96: Performances des cathodes à air en fonction de la charge en Pt dans des piles à hydrogène. Expérience réalisée par PaxiTech.

VI.1.2.3. Effet de l'ajout des nutriments dans l'effluent

Nous avons mis en évidence dans le chapitre précédent que l'ajout de nutriments dans l'effluent industriel augmentait significativement la densité de courant et le rendement faradique, sans effet sur l'abattement de la DCO. Nous souhaitons vérifier à travers les expériences présentées dans cette section si ce paramètre avait une influence sur le fonctionnement de la pile complète.

Pour des besoins de reproductibilité, 4 biofilms ont été formés en parallèle avec l'effluent sortie méthaniseur brut. Les biofilms ont d'abord été formés sous polarisation pendant 3 semaines en alimentation fed batch avec un TRH de 48h, puis basculés en mode pile. Pour deux d'entre eux les nutriments urée et acide phosphorique ont été ajoutés dans des proportions massiques DCO/N/P = 200/1/0,2 qui se sont avérées suffisantes lors des essais sur les bioanodes (Cf paragraphe V.2.3.). Les performances moyennes des biofilms et piles obtenues sont présentées dans le **Tableau 26**.

| Effluent | Sans nutriments | | Avec nutriments | |
|--|-----------------|--------------|-----------------|--------------|
| | Biofilm 1 | Biofilm 1' | Biofilm 2 | Biofilm 2' |
| Essais | | | | |
| Caractéristiques des biofilms durant les 3 semaines de formation sous polarisation | | | | |
| Jmax (A/m ²) | 1 | 2,6 | 4 | 4,6 |
| Abattement de DCO moyen (± 6%) | 29 | 26 | 24 | 26 |
| Caractéristiques des prototypes de piles durant 10 jours avec les biofilms formés précédemment | | | | |
| Tension de la pile (V) à Pmax | 0,36 à 180 Ω | 0,27 à 100 Ω | 0,35 à 180 Ω | 0,36 à 330 Ω |
| Pmax (mW/m ²) | 293 | 290 | 277 | 161 |
| Valeur de J (A/m ²) sous Pmax | 0,8 | 1,1 | 0,8 | 0,5 |
| Abattement de DCO moyen en pile (± 6%) | 11 | 11 | 22 | 16 |

Tableau 26: Performances des biofilms formés avec et sans ajout de nutriments dans l'effluent sortie méthaniseur en alimentation batch séquentielle pour un TRH de 48h et sous barbotage continu de N₂. Les valeurs maximales des caractéristiques de la pile sont obtenues au premier jour de caractérisation.

Ces résultats confirment que l'ajout des nutriments est important pour les densités de courant lors de la formation des biofilms EA mais leur influence sur les performances des piles complètes est moins évidente. Par contre, les abattements de DCO sont du même ordre de grandeur entre 24 et 29% lors de la formation des biofilms EA pour les deux duplicats. Ces valeurs restent dans la même gamme pour les piles avec nutriments (16-22%) mais diminuent fortement en absence de nutriments (11%). Les densités de puissances varient entre 161 et 293 mW/m², elles sont plus stables en absence de nutriments.

Les courbes de polarisation et de puissance présentées sur la *Figure 97* montrent au premier jour de la connexion en pile (jour 1) un meilleur comportement des bioanodes formées avec l'effluent sans nutriments malgré les densités de courant plus faibles observées lors de leur formation. Cela se traduit sur les courbes de polarisation par des courbes intensité-potentiel plus stables et sur les courbes de puissance par des densités de courant maximales plus élevées. Après 10 jours de fonctionnement en pile, les valeurs moyennes maximales des densités de puissance et de courant chutent de 25 à 65% et de 30 à 80% respectivement. Ces fortes baisses sont dues à une évolution négative aussi bien des anodes que des cathodes. On observe néanmoins une meilleure évolution dans le temps des cathodes sans membrane polyoléfine (PO).

A notre connaissance, c'est la première fois que l'effet de l'ajout des nutriments dans l'effluent en se référant aux méthodes de traitement conventionnelles est abordé dans le domaine des piles microbiennes. Néanmoins, plusieurs études utilisent des milieux de culture riches tels que le milieu de culture utilisé pour *Geobacter* pour enrichir les effluents en éléments minéraux, fers, vitamines et tampons (Liu et al. 2008; Wang et al. 2010; Srikanth et al. 2010).

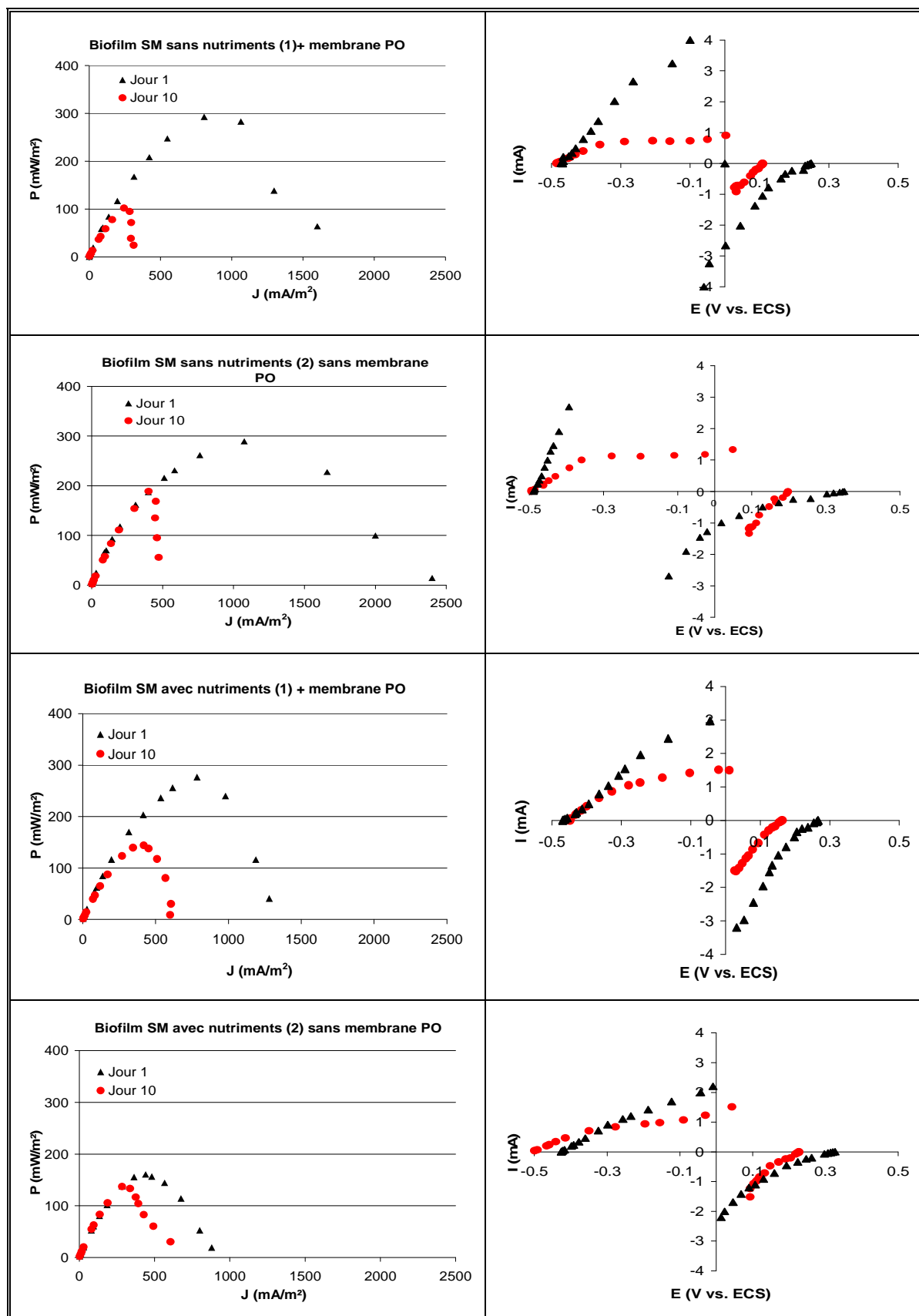


Figure 97: Courbes de puissance et de polarisation aux jours 1 (noir) et 10 (rouge) des piles alimentées avec l'effluent sortie méthaniseur (SM) avec ou sans ajout de nutriments. Les biofilms ont été préalablement formés dans les mêmes conditions d'alimentations. Les cathodes standard avec ou sans membrane polyoléfine (PO) sont utilisées.

VI.1.3. Effluent entrée biologique (EB)

VI.1.3.1. Formation du biofilm EA

Le compartiment anodique de la pile est rempli avec l'effluent entrée biologique, laissé en batch pendant 5 jours puis placé en alimentation continue avec l'effluent brut pour un TRH de 5h. La cathode utilisée pour la formation de ce biofilm est plus chargée en Pt et PTFE que la cathode standard (1,5 mg/cm² en Pt et 60% PTFE), de plus, elle est sans membrane. La densité de courant augmente progressivement pour atteindre un maximum de 1,5 A/m² après 28 jours de formation du biofilm EA sous polarisation à -0,3V.

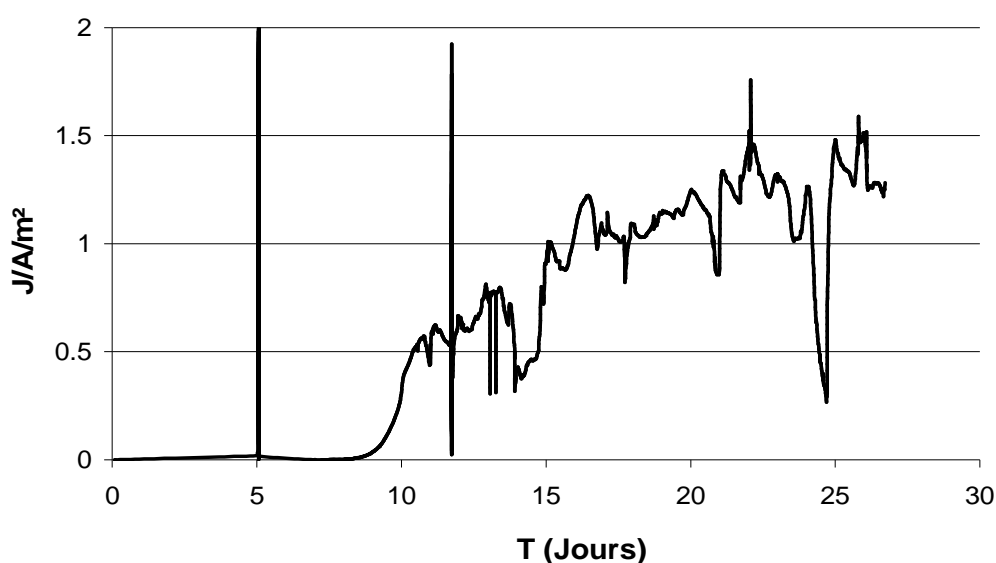


Figure 98: Biofilm formé en alimentation continue avec l'effluent entrée biologique brut (TRH 5h). L'électrode en tissu de carbone 25 cm² est polarisée à -0,3V et le réacteur est sous un barbotage de N₂ en continu.

Les performances moyennes hebdomadaires de ce biofilm sont présentées dans le **Tableau 27**.

| Valeur moyenne | Semaine1 | Semaine2 | Semaine3 | Semaine4 |
|-----------------------|----------|----------|----------|----------|
| DCO entrée (mg/L) | 805 | 1108 | 1322 | 1090 |
| DCO résiduelle (mg/L) | 536 | 676 | 964 | 654 |
| Abattement DCO (± 6%) | 34 | 40 | 28 | 40 |
| Rf (± 1%) | 3 | 6 | 14 | 17 |

Tableau 27: Performances du biofilm EA de la **Figure 98**.

L'abattement de la DCO reste stable entre 30 et 40% tandis que le rendement faradique augmente progressivement de 3 à 17%.

VI.1.3.2. Caractérisation du biofilm en pile

A la fin de la formation du biofilm EA, la pile est caractérisée. Les courbes de puissance sont présentées sur la *Figure 99*.

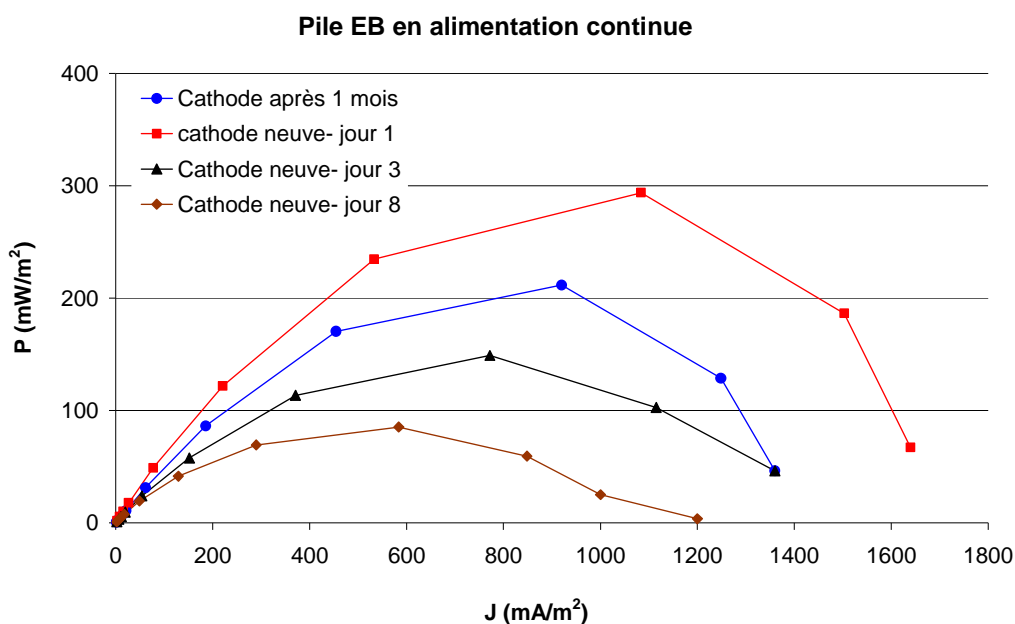


Figure 99: Caractérisation de la pile à la fin de la formation du biofilm sous polarisation en alimentation continue avec l'effluent entrée biologique brut avec 2 cathodes différentes. Courbe bleu: cathode ayant servi pendant un mois à la formation du biofilm EA (1,5 mg/cm² en Pt et 60% PTFE, sans membrane). Courbe rouge: cathode standard neuve au jour 1; courbe noire: cathode standard au jour 3; courbe marron: cathode standard au jour 8.

La puissance obtenue avec la cathode qui a servi de contre-électrode pour la formation du biofilm EA est de 212 mW/m² (courbe bleue). Lorsque cette cathode est remplacée par une cathode standard neuve moins chargée en Pt et en PTFE (0,5 mg/cm² et 20%), la puissance augmente légèrement jusqu'à 294 mW/m². Les performances de la pile diminuent rapidement (-75% après 8 jours de fonctionnement). La cathode standard semble moins stable dans le temps que celle chargée avec 1,5 g/cm² de Pt et 60% PTFE, qui a fonctionné convenablement pendant un mois.

VI.2. Deuxième version du prototype

Dans le but d'optimiser les performances obtenues avec la première version du prototype de pile, une deuxième version a été réalisée. Le cahier des charges de ce nouveau prototype comporte les points importants suivants:

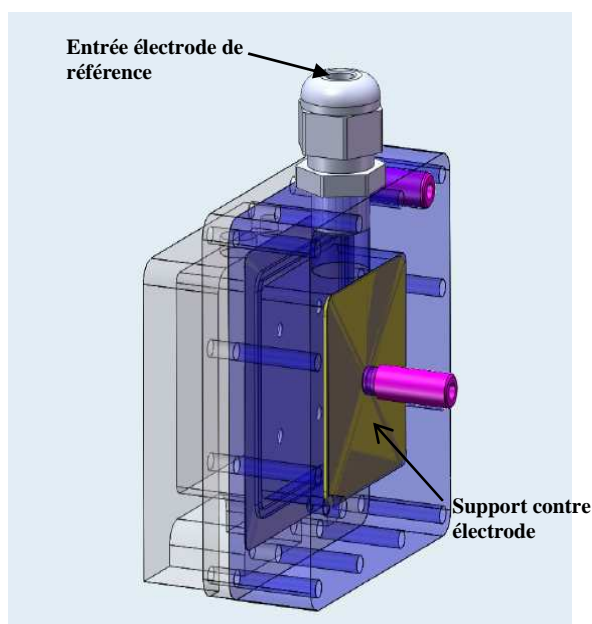
- ❖ Possibilité de former des biofilms anodiques sous polarisation en système à 3 électrodes en utilisant une contre-électrode de type grille de Pt/Ir, c'est-à-dire sans utiliser la cathode à air,
- ❖ Possibilité de remplacer le compartiment contenant la contre-électrode par un compartiment comportant une cathode à air pour un fonctionnement en pile. La bioanode est ainsi moins perturbée lors du changement des cathodes et ces dernières ne sont pas utilisées comme contre-électrode pendant la formation du biofilm sous polarisation.
- ❖ Un rapport surface de l'électrode / volume du réacteur élevé pendant le fonctionnement en pile (surface = 25 cm², volume = 100mL).
- ❖ Une distance inter-électrodes réduite dans la pile; cette condition impose de s'affranchir de la présence d'une électrode de référence. Par rapport au premier prototype, la distance inter-électrode passe de 4 à 1 cm.
- ❖ Possibilité d'alimentation en continu, batch séquentiel ou batch et de barbotage des gaz N₂ ou CO₂.

Cette nouvelle version est donc constituée de deux unités bien distinctes : une première dans laquelle le biofilm EA sera formé puis une autre qui servira au fonctionnement en pile complète. Les deux unités sont présentées dans les paragraphes suivants.

VI.2.1. Configuration du prototype pour la formation des biofilms EA

Avant leur caractérisation en pile, les biofilms sont préalablement formés sous un potentiel imposé de -0,3V. Les réacteurs sont en polycarbonate et assurent un rapport surface / volume pas très différent de celui des piles complètes. La contenance du réacteur est de 100 mL. L'anode est un tissu de carbone de 25 cm², plaqué sur une grille de titane de même surface servant de collecteur anodique. La contre-électrode est une grille de Pt/Ir (90/10) de 10 cm² soutenue par une plaque de titane. Les réacteurs comportent 3 orifices pouvant servir à l'alimentation du substrat et au barbotage des gaz. L'espace entre l'anode et la cathode comporte un orifice supérieur pour le passage de l'électrode de référence et un orifice supplémentaire pour l'évacuation de l'effluent. Les orifices inutilisés peuvent être bouchés. Les vues des faces anodique et cathodique sont présentées sur la *Figure 100*.

A: vue côté cathodique



B: vue côté anodique

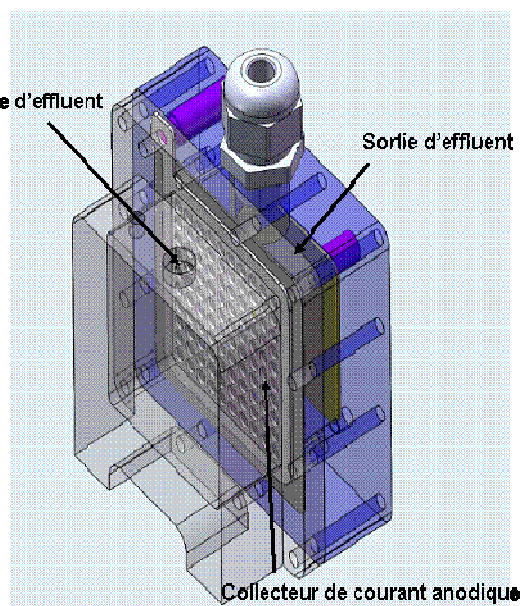


Figure 100: Vue des deux faces du prototype pour la formation des bioanodes.

VI.2.2. Configuration du prototype pour le fonctionnement en pile

Après la formation du biofilm dans la configuration de réacteur précédente, le compartiment supportant la contre-électrode et l'électrode de référence est remplacé par un compartiment qui supporte la cathode. La distance inter-électrodes est ainsi réduite de 4 à 1 cm et le volume du réacteur à 80 mL. Les électrodes sont connectées à des résistances externes pour la caractérisation en pile (Cf paragraphe II.3.4.1.).

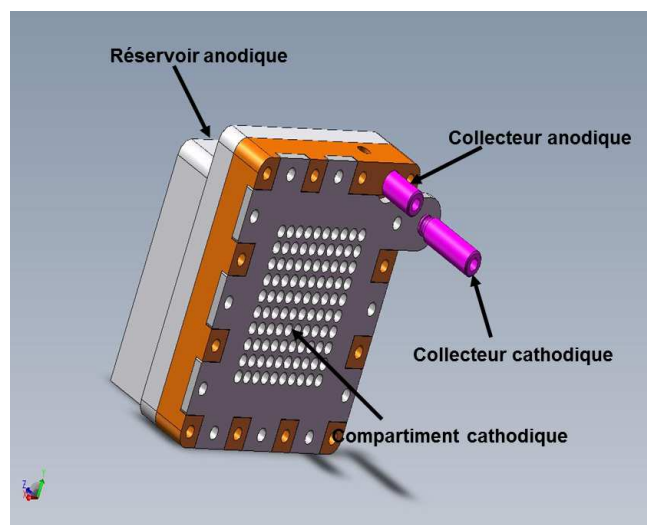


Figure 101: Vue de la deuxième version du prototype de pile complète.

VI.2.3. Etude de différentes membranes

Des membranes sont parfois ajoutées contre la face interne des cathodes à air et ceci dans plusieurs objectifs: séparer les réactions biologiques ayant lieu à l'anode de celles de la cathode (Rozendal *et al.* 2008), limiter la diffusion de l'oxygène vers l'anode, empêcher la diffusion de l'électrolyte à travers la cathode qui entraînerait une baisse de la perméabilité gazeuse de celle-ci et enfin empêcher la formation de dépôts microbiens, organiques ou minéraux sur la couche active de la cathode. Bien sûr il faut aussi que la membrane gêne au minimum le transfert des ions entre la cathode et l'électrolyte et n'augmente pas la résistance interne de la pile. Le type de membrane utilisée peut donc affecter les performances de la pile et conditionner la résistance interne du système

La société PaxiTech nous a fourni plusieurs cathodes à air à la surface desquelles avaient été pressées différentes membranes. Plusieurs types de membranes ont été étudiées avec des objectifs bien définis pour chacune.

Les membranes échangeuses d'ions doivent avoir une bonne conductivité ionique et être ainsi capables d'assurer un échange ionique continu entre les deux électrodes afin de maintenir l'électro-neutralité du système. Le matériau doit être hydrophile. Nous avons étudiés

❖ deux membranes à conduction anioniques notées AEM N°1 et AEM N°2 dont les caractéristiques ont été présentés dans le chapitre II (*Cf* paragraphe II.3.1.). Le but espéré avec ces membranes est d'éviter de gêner le transfert des anions produits à la cathode par la réaction de réduction de l'oxygène en milieu neutre ou alcalin:



❖ Une membrane Nafion®: c'est une membrane à conduction protonique, elle est la plus utilisée dans la bibliographie des PACM. Dans ce cas l'objectif est différent. Il ne semblerait en effet pas pertinent d'utiliser une membrane limitée à la conduction protonique dans un milieu de pH neutre ou alcalin dans lequel la concentration en protons est très faible. On pense au contraire que la membrane Nafion® pourrait servir de réservoir de protons pour la cathode, la pile fonctionnant alors pendant un certain temps avec les protons contenus initialement dans la membrane.

Le principal inconvénient des membranes à conduction ionique est l'établissement d'un gradient de pH entre les deux électrodes de la pile. En effet, on observe généralement une augmentation du pH du côté cathodique tandis que celui-ci diminue du côté anodique (Rozendal *et al.* 2006a; Zhuang *et al.* 2010). Ceci a amené la recherche vers d'autres types de membranes telles que les membranes de filtration et de séparation. Deux membranes de ce type ont été testées. Il est nécessaire que le matériau choisi ait un caractère hydrophile excellent, de bonnes propriétés de mouillabilité, des pores de petites tailles (< 12 µm) pour des raisons citées précédemment. Enfin, les matériaux doivent être stables dans une gamme de pH

de 5 à 10 et de température de 0 à 80°C. Pour réduire au maximum la résistance interne de la pile, les membranes doivent avoir une très faible épaisseur. Nous avons ainsi étudié:

- ❖ Une membrane polyoléfine (PO): c'est une membrane de filtration (< 12 µm)
- ❖ Une membrane de dialyse: c'est une membrane de séparation

Les résultats obtenus avec ces différentes membranes ont été comparés à ceux obtenus avec une cathode sans membrane.

VI.2.3.1. Formation des biofilms EA

Pour comparer les performances des biofilms formés sous potentiel imposé dans les prototypes et dans les réacteurs électrochimiques conventionnels, six biofilms EA ont été formés: 3 biofilms en alimentation batch avec ajouts successifs de 5 mM d'acétate et 3 autres en alimentation batch séquentielle avec l'effluent sortie méthaniseur brut pour des TRH de 48h. Dans chacun des cas, deux biofilms sont formés dans les prototypes de pile et un dans le réacteur conventionnel. Tous les biofilms ont été formés sur des tissus de carbone 25 cm² avec des grilles de Pt/Ir comme électrodes auxiliaires. Le rapport surface/volume dans les prototypes (25 cm²/100 mL) est 5 fois supérieur à celui des réacteurs électrochimiques conventionnels (25 cm²/500 mL).

Sans surprise, les densités de courant obtenues lors des expériences en batch avec complémentation de l'effluent par de l'acétate sont supérieures à celles obtenues sous alimentation avec l'effluent brut (*Figure 102*). Les valeurs de densités de courant restent du même ordre de grandeur dans les prototypes et les réacteurs électrochimiques quel que soit le rapport surface/volume. Pour les essais en alimentation batch séquentielle, la moyenne des abattements de DCO est meilleure dans les prototypes (entre 20 et 25%) par rapport aux réacteurs (autour de 16%). Les valeurs des rendements faradiques par contre sont comparables, 26% dans les prototypes et 29% dans les réacteurs électrochimiques, ce qui est surprenant eu égard à l'augmentation du rapport surface/volume. En effet, d'un point de vue électrochimique, le rapport surface/volume n'a théoriquement aucun effet sur la densité de courant mais le rendement faradique devrait lui être proportionnel. Il est plus difficile de prévoir l'effet sur l'abattement de la DCO car une bonne partie est due à des processus planctoniques.

Après deux semaines de polarisation (jour 13), les répliquats de biofilms formés dans les prototypes avec acétate ou avec l'effluent brut atteignent des densités de courant similaires (de 1 à 1,2 A/m²). Ceci est surprenant étant donné que des densités de courant ainsi que des rendements faradiques plus élevés avaient été observés dans les chapitres précédents pour des réacteurs alimentés en batch avec ajout d'acétate par rapport aux réacteurs alimentés en batch séquentiel avec l'effluent brut. En l'absence de différences significatives des performances des biofilms formés dans les prototypes et les réacteurs, ils ont été utilisés indifféremment pour tester les différentes membranes.

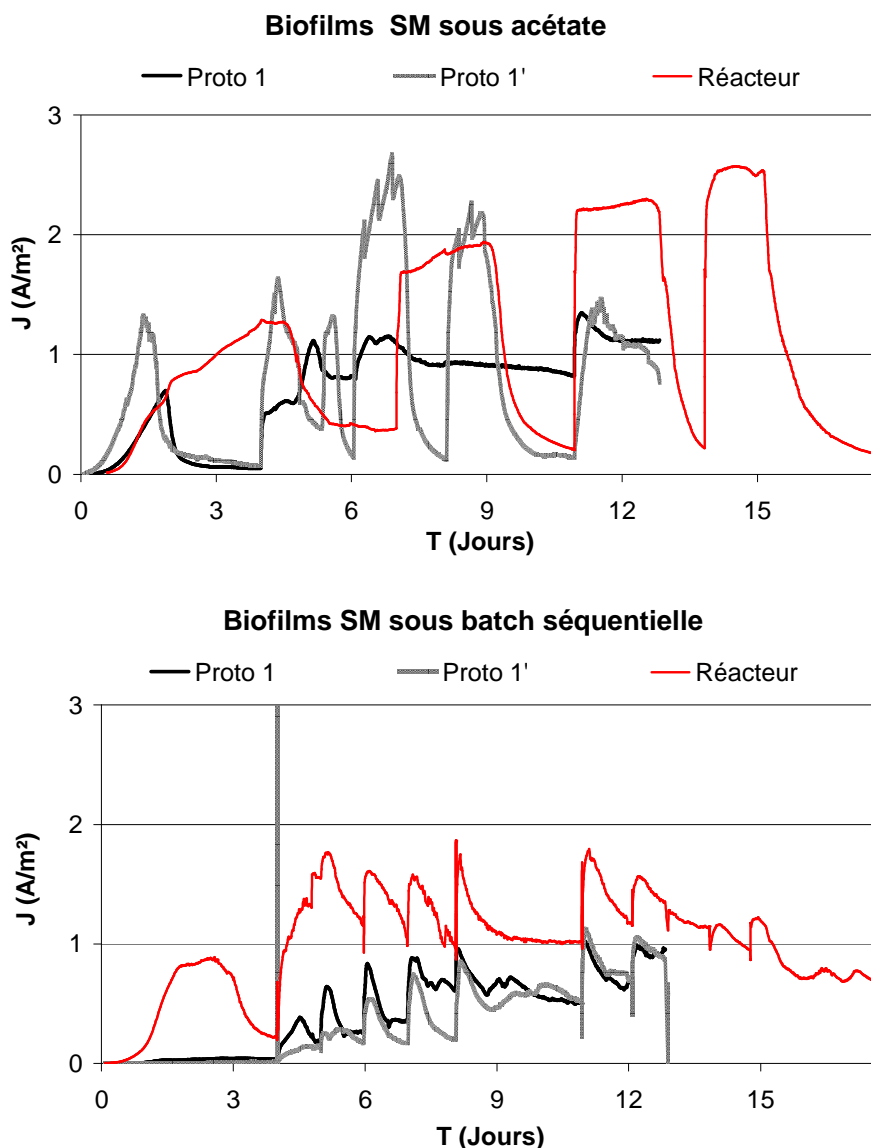


Figure 102: Différents biofilms EA formés avec l'effluent sortie méthaniseur (SM) en alimentation batch avec acétate ou fed batch avec l'effluent brut dans les prototypes en duplicats (courbes noires en traits pleins et pointillés) ou dans les réacteurs électrochimiques (courbes rouges). Les électrodes de travail en tissu de carbone 25 cm² sont polarisées à -0,3 V et les réacteurs sous N₂ en continu.

VI.2.3.2. Caractérisations des piles avec différentes membranes

Les différentes membranes ont été testées chacune pendant une semaine dans les piles fonctionnant en modes batch ou batch séquentiel. Les puissances maximales obtenues avec les versions 1 et 2 du prototype de piles sont présentées dans le **Tableau 28**.

| Mode d'alimentation | Alimentation batch Effluent + 10 mm d'acetate | | Alimentation batch sequentielle Effluent brut | |
|-------------------------------|--|---------------------|--|---------------------|
| | Prototype version 2 | Prototype version 1 | Prototype version 2 | Prototype version 1 |
| Essais | | | | |
| Membrane anionique N°1 | - | 4 | - | 8 |
| Membrane anionique N°2 | 1.2 | - | - | 1.2 |
| Membrane Nafion® | - | - | - | 9 |
| Cathode sans membrane | - | - | 280 | 210 |
| Membrane PO | 290 | 312 | 280 | 230 |
| Membrane dialyse | 190 | 68 | - | 160 |

Tableau 28: Puissances délivrées par les piles équipées de cathodes à air sur lesquelles sont fixées différentes membranes.

L'ajout de membranes anioniques et Nafion® sur les cathodes à air paraît totalement inadapté pour les PACMs exploitant des effluents papetiers dans ces conditions d'expériences. En effet, les puissances restent négligeables avec ces 3 membranes malgré différents biofilms testés sous les deux modes d'alimentation étudiés. Dans le cas de la membrane Nafion®, ce résultat était attendu. En effet, le pH dans les prototypes de piles est alcalin. Dans ces conditions, à la cathode a lieu la réduction de l'oxygène qui s'écrit:



La membrane protonique gêne l'évacuation des ions hydroxydes de la surface de la cathode. Ceci a pour conséquence une augmentation locale du pH à la surface de la cathode qui bloque la réaction cathodique. De plus, la concentration des H^+ étant très faible de l'ordre de 10^{-9} dans le milieu, les groupements fonctionnels responsables du transfert de protons dans la membrane (groupes sulfonés) sont bloqués par d'autres cations présents dans l'électrolyte, ce qui entraîne une augmentation de la résistance de la membrane. Il a été montré que 99,999% des groupes sulfonés du Nafion® pourraient être occupés par des cations autres que les protons (Rozendal *et al.* 2006a; Zhao *et al.* 2006).

Dans une autre étude, Rozendal *et al.* (2008) ont montré en comparant plusieurs membranes ioniques que les membranes anioniques étaient meilleures que les membranes

cationiques, en termes de performances électrochimiques de même que du nombre de transport des ions H^+ et HO^- (Rozendal *et al.* 2008a). On espérait donc qu'une membrane anionique ne freinerait pas l'évacuation rapide des ions hydroxyles ou carbonates à partir de la cathode vers l'électrolyte. Les faibles performances des membranes anioniques testées ici prouvent le contraire. Les études reportées dans la bibliographie utilisent des milieux synthétiques de composition connue et relativement pauvres dans lesquels sont rajoutés de très faibles volumes d'effluents servant d'inoculum. Notre étude, au contraire met en œuvre des effluents industriels sans dilution. Il faut croire que les effluents bruts bloquent les capacités de transport de matière des membranes échangeuses d'ions. Les membranes de filtration/séparation permettent d'obtenir de meilleures performances. En effet, la membrane de dialyse conduit à des performances acceptables alors que les meilleures performances sont obtenues avec la membrane polyoléfine et la cathode sans membrane. Il est logique que la cathode sans membrane assure les meilleures performances puisque dans ce cas aucune barrière ne vient freiner le transport des ions de et vers les sites actifs. Rappelons que le rôle de la membrane serait de stabiliser les performances sur le long terme en retardant le bio-fouling de la face interne de la cathode.

La cathode munie d'une membrane polyoléfine a été confirmée comme cathode standard pour la suite des expériences. Outre les performances stables obtenues avec cette membrane quel que soit le mode d'alimentation (batch ou continu), elle présente en plus l'avantage d'un coût très réduit par rapport aux solutions envisagées auparavant (Nafion® par exemple). Elle permettra aussi de protéger les sites actifs de la cathode de l'entartrage observé lorsque l'effluent réel est utilisé sur de longues périodes.

VI.2.4. Effet du barbotage de gaz

Les conditions anaérobies dans les réacteurs obtenues par barbotage continu des gaz N_2 ou N_2/CO_2 ont été présentées dans les chapitres précédents comme essentielles pour optimiser les performances des biofilms EA. Nous souhaitons dans cette section vérifier l'effet de ces deux gaz pour des expériences en pile.

VI.2.4.1. Formation des biofilms EA

Deux paires de biofilms ont été formées pendant deux semaines sous polarisation en alimentation batch séquentielle (TRH 48h) avec l'effluent sortie méthaniseur brut: une paire sous barbotage CO_2 en continu et une paire sous N_2 en continu. Les chronoampérommétries obtenues sont présentés sur la *Figure 103*.

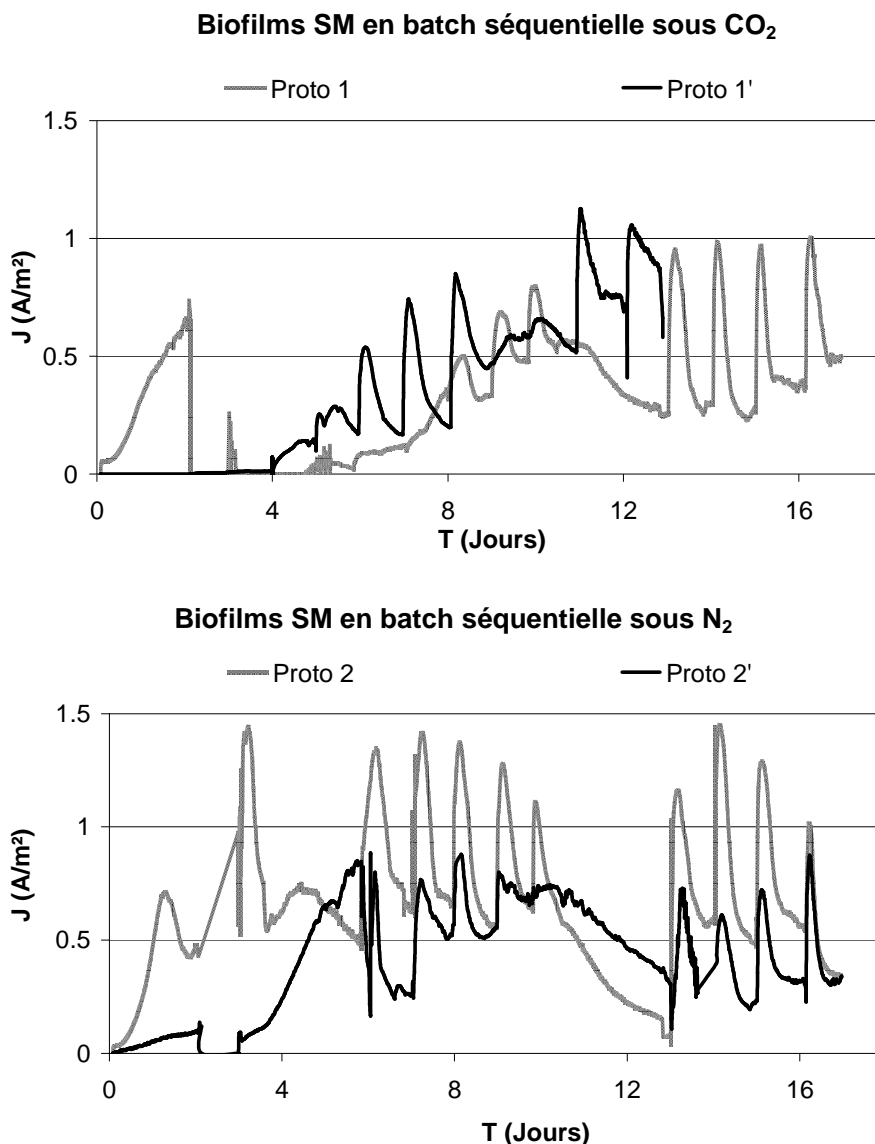


Figure 103: Duplicats de biofilms formés dans les prototypes en alimentation batch séquentielle (TRH 48h) avec l'effluent sortie méthaniseur (SM). Les conditions anaérobies sont maintenues avec les barbotages des gaz N_2 ou CO_2 .

Ces biofilms anodiques ont ensuite été testés en pile complète avec une cathode à air standard (0,5 mg/L Pt, 20% PTFE, membrane polyoléfine). Les performances obtenues lors de la formation des biofilms et dans les systèmes de pile complète sont regroupées dans le **Tableau 29**.

Le pH, les abattements de DCO ainsi que les rendements faradiques sont des moyennes de 10 à 17 valeurs mesurées pendant les 3 semaines d'expérience. On n'observe pas de différences significatives dans les performances des différentes piles malgré des pH acides dans un cas (barbotage de CO_2) et basiques dans l'autre (barbotage de N_2). Les rendements d'abattement de DCO sont faibles malgré des TRH élevés, et ne sont pas différents sous polarisation ou en piles. Comme nous l'avons constaté au chapitre V

(Tableau 17), ces résultats confirment que le pH ne semble pas être déterminant pour les performances aussi bien lors de la formation des biofilms EA que lors de la caractérisation des piles dans nos conditions d'expériences.

| Conditions de barbotage | Sous CO ₂ | | Sous N ₂ | |
|--|-----------------------------------|------------|---------------------|------------|
| | Biofilm 1 | Biofilm 1' | Biofilm 2 | Biofilm 2' |
| Essais | | | | |
| Caractéristiques des biofilms durant les 18 jours de formation sous polarisation | | | | |
| pH | 6,38 | 6,34 | 9,4 | 9,2 |
| J _{max} | 1,1 | 0,9 | 1,5 | 0,8 |
| Abattement de DCO moyen (±6%) | 17 | 12 | 19 | 14 |
| Rf moyen (± 1%) | 49 | - | 56 | 56 |
| Caractéristiques des prototypes de piles durant 21 jours avec les différents biofilms formés précédemment | | | | |
| Tension de la pile (V) à 330 Ω | 0,31 | 0,25 | 0,18 | 0,26 |
| P _{max} (mW/m ²) | 155 | 198 | 133 | 174 |
| Valeur de J (A/m ²) sous P _{max} | 1 | 1,12 | 1,4 | 0,9 |
| Abattement de DCO moyen en pile (± 6%) | 8% | - | 16% | 17% |
| Caractérisation des électrodes (Prototype version 1) | 150 puis 330 mW/m ² | 138 | 133 | 158 |

Tableau 29: Effet du barbotage des gaz N₂ et CO₂ sur les performances des biofilms EA et des piles. En orange, performance obtenue après avoir changé la cathode.

Ce résultat est intéressant car il met en évidence que des biofilms EA formés avec le même inoculum présentent les mêmes performances dans une gamme de pH allant de 6 à 9. C'est un résultat original car dans la littérature, aucune étude n'a encore été présentée dans laquelle un même inoculum dans des conditions opératoires identiques conduise à des performances similaires quel que soit le pH. En effet, on retrouve en fonction des inoculums des biofilms efficaces soit à pH neutre (Gil *et al.* 2003; jadhav et Ghangrekar 2009), soit à pH basique (Puig *et al.* 2010). Dans le dernier cas par exemple, les auteurs obtiennent avec des

effluents domestiques, une puissance de $0,42 \text{ W/m}^3$ à pH 7,5 qui passe à $1,8 \text{ W/m}^3$ lorsque le pH est augmenté à 9,5. Plus récemment, une étude a présenté une pile dans laquelle la puissance la plus élevée est obtenue à pH 9 (1170 mW/m^2) mais diminue de 29% lorsque le pH est ramené à 7 (833 mW/m^2) et de 89% lorsque le pH est ramené à 5 (129 mW/m^2) (Yuan *et al.* 2011).

Le résultat obtenu dans notre travail indique qu'il n'est pas nécessaire d'utiliser des solutions tampons pour maintenir le pH à des valeurs neutres ou basiques dans les PACMs en fonctionnement.

VI.2.4.2. Caractérisation des piles

Les cathodes à air dites standard équipées de membrane polyoléfine ont été utilisées pour ces expériences. Les piles sont maintenues sous barbotage continu des différents gaz pendant trois semaines. Les évolutions de la différence de potentiel (ddp) avec différentes résistances externes ainsi que la caractérisation des différentes électrodes avant l'arrêt des expériences sont présentées sur la *Figure 104*.

Les valeurs de différence de potentiel des différentes piles restent stables sur une à deux semaines en fonction des changements de résistance. On observe des valeurs de tension en circuit ouvert entre 0,6 et 0,7 V pour les expériences sous CO_2 et de plus de 0,8 V pour les expériences sous N_2 .

Au jour 20, les différentes électrodes ont été transférées dans la première version du prototype pour les caractériser (rappelons que la seconde version qui n'autorise pas l'utilisation d'une électrode de référence ne permet pas la caractérisation individuelle des électrodes). Les courbes intensité-potentiel montrent clairement que les bioanodes sont responsables des limites de puissance des piles pour cette série d'expériences. Les cathodes présentent à la fin des expériences des performances correctes, c'est-à-dire des potentiels en circuit ouvert relativement élevés, supérieurs à +0,2 V, et des variations de potentiel pas trop importantes lorsque le courant augmente. Ceci est compréhensible étant donné que les cathodes ont été très faiblement sollicitées par les bioanodes. En effet, le fonctionnement de la cathode dépend fortement de celui de l'anode. Plus une anode est efficace, plus elle sollicite la cathode et ce n'est que pour des bioanodes efficaces que nous pouvons juger des limites des cathodes. Ici les anodes ne sont pas suffisamment efficaces pour tirer des conclusions pertinentes sur la qualité des cathodes. On observe toutefois que le barbotage continu du CO_2 améliore l'état de surface des cathodes qui sont moins entartrées à la fin des expériences. En effet, le CO_2 acidifie le milieu, rendant ainsi les conditions peu propices à la formation de tartre.

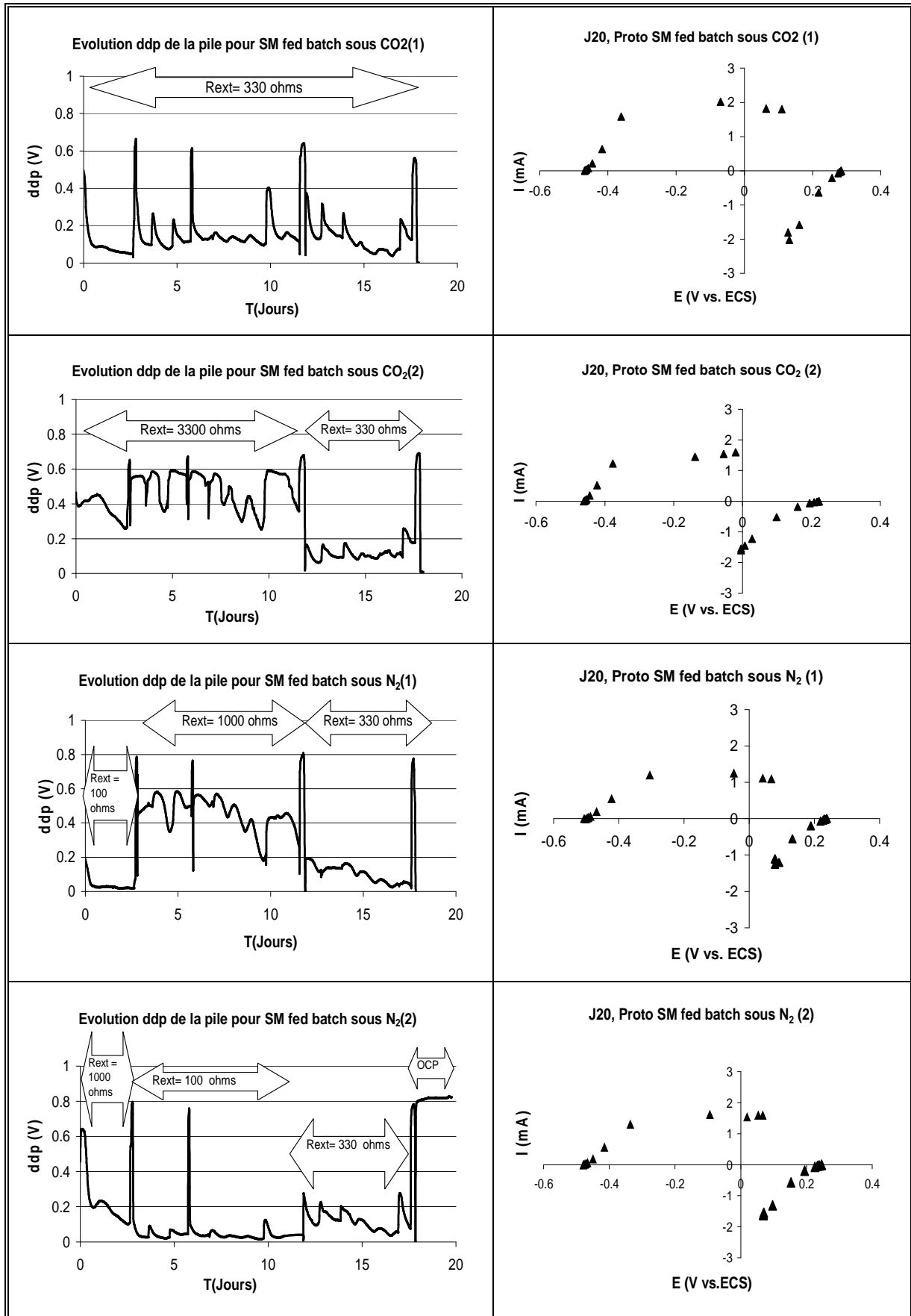


Figure 104: Evolutions au cours du temps de la différence de potentiel (ddp) des piles sous différents barbotages de gaz en fonction de la résistance externe et courbes de caractérisations des électrodes après trois semaines de fonctionnement en pile.

VI.2.5. Performance des biofilms secondaires en piles

L'intérêt du repiquage pour améliorer les biofilms EA a été démontré lors des expériences en systèmes à 3 électrodes, en alimentations batch ou continue. Cependant, tous les tests en piles présentés jusqu'à présent ont été réalisés en utilisant des biofilms primaires, pour économiser le temps nécessaire à la formation de biofilms secondaires ou tertiaires. Ce choix est justifié par le nombre important de paramètres que nous souhaitons tester dans les piles. Nous avons besoin de former des biofilms EA dans des temps courts pour être en mesure de réaliser l'ensemble des tests. Toutefois, dans les expériences précédentes, les limites des biofilms primaires sont atteintes et la comparaison des cathodes implique d'aller jusqu'aux biofilms secondaires.

VI.2.5.1. Formation des biofilms anodiques primaires et secondaires

Les expériences de formation et d'optimisation des biofilms anodiques présentées dans les chapitres précédents ont été réalisées sur des électrodes en plaque de graphite. Ce matériau avait permis d'obtenir des biofilms EA avec des densités de courant stables et élevées. De plus, nous avons observé que les réacteurs de 500 mL permettaient d'obtenir des performances légèrement améliorées par rapport aux prototypes de 100 mL (*Cf* paragraphe VI.2.3.1.). L'expérience présentée dans cette section a pour objet de produire des biofilms anodiques performants avant de les caractériser en pile. A cet effet, des duplicats de biofilms primaires et secondaires ont été formés sous alimentation batch séquentielle pendant deux semaines avec l'effluent sortie méthaniseur brut dans des réacteurs électrochimiques de 500 mL. Les biofilms primaires ont été formés sur des plaques de graphite de 10 cm². Ces biofilms ont ensuite été repiqués sur des tissus de carbone de 25 cm². Les biofilms secondaires ainsi obtenus ont été utilisés pour les études en piles. La surface d'électrode est augmentée d'un facteur 2,5 pour les biofilms secondaires dans l'objectif d'accroître les rendements faradiques dans les piles. Les Cas sont présentées *Figure 105*

Après un démarrage plus rapide, les biofilms secondaires obtenus sur tissu de carbone présentent des densités de courant reproductibles et proches de celles des biofilms primaires formés sur plaques de graphite. Ces valeurs de J_{max} sont bien cohérentes avec celles obtenues avec le même mode d'alimentation (batch séquentielle avec l'effluent brut) dans le chapitre précédent (*Figure 80*). En effet, sous barbotage continu de N₂, J_{max} variait entre 2 et 3,5 A/m². La densité de courant n'étant pas fonction de la surface de l'électrode, ces résultats montrent que les deux matériaux ont les mêmes performances. Ce résultat est en accord avec l'étude des différents matériaux avec le dispositif N-stat réalisée précédemment (*Figure 52*) qui avait indiqué des performances très proches pour les biofilms formés sur les deux matériaux dans les mêmes conditions opératoires avec l'effluent sortie méthaniseur.

Les voltammétries réalisées à 1 mV/s reflètent parfaitement l'état des différentes CA au moment où elles ont été effectuées. La densité de courant maximum atteinte avec le

biofilm secondaire (5 à 6 A/m² pour 0,0 à 0,1 V) est similaire à celle du biofilm primaire (5 à 7 A/m² pour -0,1 à +0,1 V vs ECS).

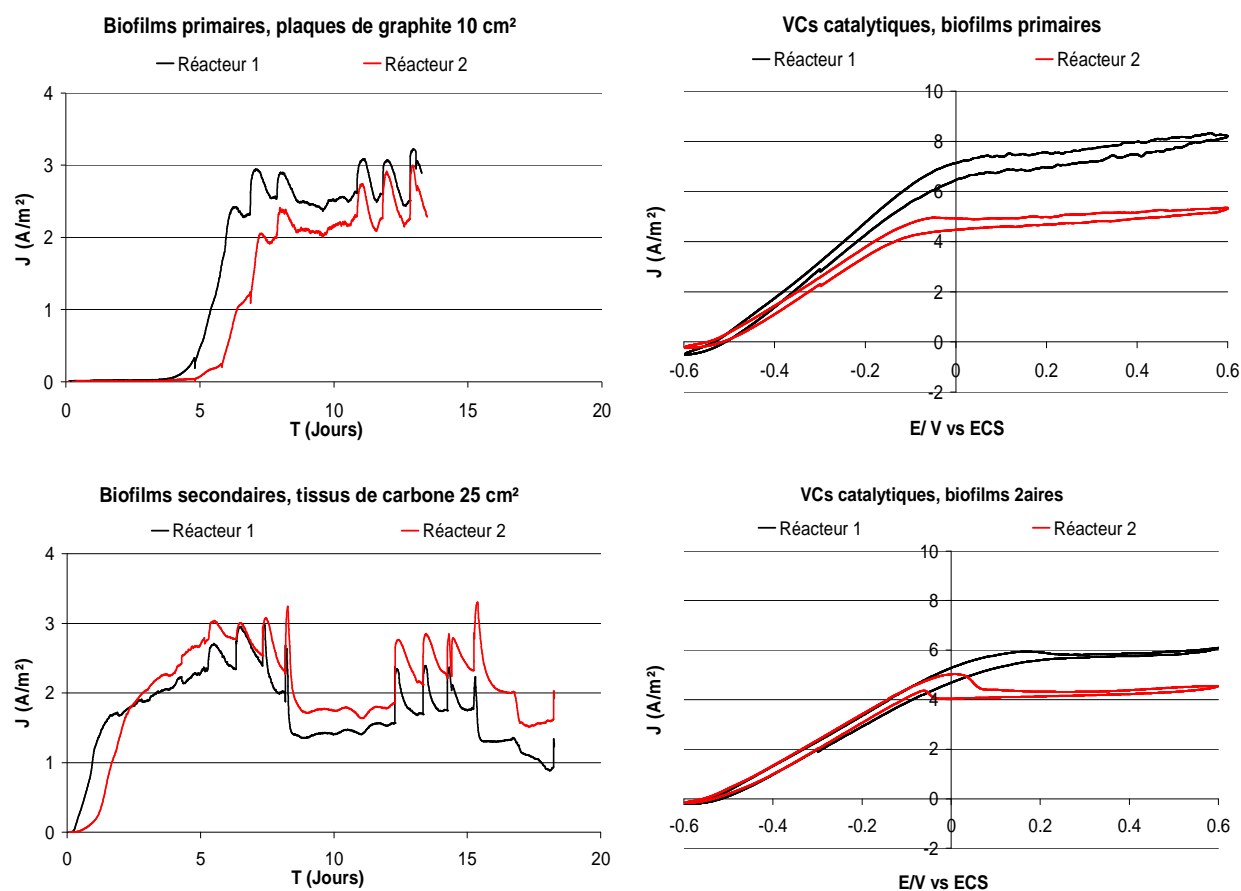


Figure 105: CAs et VCs des biofilms primaires sur plaque de graphite 10 cm² et secondaires sur tissu de carbone 25 cm² dans des réacteurs de 500 mL en alimentation batch séquentielle (TRH 48h) avec l'effluent sortie méthaniseur. Les CAs sont effectuées à -0,3V, les VCs à 1 mV/s et les réacteurs placés sous N₂ en continu.

Le **Tableau 30** qui regroupe les performances des différents biofilms permet d'observer des performances 3 à 4 fois supérieures des biofilms secondaires pour les abattements de la DCO et les rendements faradiques. Ces résultats s'expliquent en partie par les surfaces d'électrodes 2,5 fois plus importante dans le cas des biofilms secondaires, le courant global produit par ce biofilm étant donc supérieur.

| Essais | Primaires | | Secondaires | |
|--------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| | Biofilm 1 | Biofilm 1' | Biofilm 2 | Biofilm 2' |
| Matériaux, surfaces | Plaque graphite 10 cm ² | Plaque graphite 10 cm ² | Tissu carbone 25 cm ² | Tissu carbone 25 cm ² |
| DCO moyenne en entrée (g/jour) | 0,38 | 0,38 | 0,43 | 0,43 |
| Abattement de DCO moyen (± 6%) | 6 | 4 | 18 | 16 |
| Rf (± 1%) | 13 | 13 | 37 | 42 |

Tableau 30: Performances des biofilms primaires et secondaires présentés sur la **Figure 105**.

VI.2.5.2. Caractérisation en pile des biofilms secondaires

Les biofilms secondaires formés précédemment ont été mis en œuvre en pile. La **Figure 106** présente l'évolution avec le temps de la puissance obtenue avec l'un des biofilms secondaires (biofilm 2') associé à une cathode à air de type standard.

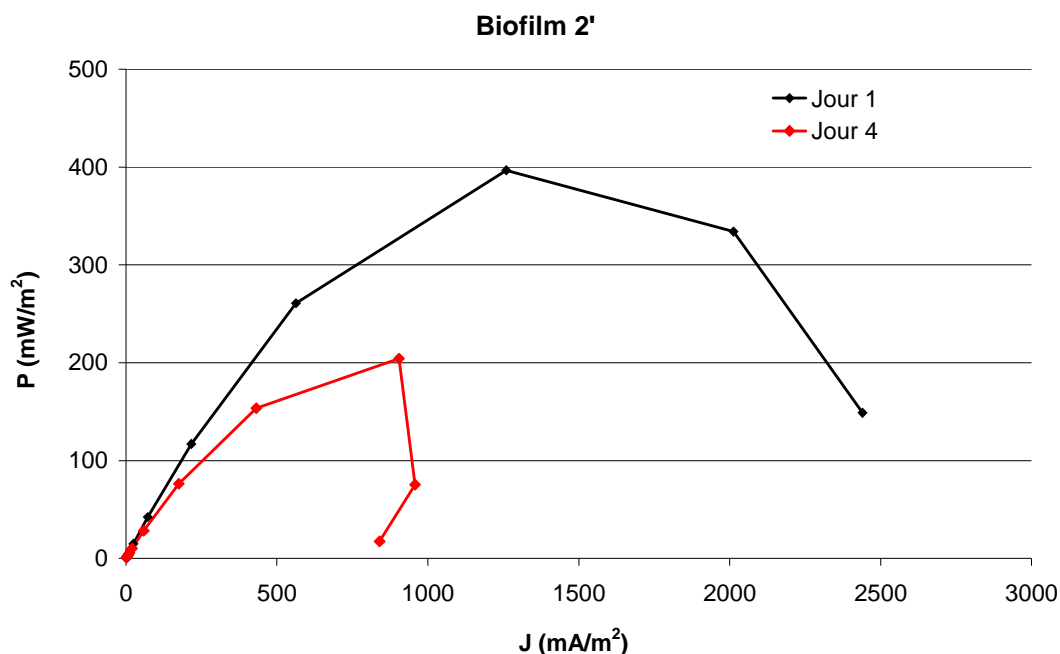


Figure 106: Courbes de puissance de la pile constituée du biofilm 2' et d'une cathode à air de type standard.

On obtient avec ce biofilm secondaire une puissance maximale de 400 mW/m², supérieure à celles obtenues avec des biofilms primaires dans les mêmes conditions expérimentales ($P_{max} = 280 \text{ mW/m}^2$) (Cf **Tableau 28**). La densité de puissance diminue néanmoins très rapidement, perdant 50% de sa valeur après seulement 4 jours d'expérience. Cette expérience confirme le fait que le repiquage des biofilms EA améliore les performances non seulement des biofilms EA (abattements de DCO et rendements faradiques) mais aussi des systèmes de piles associés (puissance maximale).

Le choix de biofilms EA pré-formés (primaires, secondaires...) pour inoculer des PACMs a déjà été réalisé par quelques auteurs dans la bibliographie. Quelle que soit la technique utilisée pour le repiquage, les différents auteurs sont arrivés aux mêmes conclusions que celles qui ont été présentées dans ce manuscrit, à savoir: un temps de latence plus court pour la formation des biofilms EA efficaces et des performances de piles (puissance, rendement faradique) améliorées. Liu *et al.* (2008) ont comparé deux biofilms EA primaires et secondaires. Le biofilm secondaire est obtenu en introduisant une électrode propre dans le réacteur contenant le biofilm primaire. A l'aide d'un système de pile à combustible à deux compartiments, les performances des deux biofilms sont testées. Les puissances passent de 686 à 1487mW/m², (Liu *et al.* 2008). Wang *et al.* (2010) utilisent un biofilm primaire récupéré d'une anode en fonctionnement qui est laissé dans un incubateur en présence d'un milieu de culture à 28°C pour ensuite inoculer une pile à combustible à deux compartiments. Les puissances obtenues sont de 192 mW/m² pour le biofilm primaire et 226 mW/m² pour le biofilm secondaire (Wang *et al.* 2010). Rabaey *et al.* (2004) ont utilisé la même procédure d'incubation d'un biofilm primaire dans un milieu de culture pendant de plus longues périodes avec des valeurs de puissance de pile beaucoup plus élevées. Pour cinq phases d'enrichissement successives qui ont duré cinq mois, la puissance de la pile a atteint 3,6 W/m² (Rabaey *et al.* 2003). Lorsque la procédure d'enrichissement a été faite 7 fois en vue d'obtenir plus de biomasse, la puissance passe de 0,6 W/m² pour le biofilm primaire à 4,31 W/m² pour le nouveau biofilm (Rabaey *et al.* 2004a).

VI.2.6. Formation des biofilms EA en système à 2 ou 3 électrodes

Le but de cette expérience est de vérifier si la formation préalable des bioanodes sous potentiel imposé dans des systèmes à 3 électrodes avant de les transférer en pile présente un réel avantage par rapport à la formation de ces bioanodes directement en pile c'est-à-dire simplement en connectant les deux électrodes au-travers d'une résistance, sans l'aide d'un potentiostat, comme le font par la plupart des chercheurs dans le domaine. Pour cela, différents biofilms ont été formés sous polarisation dans les prototypes de piles ou dans les réacteurs électrochimiques. La polarisation retardée ayant montré son intérêt dans les chapitres précédents, toutes les électrodes ont été laissées initialement en circuit ouvert pendant 5 jours. Les montages à 3 électrodes ont ensuite été polarisés à -0,3 V pendant 3 semaines, puis les bioanodes transférées dans les piles. En parallèle, des bioanodes sont formées directement dans les piles simplement en connectant l'anode et la cathode au-travers

d'une résistance de 100 ohms, ce dispositif étant dit «système à 2 électrodes» par la suite. Les réacteurs et les piles sont alimentés en continu (TRH 24h) avec l'effluent sortie méthaniseur brut.

VI.2.6.1. Biofilms formés en piles (systèmes à 2 électrodes)

Dans ce cas, les biofilms anodiques sont formés directement dans les prototypes connectés en mode piles et alimentés en continu avec l'effluent sortie méthaniseur.

VI.2.6.1.1. Biofilms primaires

Deux piles ont été montées en parallèle. Elles sont laissées 5 jours en circuit ouvert, puis les circuits sont fermés par des résistances de 100 ohms. Les évolutions des différences de potentiel sont présentées sur la *Figure 107*.

Les deux prototypes de piles SM 1 et SM 2 génèrent de très faibles tensions autour de 0,4 μ V durant les 25 jours d'expériences. Les différences de potentiel en circuit ouvert restent très faibles entre 0,3 et 0,4 V. Les abattements de DCO sont néanmoins de 32 et 42% pour les prototypes SM 1 et SM 2 respectivement. En dépit des valeurs d'abattement de DCO élevés, les biofilms colonisées sur les électrodes dans les conditions d'expérience semblent incapables d'assurer le transfert électronique aux électrodes.

Ces résultats sont assez surprenants car la majorité des auteurs dans la bibliographie utilisent ce mode de fonctionnement

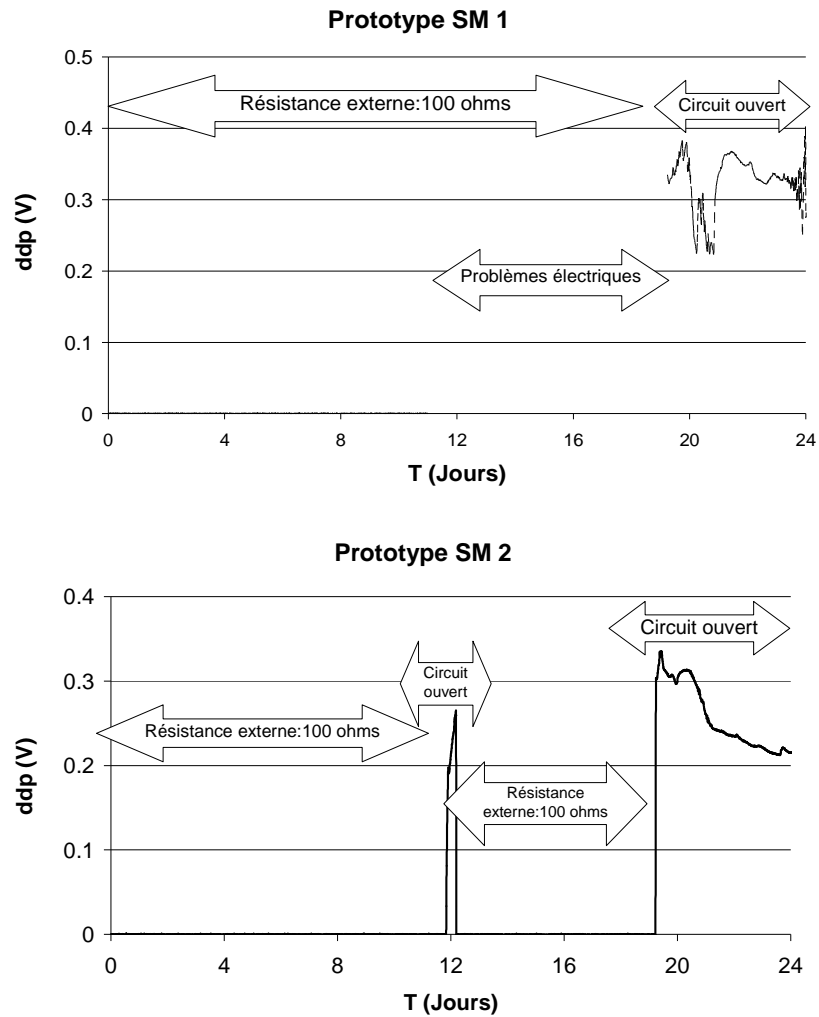


Figure 107: Evolutions avec le temps de la différence de potentiel (ddp) des piles sous une résistance externe de 100 ohms et en circuit ouvert.

VI.2.6.1.2. Biofilms secondaires

En vue d'améliorer le système précédent, et de vérifier si les conditions d'expérience n'étaient pas trop drastiques (utilisation d'un effluent brut comme inoculum et d'une résistance externe de 100 Ω trop faible), nous avons souhaité utiliser un biofilm EA primaire pour inoculer la pile, et une résistance externe du système augmentée à 330 ohms. Contrairement aux expériences de la **Figure 107** où l'inoculum est l'effluent brut, le biofilm primaire utilisé comme inoculum pour cette expérience a une efficacité prouvée puisqu'issu de l'expérience reportée sur la **Figure 106**.

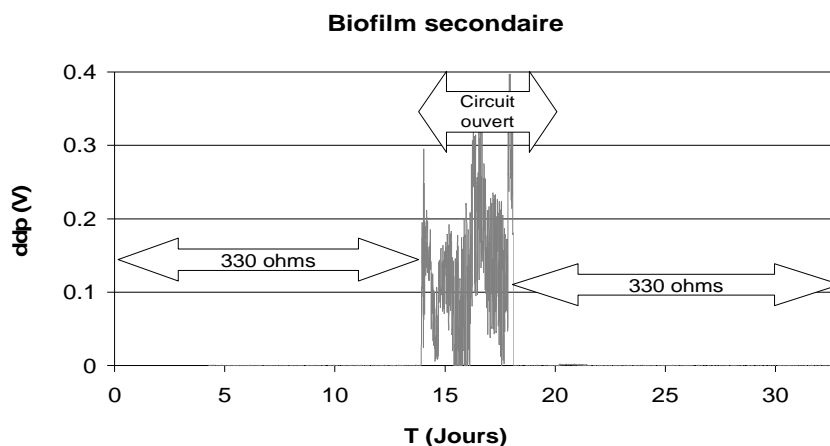


Figure 108: Evolution de la différence de potentiel en inoculant la pile avec le biofilm de la **Figure 106**; la pile est connectée à une résistance de 330 ohms.

Malgré les conditions d'expérience plus favorables à la formation d'un biofilm EA sur l'électrode, on constate que celui-ci n'arrive pas à se reconstituer d'une manière efficace lorsqu'il est repiqué directement en pile. Ces résultats justifient donc notre choix de former des biofilms anodiques sous polarisation imposée avant de les transférer en piles complètes

VI.2.6.2. Biofilms formés sous polarisation (systèmes à 3 électrodes)

Après caractérisation en pile des biofilms primaires dont le mode opératoire de formation a été présenté au paragraphe précédent, ceux-ci ont été repiqués dans les mêmes conditions expérimentales pour former des biofilms secondaires pendant 2 semaines. Les différentes bioanodes primaires et secondaires ont été connectées en piles avec une résistance externe de 100 ohms pendant 20 jours chacune. Les moyennes des résultats de caractérisation sont présentées dans le **Tableau 31**.

Les résultats obtenus confirment les performances optimales obtenues jusqu'à présent dans nos conditions expérimentales pour des piles microbiennes alimentées avec les effluents papetiers:

- ❖ densités de courant maximales (J_{max}) autour de 3 A/m^2 ,
- ❖ rendements faradiques entre 20 et 30%,
- ❖ abattements de DCO autour de 30%,
- ❖ différence de potentiel moyenne entre 0,2 et 0,3 V à 330 ohms
- ❖ puissances maximales entre 100 et 400 mW/m^2 .

| Essais | Biofilms primaires | | Biofilms secondaires | |
|---|--------------------|----------|----------------------|----------|
| | Prototype | Réacteur | Prototype | Réacteur |
| Cellules électrochimiques | | | | |
| Caractéristiques des biofilms durant les 18 jours de formation sous polarisation | | | | |
| Jmax (A/m ²) | 0,6 | 2,8 | 1,5 | 2,5 |
| Abattement de DCO moyen sous polarisation ($\pm 6\%$) | 32 | 36 | 38 | 25 |
| Rf ($\pm 1\%$) | 17 | 20 | 31 | 34 |
| Caractéristiques des piles durant 20 jours avec les biofilms formés précédemment | | | | |
| Tension de la pile (V) à 330 Ω | 0,22 | 0,15 | 0,35 | 0,25 |
| Pmax (mW/m ²) | 110 | 342 | 390 | 368 |
| Abattement de DCO moyen ($\pm 6\%$) | 40 | 30 | 57 | 54 |

Tableau 31: Performances des bioanodes primaires et secondaires formées dans les prototypes de piles (*p*) et dans les réacteurs (*r*). Elles sont ensuite caractérisées en pile avec la cathode à air de type standard. Les différentes électrodes sont des tissus de carbone de 25 cm².

On observe pour les biofilms formés dans les prototypes une amélioration notable de tous les paramètres avec le biofilm secondaire par rapport au biofilm primaire. En revanche, dans le cas des biofilms formés dans les réacteurs, la densité de courant, l'abattement de DCO moyen ainsi que la densité de puissance présentent des résultats mitigés alors que la différence de potentiel et l'abattement de la DCO de la pile sont améliorés. Nous n'avons pas d'explications à cette différence de résultats. La question reste donc ouverte pour l'amélioration future du présent travail.

Cette expérience confirme néanmoins l'importance du repiquage dans l'optimisation des performances des PACMs. On retrouve dans la littérature quelques études présentant des biofilms formés en systèmes à trois électrodes et ensuite caractérisés en piles (Liu et al. 2008; Srikanth et al. 2010)

VI.3. Comparaison des performances des deux versions des prototypes de piles

La deuxième version du prototype de la pile avait été conçue pour améliorer les performances de la première version en plusieurs points énoncés dans le cahier des charges (Cf paragraphe VI.2.). A la fin des différentes expériences réalisées avec les deux versions de prototypes, différentes conclusions peuvent être tirées.

Le premier point du cahier des charges concernait l'utilisation des grilles de Pt/Ir comme électrodes auxiliaires lors de la formation des biofilms EA au lieu des cathodes à air, comme cela était le cas dans la première version du prototype. L'objectif était de préserver les cathodes, qui coûtent assez cher, en diminuant leur temps de contact avec l'effluent. Ce point a été réalisé avec succès car des performances comparables ont été obtenues lors de la formation de différents biofilms EA avec les deux types d'électrode auxiliaire. Dans l'un ou l'autre cas, les densités de courant varient entre 1,5 et 2 A/m².

Avec le deuxième point du cahier des charges, nous souhaitons ne pas déplacer la bioanode entre la phase de formation sous polarisation et la phase de fonctionnement en pile, le compartiment contenant l'électrode auxiliaire étant simplement remplacé par une cathode à air. Nous espérons ici avoir une puissance de la pile immédiatement élevée dès le premier jour, ce qui a été le cas puisque la pile démarre à des fortes valeurs de tension et de puissance dès le premier jour de fonctionnement avec une cathode neuve.

Le troisième point concernait le rapport surface de l'électrode / volume du réacteur. Ce rapport a été maintenu dans les deux systèmes et donc les profils de résultats restent les mêmes pour les deux versions de prototypes

Le quatrième point portait sur la distance entre les deux électrodes. Elle a été passée de 4 à 1 cm avec comme objectif l'augmentation de la puissance de la pile grâce à la diminution de sa résistance interne du système (Rozendal *et al.* 2008). L'amélioration espérée n'a pas été observée. On a ainsi pu se rendre compte que la résistance interne de la solution sur laquelle agit la distance inter-électrode n'est pas une cause de limitation des performances de la pile. Les faibles valeurs de puissances observées sont justifiées par d'autres étapes limitantes en particulier celles liées aux cinétiques des deux électrodes.

En conclusion, l'amélioration majeure apportée par la deuxième version du prototype porte sur la possibilité de changer le compartiment cathodique et de diminuer ainsi le temps d'utilisation des cathodes à air.

Conclusion

Ce chapitre consacré à la conception et l'évaluation de piles microbiennes avec les effluents papetiers a permis de vérifier avec les piles complètes les conditions opératoires optimales déterminées lors de la formation de biofilms anodiques sous potentiel imposé. Quel que soit le mode d'alimentation (continu avec effluent brut ou batch avec acétate), les performances des piles se sont avérées plus stables et élevées avec les cathodes ayant une charge en platine plus importante (autour de 2 mg/cm²). Nous avons néanmoins sélectionné comme standard une cathode faiblement chargée (0,5 mg/cm² en Pt et 20% PTFE) pour rester dans les mêmes gammes que la plupart des études récentes présentées dans la bibliographie.

Dans le but d'optimiser la stabilité de la cathode en évitant l'entartrage et donc la pollution de ses sites actifs, il a été tenté de plaquer différentes membranes sur sa face interne. Les membranes anioniques et Nafion® se sont avérées totalement inadaptées pour traiter les effluents papetiers dans nos conditions d'expériences, les puissances générées par les piles étant restées négligeables après plusieurs semaines d'expérience.

La membrane de dialyse a présenté des performances acceptables mais les meilleures performances ont été obtenues avec une membrane polyoléfine ou une cathode sans membrane. La cathode avec membrane polyoléfine a été choisie comme standard car, pour des applications de longue durée, elle devrait permettre de protéger les sites actifs de la cathode et elle coûte beaucoup moins cher que la membrane de dialyse.

L'effet du maintien des conditions anaérobies dans les piles en fonction du pH a été étudié. On a observé des performances similaires pour les différentes piles malgré des pH acides maintenues par barbotage continu de CO₂ dans un cas, et des pH basiques maintenus par barbotage continu de N₂ dans l'autre. Le pH ne semble donc pas être déterminant pour les performances aussi bien lors de la formation des biofilms EA que lors de la caractérisation des piles dans les conditions d'expériences.

En plus du démarrage rapide, les biofilms secondaires ont permis d'obtenir des performances 3 à 4 fois supérieures pour les abattements de DCO et les rendements faradiques par rapport aux biofilms primaires. Les meilleures performances obtenues durant l'évaluation des piles microbiennes avec les effluents papetiers sont des densités de courant de l'ordre de 3 A/m², des rendements faradiques entre 20 et 30%, des abattements de DCO autour de 30%, une différence de potentiel moyenne entre 0,2 et 0,3 V avec une résistance de 330 ohms et des puissances entre 100 et 400 mW/m².

Le choix effectué dans ce travail de former préalablement des biofilms EA dans des conditions optimales en systèmes à 3 électrodes puis de les transférer en piles complètes semble justifié. En effet, des piles formées avec des inoculum industriels ou des biofilms primaires ont montré leur incapacité à fonctionner directement en système à 2 électrodes. Comme discuté dans le chapitre III (Cf paragraphe III.1.1.), ce mode de travail permet la

formation des biofilms dans des conditions électrochimiques optimales (Liu *et al.* 2008; Srikanth *et al.* 2010).

L'effet des nutriments sur la puissance des piles n'a pas pu être clairement établi. En effet malgré des densités de courant et les rendements faradiques plus importants avec les nutriments, les biofilms sans nutriments ont donné de meilleures performances en piles.

Pour les deux effluents de référence choisis, les puissances les plus élevées ont été obtenues de façon reproductible en alimentation continue ou batch séquentielle avec l'effluent brut pour des biofilms préalablement formés dans des systèmes à 3 électrodes. Elles sont de 294 mW/m² avec l'effluent entrée biologique et de 400 mW/m² avec l'effluent sortie méthaniseur. Ce dernier effluent a néanmoins permis d'obtenir une puissance maximale de 596 mW/m² que nous n'avons pas pu reproduire. Ces valeurs de puissance sont parmi les meilleures obtenues dans la littérature lorsqu'un effluent brut est utilisé comme substrat pour des piles avec cathode à air. Une comparaison des performances des piles exploitant des effluents industriels et domestiques a été proposée dans le chapitre I (**Tableau 3**). La puissance la plus élevée, de 933 – 971 mW/m², a été obtenue avec un mélange d'effluents urbains et d'hydrolysats de paille de maïs. La conductivité du milieu a néanmoins été augmentée à 20 mS/cm. Lorsque la conductivité n'est pas augmentée, la puissance chute à 367 – 371 mW/m² (Zuo *et al.* 2006). Avec les effluents papetiers bruts, la meilleure densité de puissance reportée est de 210 mW/m² (Huang *et al.* 2009), cette étude a donc permis un progrès d'un facteur deux par rapport aux meilleurs résultats obtenus jusqu'à présent avec le même type de combustible.

Conclusion générale et perspectives

Conclusion générale

Ces travaux de thèse ont été consacrés à la conception de piles à combustible microbiennes pour la production d'électricité couplée au traitement des effluents de l'industrie papetière. Il s'agissait de la première thèse effectuée au CTP dans le domaine de la technologie des piles à combustible microbiennes. Elle a permis de créer un savoir-faire et d'apporter un premier bilan sur cette technologie innovante. D'un point de vue général, très peu d'études ont été réalisées dans ce domaine avec les effluents papetiers bien que l'industrie papetière soit grande utilisatrice d'eau et produise des effluents en sortie d'usine très riches en matières organiques. Cette thèse a également permis de progresser dans la compréhension de divers phénomènes des PACMs liées aux effluents papetiers.

La première partie de l'étude a consisté à tester cinq environnements issus de trois sites de production papetiers différents pour leur capacité à former des biofilms EA. Les procédures testées ont permis la formation de biofilms très efficaces. En effet, dans des effluents complémentés en acétate, des densités de courant de 0,6 à 11 A/m² et des rendements faradiques dépassant parfois 90% ont été obtenus. Ces valeurs sont d'autant plus intéressantes qu'elles ont été obtenues à faibles potentiels imposés entre -0.2 et -0,4V/ECS sur des surfaces d'électrodes graphite planes. La densité de courant la plus élevée obtenue à ce jour dans la littérature est de 30.8 A/m² mais elle a été obtenue à un potentiel relativement élevé de +0,1 V vs. Ag/AgCl sur une électrode en fibre de carbone qui possède une structure tridimensionnelle et donc offre une grande surface spécifique (He *et al.* 2011). Cette première phase d'étude a montré l'importance du choix de l'inoculum, des variations d'un facteur 30 ayant été observées en fonction de la localisation de l'inoculum.

Il a été montré dans la bibliographie qu'au cours de repiquages successifs la plupart des biofilms gardent les performances du premier repiquage (Liu *et al.* 2008). Une nouvelle procédure originale a été mise en œuvre ici qui permet d'améliorer les performances des biofilms EA au-delà du deuxième repiquage. En effet, des biofilms EA progressivement acclimatés à des potentiels de plus en plus bas se sont avérés très efficaces. Des biofilms EA efficaces ont ainsi été formés à des potentiels aussi faibles que -0,4V. Une méthode innovante d'optimisation des biofilms EA est donc proposée. Elle consiste à former des biofilms primaires à potentiel élevé puis à réaliser des repiquages successifs à des potentiels de plus en plus bas. Le maintien de conditions anaérobies qui limite les réactions microbiennes compétitives a en outre permis l'amélioration des rendements faradiques.

En général, le pH optimum conseillé dans la littérature pour une bonne croissance des micro-organismes est de 7 (Gil *et al.* 2003; Jadhav et Ghangrekar 2009). Pour contrôler ce pH, la majorité des auteurs ajoutent des quantités importantes de tampons dans les milieux. Au contraire nous avons choisi de travailler dans des conditions facilement extrapolables en milieu industriel donc sans ajout significatif de solution tampon. Pour tous les effluents testés, le pH en fin d'expérience est voisin de 9,0. Malgré cette alcalinisation spontanée, nous avons

obtenu des performances des bioanodes élevées. Ce résultat a montré qu'il n'est pas nécessaire de contrôler le pH des effluents papetiers pour obtenir de bonnes performances des biofilms EA. Cette conclusion est évidemment d'un grand intérêt pour une application industrielle.

L'espèce bactérienne *Desulfuromonas acetexigens* qui n'a jamais encore été présentée dans la bibliographie avec des propriétés d'électroactivité a été identifiée ici comme une espèce dominante dans de nombreux biofilms EA. Les analyses de DGGE montrent qu'elle devient dominante au fur et à mesure des repiquages et est même parfois la seule espèce détectable dans certains biofilms tertiaires très performants. Ceci suggère fortement que cette espèce puisse être électro-active. Néanmoins, l'isolement et les tests électrochimiques de l'isolat restent nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

La deuxième partie des travaux présentée dans le chapitre IV, a permis d'optimiser plusieurs paramètres opératoires dans des conditions expérimentales encore porches de celles du laboratoire. Ainsi, à l'aide d'un dispositif N-Stat, plusieurs matériaux (plaque de graphite, tissu et papier de carbone, acier brut et acier microstructuré) et plusieurs potentiels (de 0,2 à -0,4 V) ont été comparés dans les mêmes conditions opératoires avec les deux effluents de référence sélectionnés. Il a été mis en évidence que les matériaux à base de carbone (tissu, feutre et plaque) conduisent à des résultats similaires et semblent plus appropriés que les aciers inoxydables à la formation de biofilms EA à partir des effluents papetiers. Quant à l'étude du potentiel imposé, les performances optimales des biofilms EA ont été observées pour des valeurs comprises entre -0,1 et -0,2 V/ECS. Nous avons néanmoins choisi de former les biofilms à -0,3 V/ECS car à ce potentiel les performances restaient proches des valeurs optimales et le gain de 100 mV pouvait s'avérer important dans la suite des travaux pour optimiser la puissance délivrée en pile.

Les paramètres étudiés dans ce chapitre ont permis de s'affranchir de plusieurs idées reçues glanées dans la bibliographie. Il a ainsi été démontré que :

- ❖ La stérilisation de l'effluent par filtration à 0,2 μm n'était pas nécessaire pour améliorer les performances des bioanodes lors des repiquages des biofilms EA, le repiquage dans l'effluent brut ayant permis d'obtenir de meilleures performances.

- ❖ La complémentation de l'effluent par un milieu synthétique n'améliorait pas les performances des biofilms anodiques.

- ❖ Le maintien des conditions anaérobies était plus important que le contrôle du pH pour améliorer les performances des biofilms EA, les barbotages des gaz N_2 et N_2/CO_2 ayant permis d'obtenir des performances similaires.

- ❖ La polarisation des électrodes dès le début de l'expérience n'était pas nécessaire : une pré-incubation de l'électrode dans le réacteur sans polarisation et sans conditions anaérobies

permettait un démarrage plus rapide de l'activité catalytique des biofilms lorsque l'électrode était ensuite basculée sous polarisation.

Le chapitre V éliminant l'ajout du substrat acétate a porté l'étude sur la formation de biofilms EA avec les effluents bruts comme seuls substrats. Ces expériences se rapprochent des conditions d'extrapolation pour le traitement d'effluents. Le premier résultat marquant a été de constater que pour obtenir un biofilm EA efficace avec l'effluent brut, il était impératif qu'il soit formé sans ajout d'acétate. En effet, un biofilm pré-formé en présence d'acétate devient acéto-dépendant et donc incapable de dégrader de la matière organique plus complexe contenue dans l'effluent industriel. Les deux modes d'alimentation étudiés, continue et fed batch, ont permis d'obtenir des densités de courants maximales entre 4 et 6 A/m². En alimentation continue il a été montré que la DCO résiduelle présente dans le réacteur était plus importante que le flux de DCO apporté en entrée pour contrôler les performances des biofilms EA. En effet, les performances des biofilms chutent lorsque la DCO résiduelle est inférieure à 0,4 g/L, même si le débit d'alimentation est augmenté. En revanche, la densité de courant n'augmente plus au-delà de 1 g/L, signe d'une limitation des performances des bioanodes par les métabolismes microbiens. Cette hypothèse a été renforcée par l'étude du TRH dans le réacteur: le rendement faradique a diminué de 21 à 7% pour des TRH de 48 à 6 h, alors que la densité de courant et l'abattement de la DCO sont restés constants.

Sous alimentation fed batch il est apparu que l'ajout de nutriments azotés et phosphorés dans l'effluent industriel était nécessaire pour optimiser les performances des biofilms EA. Néanmoins, une proportion 5 fois plus faible que celle utilisée lors des procédés de traitement biologique conventionnels s'est avérée suffisante. L'effet positif de la polarisation retardée a par ailleurs été confirmé par ces essais. Des taux d'abattement moyens de la DCO de l'effluent entre 20 et 50% ont été mesurés. Néanmoins, une comparaison des expériences de contrôle sans polarisation a permis d'observer des résultats semblables. Les conditions électrochimiques restrictives choisies pour cette étude, à savoir faible surface d'électrode (10 cm²) pour un grand volume d'effluent à traiter (500 mL) associées à l'occurrence de processus spontanés d'abattement de la DCO expliquent cette faible différence de performance avec et sans polarisation.

La dernière phase de la thèse a été consacrée à l'intégration des bioanodes optimales dans des piles semi-microbiennes. Le choix effectué de former préalablement les biofilms EA dans des systèmes à trois électrodes puis de les transférer en systèmes de piles complètes a été justifié. En effet, des piles inoculées directement avec des effluents industriels ou des biofilms primaires ont montré leur incapacité à fonctionner, contrairement aux bioanodes préalablement formées en systèmes à trois électrodes. Il a été choisi d'utiliser des cathodes à air faiblement chargées en catalyseur platine (0,5 mg Pt /cm²) malgré les meilleures performances observées avec des cathodes plus chargées (2 mg Pt /cm²) pour des raisons

économiques et pour rester dans les gammes rencontrées dans la bibliographie. Les effluents bruts altèrent rapidement les propriétés catalytiques des cathodes à air en provoquant l'entartrage et le biofouling de leur face interne. Pour pallier ce problème drastique il a été tenté de souder diverses membranes sur les cathodes à air. Les membranes de dialyse ou polyoléfine se sont révélées plus appropriées que les membranes anioniques ou Nafion®. Le niveau de pH n'est pas apparu comme un paramètre déterminant pour les performances des piles, comme on l'avait déjà observé pour la formation des biofilms EA. L'effet des nutriments sur les puissances des piles n'a pas pu être clairement établi, malgré les performances plus élevées qui avaient été obtenues pour la formation des biofilms EA.

L'utilisation de biofilms secondaires a permis d'améliorer légèrement les performances des piles microbiennes et de confirmer les bons résultats obtenus avec les effluents papetiers, à savoir des densités de courant de l'ordre de 3 A/m², des rendements faradiques entre 20 et 30%, des abattements de DCO autour de 30%, une différence de potentiel moyenne entre 0,2 et 0,3 V avec une résistance de 330 ohms soit des puissances dans la gamme de 100 et 400 mW/m². Pour les deux effluents de référence choisis, les puissances les plus élevées ont été obtenues en alimentation continue avec l'effluent brut avec des biofilms préalablement formés sous polarisation. Des densités de puissance jusqu'à 596 mW/m² ont été obtenues avec l'effluent collecté en sortie de méthaniseur et 294 mW/m² avec l'effluent collecté en entrée de l'unité de traitement biologique. Bien qu'elles soient parmi les performances les plus élevées reportées dans la bibliographie pour des effluents bruts, il est clair que ces performances restent insuffisantes pour envisager à court terme une extrapolation de la technologie des piles microbiennes pour traiter les effluents de l'industrie papetière.

Perspectives

En vue d'exploiter les connaissances et les savoir-faire acquis lors de ce travail de thèse et de progresser dans le domaine des PACMs pour le traitement des effluent papetiers, plusieurs voies mériteraient d'être explorées :

- ❖ Pour réduire le coût des cathodes il est essentiel de développer des catalyseurs cathodiques n'utilisant pas de métal précieux. Toujours dans le but d'éviter l'usage des métaux précieux à la cathode, la recherche de biofilms cathodiques dans les effluents papetiers amorcée dans cette étude (résultats peu concluants et non présentés) devrait être approfondie comme une piste d'intérêt pour le long terme.

- ❖ Il serait intéressant de réfléchir à l'augmentation des performances des biofilms EA en favorisant leur contribution à la dégradation de la DCO de l'effluent. Nous avons amorcé la réflexion par l'étude de l'effet du rapport surface/volume sans résultat probant. En outre l'augmentation du rapport surface/volume réalisée avec la seconde version du prototype de pile pourrait être un élément défavorable au développement des biofilms EA. Une étude

exhaustive de l'effet du rapport surface d'électrode/volume du réacteur, à la fois sur la phase de formation du biofilm sous polarisation et sur la phase d'exploitation en pile pourrait être une piste d'intérêt.

❖ Un entartrage très important des électrodes auxiliaires et des cathodes a été observé durant les alimentations continue ou batch séquentielle avec l'effluent brut. Il est évident que c'est une cause majeure de la réduction des performances des piles au cours du temps. Le maintien du pH à un plus faible niveau favoriserait la résolution de ce problème.

❖ L'isolement de la souche *Desulfuromonas acetexigens* pour confirmer son électro-activité est primordiale car elle permettrait de mettre en évidence une nouvelle souche électro-active encore non décrite dans la littérature dans le domaine des PACMs et qui donne des performances remarquables à des potentiels alcalins encore peu explorés.

❖ Enfin, lorsqu'un module individuel de pile sera maîtrisé il sera utile d'envisager la comparaison de montages des modules en série et en parallèle afin d'augmenter les performances en termes de puissance globale et de traitement de DCO. Ieropoulos *et al.* (2008) ont par exemple montré qu'un empilement de plusieurs petites piles était préférable à un élargissement d'une pile individuelle pour une amélioration de la puissance (Ieropoulos *et al.* 2008).

Les recherches effectuées dans ce travail de thèse et les perspectives que nous proposons pour les faire progresser devraient conduire à des avancées certaines dans la compréhension et l'amélioration de la technologie des PACMs, permettant d'avoir bon espoir de développer de tels systèmes au niveau industriel à moyen terme.

References Bibliographiques

REEFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**A**

- Aelterman, R K., Clauwaert, P., et Verstraete, W. (2006a). Microbial fuel cells for wastewater treatment. *Water Science and Technology*, 54 (8), 9-15.
- Aelterman, P., Rabaey, K., Pham, H. T., Boon, N., Verstraete, W. (2006b). Continuous electricity generation at high voltages and currents using stacked microbial fuel cells. *Environmental Science and Technology*, 40 (10), 3388-3394.
- Aelterman, P., Freguia, S., Keller, J., Verstraete, W. Rabaey, K. (2008). The anode potential regulates bacterial activity in microbial fuel cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 78 (3), 409-418.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215 (3), 403-410.
- Alves, A. S., Paquete, C. M., Fonseca, B. M., Louro, R. O. (2011). Exploration of the 'cytochromome' of *Desulfuromonas acetoxidans*, a marine bacterium capable of powering microbial fuel cells. *Metallomics*, 3 (4), 349.
- Aulenta, F., Tocca, L., Verdini, R., Reale, P., Majone, M. (2012). Dechlorination of trichloroethene in a continuous-flow bioelectrochemical reactor: effect of cathode potential on rate, selectivity, and electron transfer mechanisms. *Environmental Science. Technology*. 45 (19), 8444-8451.

B

- Banwart, S. A., Thornton, S., Rees, H., Lerner, D., Wilson, R., Romero-Gonzalez, M. (2007). In situ bioremediation by natural attenuation: from lab to field scale. *AIP Conference Proceedings*, 898 (1), 207-210.
- Behera, M., Partha S. J., Tanaji T. M., Ghangrekar, M. M. (2010). Rice mill wastewater treatment in microbial fuel cells fabricated using proton exchange membrane and earthen pot at different pH. *Bioelectrochemistry*, 79 (2), 228-233.
- Bellon-Fontaine, M-N. et Cerf, O. (1991). Mécanismes d'adhésion des micro-organismes aux surfaces: facteurs influant sur l'adhésion. *Cahier Scientifique et Technique, Industries alimentaires et agricoles*, 108 (1-2), 15-17.
- Bergel, A., et Féron, D. (2002). Pile à combustible utilisant des biofilms en tant que catalyseur de la réaction cathodique et/ou anodique. France, FR 02.10009, Extension Internationale 2003.

- Bergel, A., Féron, D., Mollica, A. (2005). Catalysis of oxygen reduction in PEM fuel cell by seawater biofilm. *Electrochemistry Communications* 7 (9), 900-904.
- Birry, L., Mehta, P., Jaouen, F., Dodelet, J.-P., Guiot, S.R., Tartakovsky, B. (2011). Application of iron-based cathode catalysts in a microbial fuel cell. *Electrochimica Acta*, 56 (3), 1505-1511.
- Borole, A. P., Hamilton, C. Y., Vishnivetskaya, T., Leak, D., et Andras, C. (2009). Improving power production in acetate-fed microbial fuel cells *via* enrichment of exoelectrogenic organisms in flow-through systems. *Biochemical Engineering Journal*, 48(1), 71-80.
- Busalmen, J. P., Esteve-Nuñez, A., Feliu, J. M. (2008). Whole cell electrochemistry of electricity-producing microorganisms evidence an adaptation for optimal exocellular electron transport. *Environmental. Science. Technology*. 42(7), 2445-2450.

C

- Call, D. F., Merrill, M. D., Logan, B. E. (2009). High Surface Area Stainless Steel Brushes as Cathodes in Microbial Electrolysis Cells. *Environmental Science and Technology*, 43 (6), 2179-2183.
- Cercado-Quezada, B., Delia, M-L., Bergel, A. (2010). Treatment of dairy wastes with a microbial anode formed from garden compost. *Journal of Applied Electrochemistry*, 40 (2), 225-232..
- Chae, K-J., Choi, M-J., Lee, J-W., Kim, K-Y., Kim, I. S. (2009). Effect of different substrates on the performance, bacterial diversity, and bacterial viability in microbial fuel cells. *Bioresource Technology* 100 (14), 3518-3525.
- Chang, I. S., Jang, J. K., Gil, G. C., Kim, M., Kim, H. J., Cho, B. W., Kim, B. H. (2004). Continuous determination of biochemical oxygen demand using microbial fuel cell type biosensor. *Biosensors and Bioelectronics* 19 (6), 607-613.
- Chang, I. S., Moon, H., Jang, J. K., Kim, B. H. (2005). Improvement of a microbial fuel cell performance as a BOD sensor using respiratory inhibitors. *Biosensors and Bioelectronics* 20 (9), 1856-1859.
- Chen, S., Hou, H., Harnisch, F., Patil, S.A., Carmona-Martinez, A. A., Agarwal, S., Zhang, Y., Sinha-Ray, S., Yarin, A.A., Greiner, A., Schröder, U. (2011). Electrospun and solution blown three-dimensional carbon fiber nonwovens for application as electrodes in microbial fuel cells. *Energy and Environmental Science*, 4(4), 1417-1421.
- Cheng, S., Liu, H., Logan, B. E. (2006a). Power densities using different cathode catalysts (Pt and CoTMPP) and polymer binders (nafion and PTFE) in single chamber microbial fuel cells. *Environmental Science and Technology*, 40 (1), 364-369.

- Cheng, S., Liu, H., et Logan, B. E. (2006b). Increased power generation in a continuous flow MFC with advective flow through the porous anode and reduced electrode spacing. *Environmental Science and Technology* 40 (7), 2426-2432.
- Cheng, S., et Logan, B.E. (2007). Ammonia treatment of carbon cloth anodes to enhance power generation of microbial fuel cells. *Electrochemistry Communications*, 9(3), 492-496.
- Chicurel, M. (2000). Bacterial biofilms and infections. Slimebusters. *Nature*, 408 (6810), 284-286.
- Cercado-Quezada, B., Bergel, A., Delia, M-L. (2010). Testing various food-industry wastes for electricity production in microbial fuel cell. *Bioresource Technology*, 101 (8), 2748-2754.
- Cordas, C., Tiago, G., Xavier, C., Moura, J.G. (2009). Electroactive biofilms of sulphate reducing bacteria. *Electrochimica Acta*, 54 (1), 29-34.
- Cunningham, A.B., Sharp, R. R., Hiebert, R., James, G. (2003). Subsurface biofilm barriers for the containment and remediation of contaminated groundwater *Bioremediation Journal*, 7 (3), 151-164.

D

- Davis, F., et Higson, P.J. S. (2007). Biofuel cells—Recent advances and applications. *Biosensors and Bioelectronics*, 22(7), 1224-1235.
- Davis, D. (2008), Public Library of Science
- Desjardins, E., Beaulieu, C. (2003). Identification of bacteria contaminating pulp and a paper machine in a Canadian paper mill. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30 (3), 141-145.
- Di Lorenzo, M., Scott, K., Curtis, T. P., Head, I. M. (2010). Effect of increasing anode surface area on the performance of a single chamber microbial fuel cell. *Chemical Engineering Journal*, 156 (1), 40-48.
- Donlan, M. R., Costeron, J. W. (2002). Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15 (2), 167-193.
- Du, Z., Li, H., Gu, T. (2007). A state of the art review on microbial fuel cells: A promising technology for wastewater treatment and bioenergy. *Biotechnology Advances*, 25(5), 464-482.
- Dulon, S., Parot, S., Delia, M-L., Bergel, A. (2007). Electroactive biofilms: new means for electrochemistry. *Journal of Applied Electrochemistry*, 37(1), 173-179.

- Dumas, C., Mollica, A., Féron, D., Basseguy, R., Etcheverry, L., Bergel, A. (2007). Marine microbial fuel cell: Use of stainless steel electrodes as anode and cathode materials. *Electrochimica Acta*, 53(2), 468-473.
- Dumas, C., Basseguy, R., Bergel, A. (2008a). Electrochemical activity of *Geobacter sulfurreducens* biofilms on stainless steel anodes. *Electrochimica Acta*, 53(16), 5235-5241.
- Dumas, C., Basseguy, R., Bergel, A. (2008b). Microbial electrocatalysis with *Geobacter sulfurreducens* biofilm on stainless steel cathodes. *Electrochimica Acta*, 53(5), 2494-2500.
- Dumas, C., Basseguy, R., Bergel, A. (2008c). DSA to grow electrochemically active biofilms of *Geobacter sulfurreducens*. *Electrochimica Acta*, 53(7), 3200-3209.
- Dumas, C., Mollica, A., Féron, D., Basseguy, R., Etcheverry, L., Bergel, A. (2008d). Checking graphite and stainless anodes with an experimental model of marine microbial fuel cell. *Bioresource Technology* 18 (99), 8887-8894.

E

- EG&G Technical Services, Inc. (2004). Fuel Cell Handbook. U.S. Department of Energy Office of Fossil Energy, 7^{ème} édition, 470 pages.
- Erbale, B., Bergel, A. (2009). First air-tolerant effective stainless steel microbial anode obtained from a natural marine biofilm. *Bioresource Technology* 100(1), 3302-3307.
- Erbale, B., Roncato, M-A., Achouak, W., Bergel, A. (2009). Sampling natural biofilms: A new route to build efficient microbial anodes. *Environmental Science and Technology*, 43 (9), 3194-3199.
- Erbale, B., Etcheverry, L., Bergel, A. (2011). From microbial fuel cell (MFC) to microbial electrochemical snorkel (MES): maximizing chemical oxygen demand (COD) removal from wastewater. *Biofouling* 27 (3), 319-326.

F

- Fan, Y., Hu, H., Liu, H. (2007a). Sustainable power generation in microbial fuel cells using bicarbonate buffer and proton transfer mechanisms. *Environmental Science and Technology*, 41, 8154-8158.
- Fan, Y., Hu, H., Liu, H. (2007b). Enhanced Coulombic efficiency and power density of air-cathode microbial fuel cells with an improved cell configuration. *Journal of Power*

- Sources, 171(2), 348-354.
- Fan, Y., Sharbrough, E., Liu, H. (2008). Quantification of the internal resistance distribution of microbial fuel cells. *Environmental. Science and. Technology.*, 42 (21), 8101-8107.
- Feng, Y., Wang, X., Logan, B., Lee, H. (2008). Brewery wastewater treatment using air-cathode microbial fuel cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 78(5), 873-880.
- Feng, Y., Qiao Y., Wang, X., Liu, Y., Lee, H., Ren, N. (2011). Treatment of biodiesel production wastes with simultaneous electricity generation using a single-chamber microbial fuel cell. *Bioresource Technology*, 102 (1), 411-415.
- Finkelstein, D. A., Tender, L. M., Zeikus, J. G. (2006). Effect of electrode potential on electrode-reducing microbiota. *Environmental Science and Technology*, 40(22), 6990-6995.
- Finster, K., Bak, F., Pfennig, N (1994). *Desulfuromonas acetexigens* sp. nov., a dissimilatory sulfur-reducing eubacterium from anoxic freshwater sediments. *Archives of Microbiology*, 161, 328-332.
- Flemming, H-C., Wingender, J., Moritz, R., Borchard, W., Mayer, C. (2000). Physico-chemical properties of biofilms - A short review. Chapitre du livre: Biofilms in the aquatic environment, éditeurs: Keevil, C.w.; Dow, C.; Godfree, A.; Holt, D., Cambridge Royal Society of Chemistry, 19-34.
- Flynn, J. M., Ross, D. E., Hunt, K. A. Bond, D. R., Gralnick, J. A. Enabling unbalanced fermentations by using engineered electrode-interfaced bacteria. *American society for microbiology*, 1(5).
- Fornero, J.J., Rosenbaum, M. Angenent, L.T. (2010). Electric power generation from municipal, food, and animal wastewaters using microbial fuel cells. *Electroanalysis*, 22 (7), 832-843.
- Franks, A. E., et Nevin, K. P. (2010). Microbial fuel cells, A current review. *Energies*, 3(5), 899-919.
- Freguia, S., Teh, E. H., Boon, N., Leung, K. M. Keller, J., Rabaey, K. (2010). Microbial fuel cells operating on mixed fatty acids. *Bioresource Technology*, 101(4), 1233-1238.
- Fricke, K., Harnisch, F., Schroder, U. (2008). On the use of cyclic voltammetry for the study of anodic electron transfer in microbial fuel cells. *Energy and Environmental Science* 1(1), 144-147.
- Friedman, E. S., Rosenbaum, M. A., Lee, A. W. Lipson, D. A., Land, B. R., Angenent, L. T. (2012). A cost-effective and field-ready potentiostat that poises subsurface electrodes to monitor bacterial respiration. *Biosensors and Bioelectronics*, 32(1), 309-313.

G

- Gil, G.C., Chang, I.S. Kim, B.H., Kim, M., Jang, J.K., Park, H.S., Kim, H.J. (2003). Operational parameters affecting the performance of a mediator-less microbial fuel cell. *Biosensors and Bioelectronics*, 18(4), 327-334.
- Gorby, Y. A., Yanina, S., McLean, J. S., Rosso, K. M., Moyles, D., Dohnalkova, A., Beveridge, T. J., Chang, I. S., Kim, B. H., Kim, K. S., Culley, D. E., Reed, S.B., Romine, M. F., Saffarini, D. A., Hill, E. A. Shi, L., Elias, D. A., Kennedy, D.W., Pinchuk, G., Watanabe, K., Ishii, S., Logan, B., Nealson, K. H., Fredrickso, J. K.(2006). Electrically conductive bacterial nanowires produced by *Shewanella oneidensis* strain MR-1 and other microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(30), 11358-11363.

H

- Haichar, F., Marol, C. Berge, O. Rangel-Castro, J I. Prosser, J. I., Balesdent, J. Heulin, T. et Achouak, W. (2008). Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. *ISME J*, 2(12), 1221-1230.
- Han, J-L., Liu, Y., Chang, C-T., Chen, B-Y, Chen, W-M, Xu, H-Zg. (2011). Exploring characteristics of bioelectricity generation and dye decolorization of mixed and pure bacterial cultures from wine-bearing wastewater treatment. *Biodegradation*, 22 (2), 321-333.
- Haoyu, E., Cheng, S., Scott, K., Logan, B. (2008). Microbial fuel cell performance with non-Pt cathode catalysts. *Journal of Power Sources*, 171(2), 275-281.
- Harnisch, F., et Freguia, S. (2012). A Basic tutorial on cyclic voltammetry for the investigation of electroactive microbial biofilms. *Chemistry - An Asian Journal*, 7(3), 466-475.
- Harnisch, F., Koch, C., Patil, S. A., Hübschmann, T., Müller, S., Schröder, U. (2011). Revealing the electrochemically driven selection in natural community derived microbial biofilms using flow-cytometry. *Energy and Environmental Science*, 4(4), 1265-1267.
- Hays, S., Zhang, F., Logan, B. (2011). Performance of two different types of anodes in membrane electrode assembly microbial fuel cells for power generation from domestic wastewater. *Journal of Power Sources*, 196(20), 8293-8300.
- He, Z., Minteer, S. D., Angenent, L. T. (2005). Electricity generation from artificial wastewater using an upflow microbial fuel cell. *Environmental Science and*

- Technology, 39(14), 5262-5267.
- He, Z., et Angenent, L.T. (2006). Application of bacterial biocathodes in microbial fuel cells. *Electroanalysis*, 18(19), 2009-2015.
- He, Z., Wagner, N., Minteer, S. D., Angenent, L. T. (2006). An upflow microbial fuel cell with an interior cathode: assessment of the internal resistance by impedance spectroscopy. *Environmental Science and Technology*, 40(17), 5212-5217.
- He, Z., Huang, Y. Manohar, A. K., Mansfeld, F. (2008). Effect of electrolyte pH on the rate of the anodic and cathodic reactions in an air-cathode microbial fuel cell. *Bioelectrochemistry*, 74(1), 78-82.
- He, G., Gu, Y., He, S., Schröder, U. Chen, S., Hou, H. (2011). Effect of fiber diameter on the behavior of biofilm and anodic performance of fiber electrodes in microbial fuel cells. *Bioresource Technology*, 102(22), 10763-10766.
- Heilmann, J., Logan, B. E. (2006). Production of electricity from proteins using a microbial fuel cell. *Water Environment Research*, 78(5), 531-537.
- Hernandez, M.E. et Newman, D.K. (2001). Extracellular electron transfer. *Cellular and Molecular Life Science*, 58(11), 1562- 1571.
- Hong, S. W., Chang, I. S., Choi, Y.S., Chung, T. H. (2009). Experimental evaluation of influential factors for electricity harvesting from sediment using microbial fuel cell. *Bioresource Technology*, 100(12), 3029-3035.
- Hottinen, T., Himanen, O., Lund, P. (2004). Effect of cathode structure on planar free-breathing PEMFC. *Journal of Power Sources*, 138(1), 205-210.
- Huang, L., et Angelidaki, I. (2008). Effect of humic acids on electricity generation integrated with xylose degradation in microbial fuel cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 100(3), 413-422.
- Huang, L., Cheng, S., Rezaei, F., Logan, B. (2009). Reducing organic loads in wastewater effluents from paper recycling plants using microbial fuel cells. *Environmental Technology*, 30(5), 499-504.
- Huang, L, Logan, B. (2008a). Electricity production from xylose in fed-batch and continuous-flow microbial fuel cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80(4), 655-664.
- Huang, L, Logan, B. (2008b). Electricity generation and treatment of paper recycling wastewater using a microbial fuel cell. *Applied Microbiology and Biotechnology* 80, (2), 349-355.
- Huang, L., Yang, X., Quan, X., Chen, J., Yang, F. (2010). A microbial fuel cell-electro-oxidation system for coking wastewater treatment and bioelectricity generation. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 85(5), 621-627.

I

Ieropoulos, I., Greenman, J., Melhuish, C. (2008) Microbial fuel cells based on carbon veil electrodes: stack configuration and scalability. *International Journal of Energy Research*, 32 (13), 1228-1240.

J

jadhav, G. S., et Ghangrekar, M. M. (2009). Performance of microbial fuel cell subjected to variation in pH, temperature, external load and substrate concentration. *Bioresource Technology*, 100(2), 717-723.

Jiang, D., Li, B., Jia, W., Lei, Y. (2010). Effect of inoculum types on bacterial adhesion and power production in microbial fuel cells. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160(1), 182-196.

Jiang, D, Curtis, M., Troop, E., Scheible, K., McGrath, J. Hu, B., Suib, S. Raymond, D., Li, B. (2011). A pilot-scale study on utilizing multi-anode/cathode microbial fuel cells (MAC MFCs) to enhance the power production in wastewater treatment. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36 (1), 876-884.

Jong, B.C., Liew, P.W.Y., Juri, M. Lebai., Kim, B.H., Mohd Dzomir, A.Z., Leo, K.W., Awang, M.R. (2012). Performance and microbial diversity of palm oil mill effluent microbial fuel cell. *Letters in Applied Microbiology*, 53(6), 660-667.

K

Karube, I., Matsunaga, T., Tsuru, S., Suzuki, S. (1977). Biochemical fuel cell utilizing immobilized cells of clostridium butyricum. *Biotechnology and Bioengineering*, 19, (11), 1727-1733.

Kassongo, J., Togo, C. A. (2011). Evaluation of full-strength paper mill effluent for electricity generation in mediator-less microbial fuel cells. *African Journal of Biotechnology*, 10 (69), 15564-15570.

Kim, H.J, Hyun, M.S., Chang, I.S. Kim, B.H. (1999). A microbial fuel cell type lactate biosensor using a metal-reducing bacterium, *Shewanella putrefaciens*. *Journal of Microbiological Technology*, 9, 365-367.

Kim, J. R., Min, B., Logan, B. E. (2005). Evaluation of procedures to acclimate a microbial fuel cell for electricity production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68(1),

23-30.

- Kim, B. H., Chang, I. S., Gadd, G. M. (2007). Challenges in microbial fuel cell development and operation. *Applied microbiology and biotechnology*, 76 (3), 485-494.
- Kim, J. R., Cheng, S., Oh, S-E., Logan, B. E. (2012). Power generation using different cation, anion, and ultrafiltration membranes in microbial fuel cells. *Environmental. Science and. Technology*, 41(3), 1004-1009.
- Kolari, M., Nuutinen, J., Salkinoja-Salonen, M.S. (2001). Mechanisms of biofilm formation in paper machine by *Bacillus* species: The role of *Deinococcus geothermalis*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 27(6), 343-351.
- Kolari, M., Nuutinen, J., Rainey, F. A., Salkinoja-Salonen, M. S. (2003). Colored moderately thermophilic bacteria in paper-machine biofilms. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30(4), 225-238.
- Kumlanghan, A., Liu, J., Thavarungkul, P., Kanatharana, P., Mattiasson, B. (2007). Microbial fuel cell-based biosensor for fast analysis of biodegradable organic matter. *Biosensors and Bioelectronics*, 22(12), 2939-2944.

L

- Larminie, J., et Dicks, Aw. (2003). Fuel cell systems explained. deuxième édition. John Wiley & Sons, Ltd.
- Laspidou, C. S., Rittmann, B. E. (2002). A unified theory for extracellular polymeric substances, soluble microbial products, and active and inert biomass. *Water Research* 36(11), 2711-2720.
- Lee, H-S., Parameswaran, P. Kato-Marcus, A., Torres, C. I., Rittmann, B. E. (2008). Evaluation of energy-conversion efficiencies in microbial fuel cells (MFCs) utilizing fermentable and non-fermentable substrates. *Water Research*, 42(6), 1501-1510.
- Lefebvre, O., Ooi, W. K., Tang, Z., Abdullah-Al-Mamun, Md., Chua, D. H.C., Ng, H.Y. (2009). Optimization of a Pt-free cathode suitable for practical applications of microbial fuel cells. *Bioresource Technology*, 100(20), 4907-4910.
- Lefebvre, O., Uzabiaga, A., Chang, I.S. Kim, B.-H., Ng, H. Y. (2011). Microbial fuel cells for energy self-sufficient domestic wastewater treatment—a review and discussion from energetic consideration. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89(2), 259-270.
- Lewis, K. (1966). Symposium on bioelectrochemistry of microorganisms IV. Biochemical fuel cells. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 30(1), 101-113.
- Li, B., et Jiang, D. (2009). Granular activated carbon single-chamber microbial fuel cells (GAC-SCMFCs): A design suitable for large-scale wastewater treatment processes.

- Biochemical Engineering Journal, 47(1), 31-37.
- Li, F., Sharma, Y., Lei, Y., Li, B., Zhou, Q. (2010). Microbial fuel cells: The effects of configurations, electrolyte solutions, and electrode materials on power generation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160(1), 168-181.
- Li, X., Hu, B.; n Suib, S. Lei, Y., Li, B. (2011). Electricity generation in continuous flow microbial fuel cells (MFCs) with manganese dioxide (MnO₂) cathodes. *Biochemical Engineering Journal*, 54(1), 10-15.
- Li, Z., Yao, L., Kong, L., Liu, H. (2007). Electricity generation using a baffled microbial fuel cell convenient for stacking. *Bioresource Technology*, 99(6), 1650-1655.
- Liu, H., Cheng, S., Logan, B. (2005a). Production of electricity from acetate or butyrate using a single-chamber microbial fuel cell. *Environmental. Science and. Technology*, 39(2), 658-662.
- Liu, H., Logan, B. E. (2004). Electricity generation using an air-cathode single chamber microbial fuel cell in the presence and absence of a proton exchange membrane. *Environmental Science and Technology*, 38(14), 4040-4046.
- Liu, H., Ramanathan, R., Logan, B. (2004). Production of electricity during wastewater treatment using a single chamber microbial fuel cell. *Environmental Science and Technology*, 38(7), 2281-2285.
- Liu, H., Grot, S., Logan, B. E. (2005). Electrochemically assisted microbial production of hydrogen from acetate. *Environmental Science and Technology*, 39 (11), 4317-4320.
- Liu, Y., Harnisch, F., Fricke, K., Sietmann, R., Schröder, U. (2008). Improvement of the anodic bioelectrocatalytic activity of mixed culture biofilms by a simple consecutive electrochemical selection procedure. *Biosensors and Bioelectronics*, 24(4), 1006-1011.
- Liu, Y., Harnisch, F., Fricke, K. Schröder, U., Climent, V., Feliu, J. M. (2010). The study of electrochemically active microbial biofilms on different carbon-based anode materials in microbial fuel cells. *Biosensors and Bioelectronics*, 25(9), 2167-2171.
- Logan, B. E., Hamelers, B., Rozendal, R., Schroder, U., Keller, J., Freguia, S., Aelterman, P., Verstraete, W., Rabaey, K. (2006). *Microbial Fuel Cells: Methodology and Technology*. *Environmental Science and. Technology*, 40(17), 5181-5192.
- Logan, B. E., Regan, J. M. (2006a). *Microbial Fuel Cells—Challenges and Applications*. *Environmental Science and Technology*, 40(17), 5172-5180.
- Logan, B. E., Regan, J. M. (2006b). Electricity-producing bacterial communities in microbial fuel cells. *Trends in Microbiology*, 14 (12), 512-518.
- Logan, B., Cheng, S., Watson, V., Estadt, G. (2007). Graphite fiber brush anodes for increased power production in air-cathode microbial fuel cells. *Environmental Science and Technology*, 41(9), 3341-3346.

- Logan, B. (2009). Exoelectrogenic bacteria that power microbial fuel cells. *Nature Reviews*, 7, 375-381.
- Logan, B. E. (2010). Scaling up microbial fuel cells and other bioelectrochemical systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(6), 1665-1671.
- Lovley, (1991). Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction. *Microbiological Reviews* 55(2), 259 -287.
- Lovley, D R. (2006a). Bug juice: harvesting electricity with microorganisms. *Nature Reviews*, 4, 497-508.
- Lovley, D R. (2006b). Microbial fuel cells: novel microbial physiologies and engineering approaches. *Current Opinion in Biotechnology*, 17 (3), 327-332.
- Lovley, D R. (2008). The microbe electric: Conversion of organic matter to electricity. *Current Opinion in Biotechnology*, 19(6), 564-571.
- Lu, N., Zhou, S-G., Zhuang, L., Zhang, J-T., Ni, J-R. (2009). Electricity generation from starch processing wastewater using microbial fuel cell technology. *Biochemical Engineering Journal*, 43(3), 246-251.
- Lu, A., Li, Y., Jin, S., Ding, H., Zeng, C., Wang, X., Wang, C. (2011). Microbial fuel cell equipped with a photocatalytic rutile-coated cathode. *Energy and Fuels*, 25 (3), 1334-1334.

M

- Mahmoud, M., Gad-Allah, T. A., El-Khatib, K. M., El-Gohary, F. (2011). Power generation using spinel manganese-cobalt oxide as a cathode catalyst for microbial fuel cell applications. *Bioresource Technology*, 102 (22), 10459-10464.
- Mainka, J. (2011). Impédance locale dans une pile à membrane H₂/air (PEMFC) Etudes théoriques et expérimentales. Thèse, Université Henri Poincaré - Nancy 1.
- Manohar, A. K., Bretschger, O., Neelson, K. H., Mansfeld, F. (2008). The polarization behavior of the anode in a microbial fuel cell. *Electrochimica Acta*, 53(9), 3508-3513.
- Marsili, E., Rollefson, J. B., Baron, D. B., Hozalski, R. M., Bond, D. R. (2008). Microbial biofilm voltammetry: Direct electrochemical characterization of catalytic electrode-attached biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(23), 7329-7337.
- Marsili, E., Sun, J., Bond, D. R. (2010). Voltammetry and growth physiology of *Geobacter sulfurreducens* biofilms as a function of growth stage and imposed electrode potential. *Electroanalysis*, 22(7), 865-874.
- Mathuriya, A. S. et Sharma, V N. (2009a). Bioelectricity production from various

- wastewaters through microbial fuel cell technology. *Journal of Biochemical Technology*, 2(1) 133-137.
- Mathuriya, A. S., Sharma, V N. (2009b). Bioelectricity production from paper industry waste using a microbial fuel cell by *Clostridium* species. *Journal of Biochemical Technology*, 1(2), 49-52.
- Miachon, S. (1995). Développement d'une pile à combustible hydrogène / oxygène à électrolyte polymère solide de 100 cm² à hydratation interne. Thèse de l'Université Joseph Fourier - Grenoble I.
- Min, B., Logan, B. E. (2004). Continuous electricity generation from domestic wastewater and organic substrates in a flat plate microbial fuel cell. *Environmental Science and Technology*, 38(1), 5809-5814.
- Min, B., Cheng, S., Logan, B. E. (2005a). Electricity generation using membrane and salt bridge microbial fuel cells. *Water Research*, 39(9), 1675-1686.
- Min, B., Kim, J., Oh, S., Regan, J. M., Logan, B. E. (2005b). Electricity generation from swine wastewater using microbial fuel cells. *Water Research*, 39(20), 4961-4968.
- Mohan, Y., S. Kumar, M. M., Das. D. (2008). Electricity generation using microbial fuel cells. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(1), 423-426.
- Morris, J., Jin, S., Wang, J., Zhu, C., Urynowicz M. (2007). Lead dioxide as an alternative catalyst to platinum in microbial fuel cells. *Electrochemistry Communications*, 9(7), 1730-1734.
- Muyzer, G, De Waal E C, Uitterlinden, A G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(3), 695 -700.

N

- Nevin, K.P., Richter, H, Covalla, S.F, Johnson, J.P., Woodard, T., Orloff, A.L., Jia, H., Zhang, M., Lovley, D.R. (2008). Power output and columbic efficiencies from biofilms of *Geobacter sulfurreducens* comparable to mixed community microbial fuel cells. *Environmental Microbiology*, 10(10), 2505-2514.
- Nevin, K. P., Kim, B.-C., Glaven, R. H., Johnson, J. P., Woodard, T. L., Methé, B. A., DiDonato Jr., R. J. Covalla SF, Franks AE, Liu A, Lovley DR. (2009). Anode biofilm transcriptomics reveals outer surface components essential for high density current production in *Geobacter sulfurreducens* fuel cells. *PloS ONE*, 4(5), e5628.
- Nguyen, T. A., Lu, Y. Yang, X., Shi, X. (2007). Carbon and steel surfaces modified by

Leptothrix discophora SP-6: Characterization and implications. *Environmental Science and Technology*, 41(23), 7987-7996.

Niessen, J., Schröder, U., Scholz, F. (2004). Exploiting complex carbohydrates for microbial electricity generation – a bacterial fuel cell operating on starch. *Electrochemistry Communications*, 6(9), 955-958.

O

Oh, S. E. et Logan, B. E. (2005). Hydrogen and electricity production from a food processing wastewater using fermentation and microbial fuel cell technologies. *Water Research* 39(19), 4673-4682.

Oh, S. E., Kim, J. R., Joo, J.-H, Logan, B. E. (2009). Effect of applied voltages and dissolved oxygen on sustained power generation by microbial fuel cells. *Water Science and Technology*, 60(5), 1311-1317.

Oh, S.T., Kim, J.R., Premier, G. C., Lee, T. H., Kim, C., Sloan, W.T. (2010). Sustainable wastewater treatment: How might microbial fuel cells contribute. *Biotechnology Advances*, 28, 871–881.

P

Pant, D., Van Bogaert, Diels, G. L., Vanbroekhoven, K. (2009). A review of the substrates used in microbial fuel cells (MFCs) for sustainable energy production. *Bioresource Technology*. 101 (6), 1533–1543.

Parameswaran, P., Zhang, H. Torres, C. I, Rittmann, B. E Krajmalnik-Brown R. (2010). Microbial community structure in a biofilm anode fed with a fermentable substrate: the significance of hydrogen scavengers. *Biotechnology and Bioengineering* 105(1), 69-78.

Park, D. H., Laivenieks, M., Guettler, M. V., Jain, M. K., Zeikus, J. G. (1999). Microbial utilization of electrically reduced neutral red as the sole electron donor for growth and metabolite production. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(7), 2912 -2917.

Park, D. H., Zeikus. G. J. (2000). Electricity generation in microbial fuel cells using neutral red as an electronophore. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(4) 1292 - 1297.

Park, D. H., Zeikus. G. J. (2003). Improved fuel cell and electrode designs for producing electricity from microbial degradation. *Biotechnology and Bioengineering*, 81(3), 348-355.

- Park, H. I., Kim, D. K. Choi, Y.-J., Pak, D. (2005). Nitrate reduction using an electrode as direct electron donor in a biofilm-electrode reactor. *Process Biochemistry*, 40(10), 3383-3388.
- Parot, S., Délia, M.-L., Bergel, A. (2008). Forming electrochemically active biofilms from garden compost under chronoamperometry. *Bioresource Technology*, 99(11), 4809-4816.
- Parot, S., Vandecandelaere, I., Cournet, A., Délia, M.-L., Vandamme, P., Bergé, M., Roques, C., Bergel, A. (2011). Catalysis of the electrochemical reduction of oxygen by bacteria isolated from electro-active biofilms formed in seawater. *Bioresource Technology* 102(1), 304-311.
- Patching, J. W., Fleming, G. T. A. (2003). *Industrial biofilms: formation, problems and control*. Editeurs: Piet Lens, Anthony P. Moran, Therese Mahony, Paul Stoodley and Vincent O'flaherty, 590 pages.
- Patil, S. A., Surakasi, V. P., Koul, S., Ijmulwar, S., Vivek, A., Shouche, Y.S., Kapadnis, B.P. (2009). Electricity generation using chocolate industry wastewater and its treatment in activated sludge based microbial fuel cell and analysis of developed microbial community in the anode chamber. *Bioresource Technology* 100(21), 5132-5139.
- Patil, V.D., Patil, D.B., Deshmukh, M.B., Pawar, S.H. (2011a). Comparative study of bioelectricity generation along with the treatment of different sources of wastewater. *International Journal of Chemical Sciences and Applications* 2(2), 162-168.
- Patil, S. A., Harnisch, F., Koch, C., Hübschmann, T., Fetzer, I., Carmona-Martínez, A. A., Müller, S., Schröder U. (2011b). Electroactive mixed culture derived biofilms in microbial bioelectrochemical systems: the role of pH on biofilm formation, performance and composition. *Bioresource Technology* 102(20), 9683-9690. doi:10.1016/j.biortech.2011.07.087.
- Peng, L., You, S.J., Wang, J. (2010) Electrode potential regulates cytochrome accumulation on *Shewanella oneidensis* cell surface and the consequence to bioelectrocatalytic current generation. *Biosensors Bioelectronics* 25 (11), 2530-2533.
- Pham, T. H., Rabaey, K., Aelterman, P., Clauwaert, P., De Schampelaire, L., Boon, N., Verstraete, W. (2006). Microbial fuel cells in relation to conventional anaerobic digestion technology. *Engineering in Life Sciences*, 6(3), 285-292.
- Pham, T. H., Aelterman, P., Verstraete, W. (2009). Bioanode performance in bioelectrochemical systems: Recent improvements and prospects. *Trends in Biotechnology*, 27(3), 168-178.
- Pocaznoi, D., Erable, B., Delia, M.-L., Bergel, A. (2012a). Ultra microelectrodes increase the current density provided by electroactive biofilms by improving their electron transport ability. *Energy and Environmental Science*, 5(1), 5287-5296.

- Pocaznoi, D., Erable, B., Etchevery, L., Delia, M-L., Bergel, A. (2012b). Forming microbial anodes under delayed polarisation modifies the electron transfer network and decreases the polarisation time required. *Bioresource Technology*, 114, 334-341.
- Potter, M.C. (1911). Electrical effects accompanying the decomposition of organic compounds. *Proceedings of the Royal Society of London*. 91(632), 260-276.
- Puig, S., Serra, M. Coma, M. Cabré, M., Balaguer, M. D., Colprim, J. (2010). Effect of pH on nutrient dynamics and electricity production using microbial fuel cells. *Bioresource Technology*, 101, 9594-9599.
- Puig, S., Serra, M. Vilar-Sanz, A., Cabré, M., Bañeras, L., Colprim, J., Balaguer, M. D. (2011). Autotrophic nitrite removal in the cathode of microbial fuel cells. *Bioresource Technology* 102(6), 4462-4467.

Q

- Qiao, Y., Li, C. M., Shu-Juan, B., Qiao-Liang, B. (2007). Carbon nanotube/polyaniline composite as anode material for microbial fuel cells. *Journal of Power Sources*, 170(1), 79-84.
- Qiao, Y., Li, C. M., Shu-Juan, B., Lu, Z-S., Li, C. M., Cui, X-Q., Guo, J. (2008). Nanostructured polyaniline/titanium dioxide composite anode for microbial fuel cells. *ACS nano*, 2(1), 113-119.

R

- Rabaey, K., Lissens, G., Siciliano, S. D., Verstraete, W. (2003). A microbial fuel cell capable of converting glucose to electricity at high rate and efficiency. *Biotechnology Letters* 25(18), 1531-1535.
- Rabaey, K., Boon, N. Siciliano, S. D., Verhaege, M., Verstraete, W. (2004). Biofuel cells select for microbial consortia that self-mediate electron transfer. *Applied Environmental Microbiology*, 70(9), 5376-5382.
- Rabaey, K., Clauwaert, P., Aelterman, P., Verstraete, W. (2005). Tubular microbial fuel cells for efficient electricity generation. *Environmental Science and Technology* 39(20), 8077-8082.
- Rabaey, K., Verstraete, W. (2005). Microbial fuel cells: novel biotechnology for energy generation. *Trends in Biotechnology*, 23(6), 291-298.

- Rabaey, K., Van de Sompel, K., Maignien, L., Boon, N., Aelterman, P., Clauwaert, P. De Schamphelaire, L. Pham, H. T., Vermeulen, J., Verhaege, M., Lens, P., Verstraet, W. (2006). Microbial fuel cells for sulfide removal. *Environmental Science and Technology*, 40(17), 5218-5224.
- Rabaey, K., Bützer, S. Brown, S. Keller, J., Rozendal, R. A. (2010). High current generation coupled to caustic production using a lamellar bioelectrochemical system. *Environmental Science and Technology*. 44(1), 4315-4321.
- Reguera, G., McCarthy, K. D., Mehta, T., Nicoll, J. S., Tuominen, M. T., Lovley D. R. (2005). Extracellular electron transfer *via* microbial nanowires. *Nature* 435(7045), 1098-1101.
- Reguera, G., Nevin, K. Nicoll, J., Covalla, S. Woodard, T., Lovley, D. (2006). Biofilm and nanowire production leads to increased current in *Geobacter sulfurreducens* fuel Cells. *Applied Environmental Microbiology*. 72(11), 7345-7348.
- Reimers, C. E., Tender, L. M., Fertig, S., Wang, W. (2001). Harvesting energy from the marine sediment–water interface. *Environmental Science and Technology*, 35(1), 192-195.
- Rhoads, A., Beyenal, H., Lewandowski, Z. (2005). Microbial fuel cell using anaerobic respiration as an anodic reaction and biomineralized manganese as a cathodic reactant. *Environmental Science and Technology*, 39(12), 4666-4671.
- Richter, H., Lanthier, M., Nevin, K. P., Lovley, D. R. (2007). Lack of electricity production by *Pelobacter carbinolicus* indicates that the capacity for Fe(III) oxide reduction does not necessarily confer electron transfer ability to fuel cell anodes. *Applied Environmental Microbiology*, 73(16), 5347-5353.
- Richter, H., Nevin, K. P., Jia, H., Lowy, D. A., Lovley, D. R., Tender, L. M. (2009). Cyclic voltammetry of biofilms of wild type and mutant *Geobacter sulfurreducens* on fuel cell anodes indicates possible roles of OmcB, OmcZ, type IV pili, and protons in extracellular electron transfer. *Energy and Environmental Science*, 2, 506-516.
- Ringeisen, B. R., Henderson, E., Wu, P. K., Pietron, J. Ray, R., Little, B., Biffinger, J. C., Jones-Meehan, J. M. (2006). High Power Density from a Miniature Microbial Fuel Cell Using *Shewanella oneidensis* DSP10. *Environmental Science and Technology*, 40(8), 2629-2634.
- Rismani-Yazdi, H., Christy, A.D., Dehority, B. A. Morrison, M., Yu, Z., Tuovinen, O. H. (2007). Electricity generation from cellulose by rumen microorganisms in microbial fuel cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 97(6), 1398-1407.
- Rittman, E. B. (2007). Role of Biotechnology in Water and Wastewater Technology. *Journal of Environmental Engineering* In press.
- Rittman, B. E. (2008). Opportunities for renewable bioenergy using microorganisms.

- Biotechnology and Bioengineering 100(2), 203-212.
- Rosenbaum, M., Zhao, F. Schröder, U., Scholz, F. (2006). Interfacing electrocatalysis and biocatalysis with Tungsten carbide: A high-performance, noble-metal-free microbial fuel cell. *Angewandte Chemie*, 118(40), 6810-6813.
- Rozendal, R. A., Hamelers, H. V. M., Buisman, C J. N. (2006a). Effects of membrane cation transport on pH and microbial fuel cell performance. *Environmental Science and Technology*, 40(17), 5206-5211.
- Rozendal, R. A., Hamelers, H. V. M., Euverink, G. J. W., Metz, S. J. Buisman, C J. N. (2006b). Principle and perspectives of hydrogen production through biocatalyzed electrolysis.
- Rozendal, R.A., Sleutels, T.H.J.A., Hamelers, H.V.M., Buisman, C.J.N. (2008a). Effect of the type of ion exchange membrane on performance, ion transport, and pH in biocatalysed electrolysis of wastewater. *Water Science and Technology*, 57(11), 1757-1762.
- Rozendal, R. A., Hamelers, H. V. M., Rabaey, K., Keller, J., Buisman, C. J. N. (2008b). Towards practical implementation of bioelectrochemical wastewater treatment. *Trends in Biotechnology*, 26(8), 450-459.
- Ryckelynck, N., Stecher, H; Reimers. C. (2005). Understanding the anodic mechanism of a seafloor fuel cell: Interactions between geochemistry and microbial activity. *Biogeochemistry*, 76(1), 113-139.

S

- Sabater, S., Guasch, H., Ricart, M., Romaní, A., Vidal, G., Klünder, C., Schmitt-Jansen, M. (2007). Monitoring the effect of chemicals on biological communities. The biofilm as an interface. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387(4), 1425-1434.
- Sand, W. Gehrke T. (2006). Extracellular polymeric substances mediate bioleaching/biocorrosion *via* interfacial processes involving iron(III) ions and acidophilic bacteria. *Research in Microbiology* 157(1), 49-56.
- Schamphelaire, L. D., Rabaey, K., Boeckx, P., Boon, N., Verstraete, W. (2008). Outlook for benefits of sediment microbial fuel cells with two bio-electrodes. *Microbial Biotechnology* 1(6), 446-462.
- Schröder, U., Nießen, J., Scholz, F. (2003). A generation of microbial fuel cells with current outputs boosted by more than one order of magnitude. *Angewandte Chemie International Edition*, 42(25), 2880-2883.
- Schröder, U. (2007). Anodic electron transfer mechanisms in microbial fuel cells and their energy efficiency. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 9(21), 2619-2629.

- Scott, I., Roche, K. (2008). Carbon-supported manganese oxide nanoparticles as electrocatalysts for oxygen reduction reaction (ORR) in neutral solution. *Journal of Applied Electrochemistry*, 39(2), 197-204.
- Shantaram, A., Beyenal, H., Raajan, R., Veluchamy, A., Lewandowski, Z. (2005). Wireless sensors powered by microbial fuel cells. *Environmental Science and Technology*, 39(13), 5037-5042.
- Shukla, A. K., Suresh, P., Berchmans, S., Rajendran, A. (2004). Biological fuel cells and their applications. *Current Science* 87(4), 455-468.
- Sleutels, T.H., Darus, L., Hamelers, H.V.M., Buisman, C. J. N. (2011). Effect of operational parameters on Coulombic efficiency in bioelectrochemical systems. *Bioresource Technology* 102(24), 11172-11176.
- Song, T-S., Cai, H-Y, Yan, Z-S., Zhao, Z-W., Jiang, H-L. (2012). Various voltage productions by microbial fuel cells with sedimentary inocula taken from different sites in one freshwater lake. *Bioresource Technology*, 108, 68-75.
- Srikanth, S., Mohan, S. V., Sarma, P.N. (2010). Positive anodic poised potential regulates microbial fuel cell performance with the function of open and closed circuitry. *Bioresource Technology*, 101, 5337-5344.
- Steinbusch, K. J. J., Hamelers, H. V. M., Schaap, J. D., Kampman, C., Buisman, C. J. N. (2012). Bioelectrochemical ethanol production through mediated acetate reduction by mixed cultures. *Environmental. Science. and Technology*, 44(1), 513-517.
- Strycharz, S. M., Gannon, S. M., Boles, A. R. Ashley, Franks, E., Nevin, K. P., Lovley, D. R.. (2010). Reductive dechlorination of 2-chlorophenol by *Anaeromyxobacter dehalogenans* with an electrode serving as the electron donor. *Environmental Microbiology Reports*, 2(2), 289-294.
- Strycharz, S. M., Malanoski, A. P., Snider, R. M., Yi, H., Lovley, D. R., Tender, L.M. (2011). Application of cyclic voltammetry to investigate enhanced catalytic current generation by biofilm-modified anodes of *Geobacter sulfurreducens* strain DL1 vs. variant strain KN400. *Energy and Environmental Science*, 4(3), 896-913.
- Sukkasem, C., Xu, S. Park, S., Boonsawang, P., Liu, H. (2008). Effect of nitrate on the performance of single chamber air cathode microbial fuel cells. *Water Research* , 42, (19), 4743-4750.
- Sun, M., Mu, Z. X., Chen, Y. P., Sheng, G. P., Liu, X. W. , Chen, Y. Z., Zhao, Y., Wang, H. L., Yu, H. Q., Wei, L., Ma, F. (2009). Microbe-assisted sulfide oxidation in the anode of a microbial fuel cell. *Environmental Science and Technology*, 43(9), 3372-3377.
- Sun, D., Call, D. F., Kiely, P. D., Wang, A., Logan, B. E. (2012). Syntrophic interactions improve power production in formic acid fed MFCs operated with set anode potentials or fixed resistances. *Biotechnology and Bioengineering*, 109(2), 405-414.

T

- Tender, L. M., eimers, C. E., Stecher, R. A., Holmes, D. E., Bond, D. R., Lowy, D.A. Pilobello, K., Fertig, S. J., Lovley, D. R. (2002). Harnessing microbially generated power on the seafloor. *Nature Biotechnology*, 20(8), 821-825.
- Tender, L. M., Zeikus, J. G., Finkelstein, D. A. (2006). Effect of electrode potential on electrode-reducing microbiota. *Environmental Science and Technology*, 40(22), 6990-6995.
- Ter Heijne, A., Hamelers, H. V. M., De Wilde, V., Rozendal, R. A., Buisman, C. J. N.(2006). A bipolar membrane combined with ferric iron reduction as an efficient cathode system in microbial fuel cells. *Environmental Science and Technology*, 40(17), 5200-5205.
- Torres, C. I., Marcus, A. K., Rittmann, B. E. (2007). Kinetics of consumption of fermentation products by anode respiring bacteria. *Applied Microbial and Cell physiology*, 77(3), 689-697.
- Torres, C. I., Marcus, A. K., Rittmann, B. E. (2008). Proton transport inside the biofilm limits electrical current generation by anode-respiring bacteria. *Biotechnology and Bioengineering*, 100(5), 872-881.
- Torres, C. I., Krajmalnik-Brown, R., Parameswaran, P., Marcus, A. K., Wanger, G., Gorby, Y. A., Rittmann, B. E. (2009). Selecting anode-respiring bacteria based on anode potential: phylogenetic, electrochemical, and microscopic characterization. *Environmental Science and Technology*, 43(24), 9519-9524.

V

- Veer Raghavulu, S., Mohan, S. V., Reddy, M. V., Mohanakrishna, G., Sarma, P.N. (2009). Behavior of single chambered mediatorless microbial fuel cell (MFC) at acidophilic, neutral and alkaline microenvironments during chemical wastewater treatment. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(17), 7547-7554.
- Velasquez-Orta, S. B., Head, I. M., Curtis, T. P., Scott, K. (2011). Factors affecting current production in microbial fuel cells using different industrial wastewaters. *Bioresource Technology*, 102(8), 5105-5112.
- Vilain, S., Cosette, P., Hubert, M., Lange, C., Junter, G.-A., Jouenne, T. (2004). Comparative proteomic analysis of planktonic and immobilized *Pseudomonas aeruginosa* cells: a multivariate statistical approach. *Analytical Biochemistry*, 329(1), 120-130.

W

- Wagner, R. C., Call, D. F., Logan, B. E. (2010). Optimal set anode potentials vary in bioelectrochemical systems. *Environmental Science and Technology*, 44(16), 6036-6041.
- Wang, X., Feng, Y., Ren, N., Wang, H., Lee, H., Li, N., Zhao, Q. (2009). Accelerated start-up of two-chambered microbial fuel cells: Effect of anodic positive poised potential. *Electrochimica Acta*, 54(3), 1109-1114.
- Wang, A., Sun, D., Ren, N., Liu, C., Liu, W., Logan, B., Wu, W-M. (2010). A rapid selection strategy for an anodophilic consortium for microbial fuel cells. *Bioresource Technology*, 101, 5733-5735.
- Watanabe, K. (2008). Recent developments in microbial fuel cell technologies for sustainable bioenergy. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 106(6), 528-536.
- Wei, J, Liang, P., Cao, X., Huang, X. (2010). A New insight into potential regulation on growth and power generation of geobacter sulfurreducens in microbial fuel cells based on energy viewpoint. *Environmental. Science and Technology*, 44(8), 3187-3191.
- Wingender, J., Neu, T., R., Flemming, H.-C. (1999). Microbial extracellular polymeric substances: characterization, structure, and function. Editeur: Springer, 276 pages.

Y

- Yi, H., Nevin, K. P., Kim, B.-C., Franks, A. E., Klimes, A., Tender, L. M., Lovley, D. R. (2009). Selection of a variant of *Geobacter sulfurreducens* with enhanced capacity for current production in microbial fuel cells. *Biosensors and Bioelectronics*, 24(12), 3498-3503.
- Yong, Y.-C., Yu, Y.-Y., Li, C.-M., Zhong, J.-J., Song, H. (2011). Bioelectricity enhancement *via* overexpression of quorum sensing syqtem in *Pseudomonas aeruginosa*-inoculated microbial fuel cells. *Biosensors and Bioelectronics*, 30(1), 87-92.
- You, S. J., Zhao, Q. L., Jiang, J. Q., Zhang, J. N. (2006). Treatment of domestic wastewater with simultaneous electricity generation in microbial fuel cell under continuous operation. *Chemical and Biochemical Engineering Quaterly*, 20(4), 407-412.
- Youngho, A., Logan, B. (2010). Effectiveness of domestic wastewater treatment using microbial fuel cells at ambient and mesophilic temperatures. *Bioresource Technology* 101(2), 469-475.
- Yuan, Y., Zhao, B., Zhou, S., Zhong, S., Zhuang, L. (2011). Electrocatalytic activity of anodic biofilm responses to pH changes in microbial fuel cells. *Bioresource*

Technology, 102(3), 6887-6891.

Z

Zhang, X., Cheng, S., Liang, P., Huang, X., Logan, B. E. (2010). Scalable air cathode microbial fuel cells using glass fiber separators, plastic mesh supporters, and graphite fiber brush anodes. *Bioresource Technology*, 102(1), 372-375.

Zhang, F., He, Z. (2012). Simultaneous nitrification and denitrification with electricity generation in dual-cathode microbial fuel cells. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 87(1), 153-159.

Zhao, F., Harnisch, F., Schroder, U., Scholz, F., Bogdanoff, P., Herrmann, I. (2006). Challenges and constraints of using oxygen cathodes in microbial fuel cells. *Environmental Science and Technology*, 40(17), 5193-5199.

Zhao, F., Rahunen, N., Varcoe, J. R., Roberts, A. J., Avignone-Rossa, C., Thumser, A. E., Slade, R.C T. (2009). Factors affecting the performance of microbial fuel cells for sulfur pollutants removal. *Biosensors and Bioelectronics*, 24(7), 1931-1936.

Zhuang, L., Zhou, S., Li, Y., Yuan, Y. (2010). Enhanced performance of air-cathode two-chamber microbial fuel cells with high-pH anode and low-pH cathode. *Bioresource Technology*, 101(10), 3514-3519.

Zhuang, L. (2012). Scalable microbial fuel cell (MFC) stack for continuous real wastewater treatment. *Bioresource Technology*, 106, 82-88.

Zuo, Y., Maness, P.-C., Logan, B. E. (2006). Electricity production from steam-exploded corn stover biomass. *Energy and Fuels*, 20(4), 1716-1721.

Résumé

L'objectif de la thèse est d'évaluer la faisabilité de la technologie de pile à combustible microbienne pour la production d'électricité couplée au traitement d'effluents de l'industrie papetière.

La première partie du travail montre que de nombreux effluents papetiers permettent de former des biofilms anodiques efficaces. Lorsque les effluents sont complétés en acétate et l'anode polarisée à $-0,3\text{V/ECS}$ des densités de courant de 12 A/m^2 et des rendements faradiques de 90% ont été obtenus. Lorsque les effluents sont utilisés comme seuls substrats, les densités de courant atteignent 6 A/m^2 et les rendements faradiques 30%, avec des abattements de DCO jusqu'à 50%.

Les biofilms anodiques optimaux ont été associées à des cathodes à air abiotiques pour concevoir des piles complètes. Des puissances surfaciques de 294 mW/m^2 à 596 mW/m^2 ont été obtenues avec deux effluents différents.

Mots clés : Pile à combustible microbienne, effluent papetier, biofilm électro-actif, bioanode, système bio-électrochimique.

Abstract

The objective of this thesis was to assess the feasibility of the microbial fuel cell technology for the production of electrical energy coupled with the treatment of pulp and paper effluents.

The first part of work showed that various pulp and paper effluents are suitable to form efficient anodic biofilms. When the effluent was supplemented with acetate and the anode polarized between at -0.3 V/SCE , current densities of 12 A/m^2 and Coulombic efficiencies up to 90% were obtained. When effluents were provided as the sole substrate, current densities reached 6 A/m^2 and Coulombic efficiencies 30%, with COD removal around 50%.

The optimal anodic biofilms were associated with associated with abiotic air-cathodes to design complete microbial fuel cells. Power densities from 294 mW/m^2 to 596 mW/m^2 were obtained with two different effluents.

Keywords: Microbial fuel cell, pulp and paper effluent, electro-active biofilms, bioanode, bioelectrochemical system.

