HAL
open science

Développement d'électrodes modifiées et d'un bioréacteur électrochimique à flux continu pour une application aux biopiles microbiennes

Joffrey Champavert

To cite this version:

Joffrey Champavert. Développement d'électrodes modifiées et d'un bioréacteur électrochimique à flux continu pour une application aux biopiles microbiennes. Matériaux. Université Montpellier, 2016. Français. NNT : 2016MONTT205 . tel-01758931

HAL Id: tel-01758931

https://theses.hal.science/tel-01758931

Submitted on 5 Apr 2018

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

Délivré par **UNIVERSITE DE MONTPELLIER**

Préparée au sein de l'école doctorale **Sciences Chimiques Balard (ED 459)**
Et de l'unité de recherche **Institut Européen des Membranes (IEM)**

Spécialité : **Chimie et Physico-Chimie des Matériaux**

Présentée par **Joffrey CHAMPAVERT**

Développement d'électrodes modifiées et d'un bioréacteur électrochimique à flux continu pour une application aux biopiles microbiennes

Soutenue le 18 Juillet 2016 devant le jury composé de

Pierre GROS, Professeur, Université Paul Sabatier, LGC, Toulouse	Président du jury
M. Nicolas BERNET, Directeur de recherche, INRA de Narbonne, LBE, Narbonne	Rapporteur
M. Frédéric BARRIERE, Maître de conférences, Université de Rennes, ISCR, Rennes	Rapporteur
M. Maxime PONTIE, Professeur, Université d'Angers, GEPEA, Angers	Examinateur
M. Christophe INNOCENT, Chargé de recherche, CNRS, IEM, Montpellier	Directeur de thèse
Mme Laurence PREZIOSI-BELLOY, Maître de conférences, Université de Montpellier, IATE	Co-directrice de thèse

A ma Maman,

Ma mamy, mon papy,

Remerciements

Ainsi s'achève ces trois années et quelques de thèse ponctuées de hauts et de bas mais toujours en bonne compagnie. Je vais à présent essayer de remercier les personnes qui m'ont entouré au cours de cette aventure professionnelle mais aussi humaine.

Cette thèse a été financée par le conseil scientifique de l'Université de Montpellier. Elle a été réalisée en collaboration entre l'Institut Européen des Membranes de Montpellier (IEM), dirigé par le professeur Philippe Miele, et le laboratoire d'Ingénierie des Agro-polymères et Technologies Émergentes (IATE), dirigé par le professeur Hugo de Vries. Je les remercie de m'avoir accueilli dans leurs laboratoires et de l'intérêt qu'ils ont pu montrer pour mon travail.

Je tiens à remercier très sincèrement M. Nicolas Bernet, M. Frédéric Barrière, M. Pierre Gros et M. Maxime Pontié pour l'honneur qu'ils m'ont fait l'honneur d'avoir accepté de juger mon travail.

La thèse ne serait pas ce qu'elle est sans la présence de nos encadrants. Je tiens donc expressément à remercier mes directeurs de thèse Christophe Innocent et Laurence Preziosi-Belloy.

Christophe, je te remercie de la confiance que tu as su me témoigner et ce malgré les moments difficiles. Merci de toute la gentillesse, la patience et la bonne humeur dont tu as toujours su faire preuve. Merci enfin pour tout ce que tu as pu m'apprendre au cours de ces trois années et quelques, toutes les longues discussions, scientifiques ou non, que nous avons pu avoir et tes encouragements.

Laurence, tu as été d'une aide précieuse, notamment lors de la rédaction de ce manuscrit mais aussi pour toute la partie biologie. Tu as su m'enseigner toute la rigueur dont il faut faire preuve lorsque l'on travaille avec le monde vivant. Merci pour tes conseils, pour ta gentillesse mais également pour tes encouragements.

Cette thèse a également donné lieu à une collaboration avec le laboratoire du GEnie des Procédés Environnement – Analytique (GEPEA) d'Angers. Je remercie une nouvelle fois M. Maxime Pontié, aussi bien pour l'aspect scientifique de cette collaboration que pour les

discussions que l'on a pu avoir lors des différents congrès, mais également Salma Ben Rejeb pour les travaux sur la partie cathodique lors de sa venue à l'IEM.

Je me tourne à présent vers les membres de mes deux laboratoires. Que serait une thèse sans le côté humain de l'aventure, sans ces personnes qui font, elles aussi, partie de notre quotidien…

J'ai fait mes premiers pas dans la microbiologie au sein de l'équipe de l'IATE. Je remercie donc mes collègues qui ont pu me guider tout au long de ces années afin de mieux appréhender la microbio.

Merci donc à Charles qui, grâce à ses remarques pertinentes, m'a permis de réaliser une grosse partie de cette thèse avec la conception du bioréacteur.

Merci également à Bernard et Véro pour votre aide au laboratoire. Merci à Estelle pour ton regard sur la rédaction de certaines parties de ce manuscrit et tes précieux conseils.

Enfin, merci à Nico. Je te remercie aussi bien pour ton aide dans la partie bio mais aussi pour ton soutien, ton écoute et les soirées passées au cours de cette thèse !

Une grande partie de cette thèse s'est également déroulée à l'IEM.

Merci donc à Sophie Tingry pour toute ton aide au cours de cette thèse et notamment pour tes remarques sur ma présentation.

Merci à mes collègues de bureau : Vincent Técher, Adriana Both Engel, Djamel Selloum, Denis Desmaël, Thuy Nguyen, Ummy Mardiana, Morgane Ramade et Widya Ernayati. Vous avez fortement contribué à la bonne ambiance qui régnait dans ce bureau, et grâce vous j'ai passé d'excellents moments !

Je voudrais également remercier les personnes que j'ai pu côtoyer au cours des pauses café, déjeuners et autre discussion de couloir. Merci à Marc Cretin, Mikhael Bechalany et Didier Cot pour leur aide. Merci à Flo, Christelle et à Dominique pour faire du labo un endroit accueillant.

Merci également aux étudiants pour les moments passés avec vous au labo ou en soirées mais aussi pour tous les encouragements que j'ai pu avoir ces derniers mois. Merci à toi Antoine, alias l'alsacien, pour ton soutien et tous ces moments de rigolades ! Merci à Pierre, Huong, Hervé, Jean Fabien, Abhijeet, Dimitri, Marlény, Jorge, Diane, Marion, Matthias et tous les autres… il y en a tant que j'ai dû en oublier et je m'en excuse !

Merci aux stagiaires avec qui j'ai eu l'occasion de travailler : Vincent, Camille, Jean Baptiste et Manon qui ont contribué aux résultats de cette thèse. Je vous souhaite bon courage pour la suite.

Je remercie également tous mes proches et mes amis scientifiques ou non. Merci à vous les loulous ! Je pense à Matou et Dadou avec qui j'ai partagé plus que de bons moments depuis le master, vous m'avez soutenu et supporté, je vous en remercie ! Je pense aussi à tous ceux qui nous ont rejoints : Alix, Fabrizio, Camille, Seb et Anja…. Merci d'avoir été présent quand il le fallait. Merci aussi à Laure, que de chemin parcouru depuis la prépa à Fauriel ! Merci aussi à toi Gauthier ! Je tiens vraiment à vous remercier de vos présences, de vos soutiens et surtout de tous ces moments partagés en votre présence, vous y êtes pour beaucoup !

Je vais terminer ces remerciements par des personnes qui comptent énormément à mes yeux.

Un immense MERCI à ma maman et ma mamy. Je vous dois en grande partie tout ce que j'ai pu faire et ce que je suis devenu. Vous avez toujours été là pour moi, aussi bien dans les meilleurs moments que dans les moins bons. Vous avez été d'un soutient absolu et inconditionnel pendant toutes ces années et je vous en serai éternellement reconnaissant. J'espère que vous êtes aussi fiers de moi que moi je le suis de vous !

MERCI à toi Manon. Je sais que tout n'a pas été facile pendant cette thèse, mais tu as toujours été présente quand il le fallait. Tu as su me remonter le moral et voir le côté positif des choses quand les choses étaient plus dures.

Les mots ne sont pas assez forts pour vous remercier pour tout ce que vous avez fait pour moi !

Sommaire

Sommaire 1

Liste des figures 7

Liste des tableaux 13

Introduction générale 15

Chapitre 1 : Etude Bibliographique 20

1. Contexte énergétique 20

2. Des piles à combustibles aux biopiles 22

2.1. Généralités 22

2.2. Principe de fonctionnement des piles à combustible à membrane échangeuse de protons 25

3. Concept de biopiles microbiennes 27

3.1. Historique 27

3.2. Principe de fonctionnement d'une pile à combustible microbienne. 28

4. Les biofilms 30

4.1. Formation et croissance d'un biofilm 30

4.2. Les aspects négatifs des biofilms 33

4.3. Les aspects positifs des biofilms 34

5. Biofilms électroactifs et transferts extracellulaires d'électrons 35

5.1. Respiration des microorganismes électroactifs 35

5.2. Les mécanismes 37

5.2.1. Transfert indirect 37

5.2.2. Transfert direct 44

5.3. Sources de microorganismes pour la formation de biofilms électroactifs 48

5.3.1. Culture complexe 48

5.3.2. Souche pure 49

6. Les matériaux d'anode 50

6.1. Le graphène 51

6.1.1. Historique : du carbone au graphène 51

6.1.2. Applications 53

6.1.3. Synthèse 54

6.1.4. Les différents types de modification des matériaux par le graphène 55

6.2. Le graphène au service des PACMs 56

7. Les matériaux de cathode 59

8. Les différents designs de PACMs 60

8.1. Piles à combustible microbiennes à deux compartiments 61

8.2. Piles à combustible microbiennes à un compartiment 63

9. Des piles à combustible microbiennes aux applications 65

9.1. Traitement des eaux usées 66

9.2. Dessalement des eaux de mer 66

9.3. Production d'hydrogène 68

9.4. Biocapteurs environnementaux 69

9.5. Bioremédiation 70

9.6. Production d'électricité 70

10. Conclusions 71

Chapitre 2 : Matériel et méthodes 74

1. Préparation et modification d'électrode 74

1.1. Synthèse du graphène 74

1.2. Méthode de dépôt dite couche par couche 75

2. Techniques de caractérisation électrochimique 76

2.1. Electrodes 77

2.2. Chronoampérométrie 77

2.3. Voltammétrie cyclique 78

2.4. Courbes de polarisation et courbe de puissance 79

2.5. Calcul du rendement faradique 84

3. Caractérisations physico-chimiques 85

3.1. Microscopie électronique à balayage 85

3.2. Microscopie à force atomique (AFM) 85

3.3. Diffraction aux rayons X 86

3.4. Spectrométrie photoélectronique X 86

4. Détermination du régime permanent et du flux dans le compartiment anodique 86

4.1. Etalonnage 87

4.2. Détermination de l'écoulement dans le bioréacteur par la mesure de la distribution des temps de séjour 88

5. Souches bactériennes 90

5.1. Lixiviat de terreau de jardin 90

5.2. Souche pure : *Pseudomonas aeruginosa* 91

5.2.1. Conservation et inoculum 92

5.2.2. Electrolytes 93

5.2.3. Dénombrement des bactéries 93

5.2.4. Fonctionnement du système 94

5.2.5. Stérilisation du système 94

5.3. Dosage du glucose 94

5.3.1. Méthode de Somogyi-Nelson 94

5.3.2. Protocole 94

5.3.3. Etalonnage 95

5.4. Estimation du pH 96

5.5. Microscopie optique 96

Chapitre 3 : Développement d'électrodes et utilisation en biopile 98

1. Introduction 98

2. Choix du matériau d'anode et modification 99

2.1. Acier inoxydable 100

2.2. Caractérisation du graphène 100

2.2.1. Diffraction aux rayons X 100

2.2.2. Spectrométrie photoélectronique X 101

2.2.3. Microscopie à force atomique 102

2.3. Modification de l'électrode 103

3. Formation d'un biofilm électroactif à partir de terreau de jardin 105

3.1. Formation d'un biofilm sur le matériau d'électrode 105

3.2. Influence de la polarisation sur la formation d'un biofilm électroactif 107

3.3. Voltammétrie cyclique et MEB 110

3.4. Circuit fermé sur résistance externe 112

3.5. Discussion 115

4. Elaboration de la cathode 118

4.1. Modification du feutre de carbone 118

4.2. Voltammétrie cyclique du poly-NiTSPc : élaboration d'une nouvelle cathode pour la réduction de l'O_2 119

5. La biopile microbienne 123

5.1. Montage de la biopile 123

5.2. Densité de courant et puissance de la biopile 124

6. Conclusions 126

Chapitre 4 : Conception et validation du bioréacteur 128

1. Conception du bioréacteur 128

1.1. Principe de fonctionnement du chémostat 129

1.2. Cahier des charges 132

1.2.1. Objectifs 132

1.2.2. Géométrie 132

1.2.3. L'armature 135

1.2.4. La membrane 136

1.2.5. Matériaux pour la réalisation du bioréacteur 138

1.2.6. Electrodes 139

1.2.7. Design du bioréacteur 140

1.3. Maintien de la température 142

1.4. Choix de la pompe 142

1.5. Montage final 143

2. Validation du bioréacteur en fonctionnement biopile 144

2.1. Taux de croissance 145

2.2. Formation d'un biofilm électroactif sur feutre de carbone 147

2.2.1. Montage 147

2.2.2. Génération de courant en présence d'air 148

2.2.3. Génération de courant en absence d'apport en oxygène 150

2.2.4. Microscopie électronique à balayage 153

2.3. Résultats et discussion 155

3. Conclusions 156

Chapitre 5 : Formation et optimisation d'un biofilm électroactif dans le bioréacteur .. 158

1. Fixation électrode 158

2. Détermination des conditions de formation d'un biofilm électroactif par polarisation 160

2.1. Evaluation de la configuration sur la densité de courant 160

2.2. Voltammétrie cyclique 165

2.3. Puissance délivrée en fonction de la configuration choisie 168

2.4. Discussion 173

3. Influence du débit d'alimentation 174

3.1. Introduction 174

3.2. Etat de la biomasse en fin de batch 175

3.3. Evaluation de la formation d'un biofilm électroactif sur résistance externe et sous polarisation à-0,246 V vs pseudo Ag/AgCl 176

3.4. Influence du débit d'alimentation lors de la polarisation à -0,246 V vs pseudo Ag/AgCl 179

3.5. Influence du débit d'alimentation sur résistance externe 182

3.6. Influence du débit d'alimentation sur la densité de courant 185

3.7. Evaluation des performances lors d'une alimentation sans glucose 185

3.8. Discussion 186

4. Conclusions 187

Conclusions et perspectives 190

Annexe 195

Contributions scientifiques 197

Références 199

Résumé / Abstract 215

Liste des figures

Figure 1 : Répartition des approvisionnements mondiaux en énergie primaire [4]. 21

Figure 2 : Les différents types de PACs associées à leurs températures de fonctionnement, leurs combustibles et leurs électrolytes [7]. 23

Figure 3 : Schéma du principe de fonctionnement d'une PEMFC [8]. 25

Figure 4 : Evolution du nombre de publications pour le terme "Microbial Fuel Cell" dans la littérature depuis 1997 (d'après Science Direct – Décembre 2015). 28

Figure 5 : Schéma du principe de fonctionnement d'une biopile microbienne avec une anode biologique et une cathode abiotique. 29

Figure 6 : Etapes de formation d'un biofilm selon Costerton [31]. 31

Figure 7 : (A) Schéma de la métabolisation de l'acétate chez les microorganismes électroactifs [40] et (B) schéma du cycle de Krebs. 36

Figure 8 : Schéma du mécanisme de transfert d'électrons par médiateur exogène [41]. 38

Figure 9 : Schémas des différents mécanismes de transfert indirect d'électrons par métabolites secondaires (A) couple redox endogène, et par métabolites primaires (B) via des accepteurs d'électrons réduits terminaux (respiration anaérobie) et (C) via l'oxydation de produits de fermentation réduits [54]. 42

Figure 10 :Schéma du mécanisme de transfert direct d'électrons par (A) les cytochromes de la membrane, (B) les pili conducteurs [41]. 44

Figure 11 : Formules développées de la phénazine-1-carboxamide et de la pyocyanine. 50

Figure 12 : Représentations schématiques des différentes formes du carbone en fonction de son hybridation. 52

Figure 13 :Représentation schématique des différentes possibilités pour synthétiser du graphène et de l'oxyde de graphène réduit [133]. 55

Figure 14 : (A) anode en mousse de nickel non modifiée, (B) mousse de nickel biocorrodée après 2 000 h de fonctionnement en biopile, (C) mousse de nickel modifiée avec du graphène,

(D) mousse de nickel modifiée résistante à la biocorrosion après 2 800 h de fonctionnement en biopile [136]. 57

Figure 15 : Formule développée de la phthalocyanine de nickel tétrasulfonée. 60

Figure 16 : (A) Cellule de type "H" d'après Delaney et al [45]; (B) Cellule rectangulaire d'après Allen et Benetto [25]; (C) Cellule miniature d'après Ringeisen et al [64]; (D) Cellule à lits granulaires d'après He et al [81];(E) Cellule à lits granulaires et cathode interne en U d'après He et al [150]; (F) Cellule plate à écoulement serpentin d'après Min et Logan [151]. Les schémas sont adaptés de Du et al [152]. 62

Figure 17 : Représentation schématique des différents designs de PACMs à cathode à air. (A) PACM avec une couche de membrane échangeuse de protons recouvrant l'intérieur de la fenêtre sur laquelle la cathode est montée [80] ; (B) PACM cylindrique avec la cathode et l'anode opposées [90]; (C) PACM tubulaire avec la cathode à l'extérieur et l'anode à l'intérieur [156] ; (D et E) PACM contenant 8 électrodes de graphite en tube comme anodes et entourant une cathode unique (vue de profil et de face) [90]. Illustrations schématiques issues de Du et al [28]. 64

Figure 18 : (A) Empilement de six cellules à lit granulaire [157], (B) empilement de deux cellules [158] et (C) PACM en série [159]. 65

Figure 19 : Cellule microbienne de dessalement à trois compartiments (adapté de B. Logan et al [165]). 67

Figure 20 : Schéma de la modification de l'électrode par du rGO en utilisant la méthode couche par couche. 76

Figure 21 : Système électrochimique à trois électrodes. 77

Figure 22 : représentation schématique d'une courbe de voltammétrie cyclique (a) réponse d'un courant non-faradique et (b) réponse du courant en présence d'un couple redox, les flèches représentent le sens de variation du potentiel. 78

Figure 23 : schéma du montage lors de la caractérisation de la puissance de la biopile..... 80

Figure 24 : Exemple de courbe de polarisation (tension et puissance en fonction du courant). 81

Figure 25 : Schéma de principe des pertes liées aux courants internes et apparition d'un potentiel d'abandon mixte..... 82

Figure 26 : Evolution de l'absorbance en fonction de la concentration en $KMnO_4$ avec les écarts-types. 88

Figure 27 : Evolution de la distribution des temps de séjour en fonction du temps pour différents débits : (A) 10 mL/h, (B) 50 mL/h et (C) 100 mL/h. 90

Figure 28 : Courbe d'étalonnage pour déterminer la concentration en glucose. 96

Figure 29 : Evolution de la densité de courant en fonction du temps correspondant à la formation d'un biofilm électroactif à la surface de l'électrode [203]..... 99

Figure 30 : Diffraction à Rayon X de la poudre de graphite, de l'oxyde de graphène et de l'oxyde de graphène réduit. 101

Figure 31 : XPS de l'oxyde de graphène avant (A) et après (B) réduction chimique. 102

Figure 32 : (A) Image topographique par AFM et (B) profil de l'épaisseur d'un feuillet d'oxyde de graphène. 103

Figure 33 : Schéma du dépôt couche par couche de l'oxyde de graphène réduit à la surface de l'électrode, photos de l'électrode avant et après modification. 104

Figure 34 : Images MEB de (A) l'électrode de mousse d'acier inoxydable non modifiée et (B) de la mousse d'acier inoxydable modifiée par l'oxyde de graphène réduit. 104

Figure 35 : (A) Schéma du Montage et photos des électrodes laissées dans du lixiviat de terreau pendant 10 jours ; (B) SSF et (C) SSF/$(PEI/rGO)_5$. 105

Figure 36 : Evolution de la densité de courant des électrodes SSF et SSF/$(PEI/rGO)_5$ avec un biofilm de 10 jours par chronoampérométrie à un potentiel de -0,246 V vs AG/AgCl. 106

Figure 37 : Polarisation à -0,246 V (vs Ag/AgCl) des électrodes dans une solution de 60 mM de KCl et 20 mM d'acétate sans microorganismes. 107

Figure 38 : Evolution de la densité de courant à un potentiel de -0,246 V (vs Ag/AgCl) au cours du temps pour les électrodes SSF (courbe noire) et SSF/$(PEI/rGO)_5$ (courbe rouge). 108

Figure 39 : Voltammétries cycliques des électrodes sans biofilm (A) et avec biofilm (B) à 20 mV/s vs Ag/AgCl dans une solution d'acétate (20 mM) et de chlorure de potassium KCl (60 mM). 110

Figure 40 : Images MEB des électrodes avec biofilm (coupes transversales) : SSF à des grandissements x60 (A) et x2500 (C) et SSF/(PEI/rGO)5) à des grandissements x60 (B) et x10000 (D). 112

Figure 41 : Schéma du montage pour étudier la stabilité de l'électrode avec le biofilm. 113

Figure 42 : Evolution de la densité de courant au cours du temps des bioanodes connectées à une résistance externe de 1 kΩ. 114

Figure 43 : Chronoampérométries à -0,2 V vs ECS avec quatre types de terreaux différents issus de la thèse de D. Pocaznoi [82]. 117

Figure 44 : Voltammétrie cyclique (0,1 V/s) du (A) feutre de carbone dans 0,1 M NaOH et 2 mM de NiTSPc (70 cycles) et (B) du feutre de carbone/poly-NiTSPc dans 0,1 M de NaOH (1 cycle). 120

Figure 45 : Courbe courant-potentiel (à 0,1 V/s) des deux électrodes en feutre de carbone dans 0,1 M de KNO_3 en solution saturée en O_2 (bullage d'O_2). 120

Figure 46 : Evolution de la densité de courant à -0,8 V vs ECS en valeur absolue en fonction du nombre de cycle d'électrodépôt de poly-NiTSPc dans 0,1 M de KNO_3 en solution saturée de O_2. 121

Figure 47 : Images MEB du (A) feutre de carbone et (B) du feutre de carbone/poly-NiTSPc. 122

Figure 48 : Schéma de montage de la biopile à deux compartiments séparés par une membrane. 124

Figure 49 : Evolution de la densité de courant avec apport d'oxygène par bullage d'air en fonction du temps de fonctionnement de la biopile. 124

Figure 50 : Représentation schématique d'un chemostat. 129

Figure 51 : Evolution de la concentration en biomasse (rouge) et en substrats (noir) dans le bioréacteur en fonction du taux de dilution. 131

Figure 52 : Schéma d'un compartiment avec l'entrée et la sortie du milieu de culture. 133

Figure 53 : Schéma du compartiment anodique de forme rectangulaire (gauche) et cylindrique (droite) avec les cellules sédimentées représentées en vert. 133

Figure 54 : Vue de face de la circulation du milieu nutritif dans le compartiment anodique (gauche) de forme rectangulaire, les zones rouges indiquent les zones stagnantes; (droite) de forme cylindrique. 134

Figure 55 : Schéma des deux sortes de blocs constituant l'armature du bioréacteur. 135

Figure 56 : Schémas d'assemblage des blocs du milieu (gauche) vue éclatée et (droite) vue assemblée. 136

Figure 57 : Schéma de montage du prototype. 136

Figure 58 : Schéma général (A) des pièces d'assemblage et (B) du bioréacteur. 141

Figure 59 : Schéma général du montage expérimental du bioréacteur. 144

Figure 60 : Evolution de la densité optique DO_{620} en fonction du temps pour les milieux TSA-B (gauche) et BBM (droite)..... 145

Figure 61 : Représentation logarithmique de la DO_{620} pour les milieux (gauche) TSA-B et (droite) BBM. 146

Figure 62 : Schéma de montage du bioréacteur pour le suivi de formation d'un biofilm électroactif par chronoampérométrie..... 148

Figure 63 : Evolution du courant en fonction du temps en présence d'air pour une polarisation à -0,246 V vs pseudo Ag/AgCl. 149

Figure 64 : Evolution de la densité optique (rouge) et de la densité de courant (noir) produit par la biopile en absence d'apport en air, polarisée à -0,246 V vs pseudo Ag/AgCl et un débit de 40 mL/h. 151

Figure 65 : Images MEB de l'électrode de feutre de carbone sans biofilm à un grandissement x500 (A) et x2500 (B) et du feutre de carbone avec le biofilm a des grandissements de x500 (C), x1000 (D), x1000 (E) et x5000 (F). 154

Figure 66 : Schéma de montage pour déterminer la résistance entre l'électrode et le fil en titane. 159

Figure 67 : Chronoampérométrie de la biopile à -0,246 V vs pseudo Ag/AgCl en absence de microorganismes. 161

Figure 68 : Evolution de la densité de courant en batch et en alimentation continue lorsque la biopile est branchée sur une résistance externe de 1 kΩ. 162

Figure 69 : Evolution de la densité de courant en fonction de la configuration de la biopile et pour un taux d'alimentation de 0,8 h^{-1}. 164

Figure 70: Comparaison de la densité de courant entre le premier et le deuxième essai de polarisation à -0,246 V vs pseudo Ag/AgCl et sur résistance externe et pour un taux d'alimentation de 0,8 h^{-1}..... 165

Figure 71 : Voltammétries cycliques à 20 mV/s vs pseudo Ag/AgCl (A) avant ensemencement et 24 h après sur résistance externe (1 kΩ), (B) comparaison entre le montage sur résistance externe et les polarisations à -0,146 V et -0,246 V, (C) comparaison des polarisations à -0,346 V et -0,446 V, (D) comparaison des polarisations à -0,246 V entre la première et la deuxième fois, (E) comparaison en montage sur résistance entre la première et la deuxième fois. 166

Figure 72 : Courbes caractéristiques de puissance et de polarisation pour la polarisation à -0,146 V et à débit nul. 168

Figure 73 : Histogramme de l'évolution de la densité de puissance maximale électrique (en valeur absolue) délivrée par la biopile en fonction de la configuration adoptée ; les zones grisées correspondent aux courant négatifs enregistrés. 172

Figure 74 : Evolution de la densité de courant pendant le batch en milieu TSA-B lorsque la biopile est connectée à une résistance externe de 1 kΩ. 175

Figure 75 : Evolution des différents paramètres au cours du temps lors d'une polarisation à -0,246 V vs pseudo Ag/AgCl 180

Figure 76 : Evolution des différents paramètres au cours du temps lors du branchement sur résistance externe. 183

Figure 77 : Evolution de la densité de courant en fonction du taux de dilution lors de la polarisation à 0,246 V vs pseudo Ag/AgCl. 185

Figure 78 : Evolution de la densité de courant en fonction du temps relatif en absence de glucose et avec une polarisation à -0,246 V vs Ag/AgCl et un taux d'alimentation de 1,6 h^{-1}. 186

Figure 79: Courbes de puissance et de polarisations pour les différentes configurations testées (A) à t = 0 h en milieu TSA-B, (B) sur résistance à t = 24 h en milieu TSA-B, et après les configurations (C) sur résistance en milieu BBM, (D) polarisation à -0,146 V, (E) polarisation à -0,246 V, (F) polarisation à -0,346 V, (G) polarisation à -0,446 V, (H) polarisation à -0,246 V, (I) sur résistance. 195

Liste des tableaux

Tableau 1 : Applications et principaux avantages de piles à combustible de différents types et dans différentes applications [7]. 24

Tableau 2 : Tableau récapitulatif des caractéristiques obtenues dans des piles à combustible microbiennes utilisant des médiateurs électrochimiques. 40

Tableau 3 : Tableau récapitulatif des principales études mettant en jeu le transfert direct d'électrons par année de mise en évidence, adapté de B. Logan et al [72]. 47

Tableau 4 : Exemple de densités de courant et densités de puissance obtenues avec divers inocula complexes naturels [82]. 49

Tableau 5 : Configurations et caractéristiques d'une sélection d'anodes modifiées par du graphène. ERGO - Oxyde de graphène réduit électrochimiquement; PPy-GO - Polypyrrole-oxyde de graphène; GONR - Nanoribbon d'oxyde de graphène; GL - Graphene layer (couche de graphène). 58

Tableau 6 : Composition et caractéristiques du terreau de jardin. 91

Tableau 7 : Composition des milieux TSA-A et TSA-B. 92

Tableau 8 : Composition du milieu BBM. 93

Tableau 9 : Composition et caractéristiques des différents terreaux utilisés dans la thèse de D. Pocaznoi [82] et du terreau utilisé pour notre étude. 116

Tableau 10 : Comparaison des puissances de la biopile en fonction de la nature de la cathode avec bullage d'air. 125

Tableau 11 : Comparaison des puissances en fonction de la présence en O_2 pur ou contenu dans l'air avec la cathode de phthalocyanine. 125

Tableau 12 : Grandeurs caractéristiques issues des courbes de puissances et de polarisation pour les différentes configurations. 169

Tableau 13 : Evolution des grandeurs caractéristiques liées aux courbes de puissance et de polarisation au cours du temps et en fonction de la configuration adoptée pour le fonctionnement de la biopile. 177

Introduction générale

L'industrialisation et l'accroissement de la population mondiale s'accompagnent d'une augmentation constante de la demande en énergies, ce qui a pour conséquence le réchauffement climatique en raison des émissions de gaz à effet de serre. Les énergies fossiles (pétrole, charbon, gaz et minerais radioactifs) représentent 87 % de l'approvisionnement total et cette part est remarquablement stable depuis les années 1990. Néanmoins, ces ressources constituent à terme un stock fini. Alors qu'un épuisement de ces ressources fossiles est prévu pour les prochaines décennies, la dépendance à ces énergies reste forte. En 2007, le Grenelle de l'environnement a été lancé et a pour objectifs d'ici à 2020 de réduire d'au moins 20 % les émissions de gaz à effet de serre, de porter la part des énergies renouvelables (définie comme une énergie dont la source a une vitesse de formation plus grande que celle de son utilisation) dans la consommation énergétique de l'Union Européenne à 20 % et d'améliorer l'efficacité énergétique de 20 % [1]. La COP21 de 2015, conférence des parties sur le climat, a fixé comme objectif une limitation du réchauffement mondial entre 1,5 °C et 2 °C d'ici 2100 [2]. Ces directives nécessitent donc de diversifier les sources de production d'énergie non polluante et renouvelable. Parmi ces sources on peut citer le soleil (photovoltaïque), le vent (éolien), la chaleur de la Terre (géothermie), l'eau (hydraulique) et la biomasse (bois, biogaz). Parmi la biomasse, le métabolisme microbien constitue aussi une voie alternative pour la production d'électricité.

La production d'électricité par des microorganismes a été mise en évidence au début du 20ème siècle par M. C. Potter [3]. Le concept de piles à combustible biologique, abandonné rapidement en raison d'une production d'électricité non continue, a connu un regain d'intérêt ces deux dernières décennies. Le fonctionnement de cette technologie verte de production d'électricité renouvelable est similaire à celui des piles à combustible classique, qui utilisent des catalyseurs métalliques à l'anode et la cathode, même si elle ne rivalise pas avec celles-ci en termes de puissance et de durée de vie. L'atout majeur des piles à combustible biologique est la catalyse des réactions électrochimiques par des biofilms bactériens dits électroactifs, c'est-à-dire capables d'échanger des électrons avec des matériaux conducteurs. En effet, les microorganismes dégradent par des réactions d'oxydo-réduction de la matière organique et inorganique pour leurs métabolismes et produisent ainsi des électrons. Le deuxième avantage

des piles à combustible microbienne est la matière organique nécessaire au développement des microorganismes qui peut être apportée par les eaux usées alimentant les stations d'épuration ou les déchets de certaines industries agroalimentaires. Ainsi, ce concept permet non seulement de valoriser les déchets pour la production d'électricité mais aussi de traiter les eaux usées.

Néanmoins, les faibles densités de puissance délivrées par ces systèmes, qui sont de l'ordre de quelques centaines de milliwatts par m² d'électrode, restent un verrou majeur au développement industriel des biopiles microbiennes. Afin d'améliorer leurs performances, deux approches peuvent être menées. La première de ces approches est fondamentale. Elle concerne la compréhension des mécanismes de transferts d'électrons entre le biofilm et la surface de l'électrode. La deuxième approche est expérimentale et concerne principalement les constituants de la biopile comme les électrodes, la membrane de séparation, le design et la sélection de souches électroactives. Il est possible d'augmenter la surface spécifique de l'électrode par modification de surface et d'optimiser les processus de transferts électroniques à l'interface biofilm-électrode en améliorant la conductivité de l'électrode. Des matériaux modifiés (par du graphène notamment) sont décrits comme capables de répondre à ces attentes. Il est également possible d'augmenter les performances des biopiles en travaillant sur leur design et leurs conditions de fonctionnement.

Mon travail s'est donc orienté vers l'étude et l'optimisation d'une anode microbienne en utilisant une électrode modifiée par du graphène et sur la conception d'un nouveau design de pile à combustible microbienne à flux continu.

Le premier chapitre présente le concept et le fonctionnement des biopiles microbiennes dont la technologie provient directement des piles à combustibles classiques. Il s'agira également de faire le point sur les connaissances et les hypothèses liées aux mécanismes de transfert électronique des biofilms électroactifs et à l'interface des biofilms-électrode. Les différents constituants des biopiles et leur influence sur les performances sont également détaillés. Enfin, la dernière partie présentera les différentes applications visées.

Le second chapitre de ce manuscrit présente la synthèse du graphène et la modification surfacique de l'électrode utilisée par du graphène. Les méthodes de caractérisations physico-chimiques et électrochimiques des matériaux seront détaillées. La caractérisation du bioréacteur proposé est abordée, tout comme les microorganismes employés tout au long de ce travail.

Le troisième chapitre se focalise sur l'utilisation d'une anode par du graphène comme support pour la formation d'un biofilm électroactif. Les performances liées à la présence de

graphène ont été évaluées avec la formation d'un biofilm électroactif à partir de terreau de jardin. Cette anode a ensuite été testée en biopile avec une cathode abiotique modifiée de façon surfacique avec un complexe organométallique, la phthalocyanine de nickel.

Le quatrième chapitre s'intéresse à la conception et à la réalisation d'un réacteur biologique à flux continu pouvant fonctionner en biopile. La validation de ce prototype a été réalisée dans des conditions standardisées et contrôlées en utilisant une souche pure : *Pseudomonas aeruginosa*. Ainsi, le biofilm électroactif formé n'est issu que d'un seul type de microorganisme.

Le cinquième chapitre est dédié à l'utilisation de ce bioréacteur en alimentation continue avec l'anode modifiée décrite dans le chapitre 3. La souche bactérienne utilisée pour la formation d'un biofilm électroactif est *Pseudomonas aeruginosa*. Les conditions de formation du biofilm et son optimisation sont dans un premier temps présentées. La vitesse d'alimentation en substrats et son influence sur les performances électriques (densité de courant produit et puissance délivrée) ainsi que les différents paramètres biologiques (consommation du glucose, évolutions de la biomasse et du pH du milieu de culture) sont évaluées.

CHAPITRE 1 :

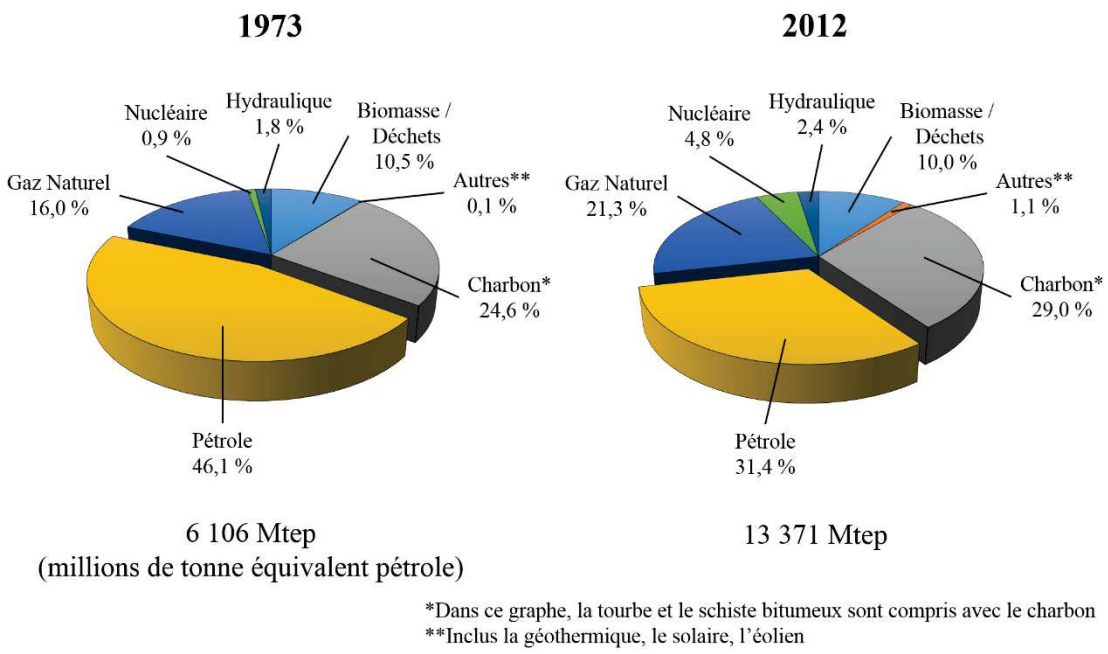
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1 : Etude Bibliographique

1. Contexte énergétique

A l'heure actuelle, le développement de nouvelles énergies renouvelables est devenu une priorité. Les enjeux liés au réchauffement climatique ainsi que l'épuisement des ressources fossiles (comme le pétrole), entraînant une hausse des prix de l'énergie, amènent à se tourner vers des sources d'énergie plus écologiques et renouvelables. L'enjeu énergétique est donc double : démontrer la capacité à remplacer en partie le pétrole tout en émettant peu ou pas de gaz à effet de serre.

Depuis une quarantaine d'années, avec l'organisation du premier Sommet de la Terre à Stockholm en 1972, il y a une prise de conscience et une volonté d'agir sur l'avenir de notre planète. Ces rassemblements décennaux entre dirigeants mondiaux organisés par l'ONU (Organisation des Nations Unies) ont pour but de discuter de la réduction des gaz à effet de serre ainsi que de définir les moyens nécessaires pour stimuler un développement durable au niveau mondial. En 1997, le protocole de Kyoto a été adopté afin d'engager les différentes nations du monde à réduire leurs émissions de gaz à effet de serre. Les points soulevés lors de ces différentes rencontres portent sur une meilleure maîtrise du développement industriel, la réduction des gaz à effet de serre et le développement de sources d'énergie alternatives et écologiques. La **Figure 1** montre l'évolution de la consommation des énergies primaires (pétrole, charbon, gaz naturel, biomasse, hydraulique et nucléaire) dans le monde entre 1973 et 2012.



*Dans ce graphe, la tourbe et le schiste bitumeux sont compris avec le charbon
**Inclus la géothermique, le solaire, l'éolien

Figure 1 : *Répartition des approvisionnements mondiaux en énergie primaire [4].*

En 40 ans, la consommation en millions de tonne équivalent pétrole (Mtep) a plus que doublé en passant de 6 106 Mtep à 13 371 Mtep. Il est intéressant de souligner une sensible diminution de la part du pétrole de 14,7 % entre 1973 (un an avant la première crise pétrolière) et 2012. Cependant, on peut noter que malgré cette diminution, la production de pétrole a presque doublé sur cette même période puisqu'elle était de 2 815 Mtep en 1973 et de 4 200 Mtep en 2012. La diminution de la part du pétrole a été compensée par une augmentation des énergies fossiles (+4,4 % pour le charbon et +5,3 % pour le gaz naturel) et du nucléaire (+3,9 %). La part laissée aux énergies renouvelables (hydraulique, biomasse/déchets et autres) n'a quant à elle que très peu augmenté en passant de 12,4 % (1973) à 13,4 % (2012).

Ces énergies fossiles sont d'autant plus un problème que ces ressources sont épuisables et sont sans substitut en cas de rupture totale d'approvisionnement. Il est donc primordial de trouver de nouvelles sources d'énergie alternatives, pérennes et moins polluantes afin de se détacher peu à peu de notre dépendance aux énergies actuelles.

Pour exploiter de nouvelles énergies plus propres, abondantes et surtout renouvelables, de nouvelles technologies ont été développées avec des sources dont l'origine peut être chimique, physique ou biologique. La principale source d'énergie renouvelable et inépuisable est le soleil. En effet, ses rayonnements sont exploités dans le domaine du photovoltaïque, sa chaleur pour l'énergie solaire thermique et son impact sur les courants marins pour l'énergie houlomotrice et hydrolienne. Les sources éoliennes et hydrauliques sont aussi une alternative intéressante puisqu'elles utilisent le vent et les courants d'eau pour produire de l'énergie.

Toutefois, ces technologies sont dépendantes des conditions naturelles et les rendent ainsi intermittentes. Il existe également la géothermie qui exploite une autre source d'énergie naturelle : la chaleur de la Terre. Le développement et l'amélioration de ces systèmes, notamment au niveau de leurs rendements, est nécessaire afin de palier la demande croissante en énergie. Si l'on prend l'exemple des panneaux solaires, le rendement (part de rayonnement solaire transformée en électricité) moyen actuel est de 14,5 % [5]. Une amélioration de ce rendement permettrait, pour une même surface de panneaux solaires, de produire plus d'électricité et donc de fournir plus d'énergie aussi bien pour les particuliers que pour certaines entreprises. On peut citer les hypermarchés Leclerc qui ont construit des panneaux solaires sur ses parkings afin de subvenir en partie à ses besoins électriques. Ainsi, à défaut de pouvoir remplacer les ressources actuelles, cela permettrait d'en suppléer une partie.

Une autre voie de source renouvelable est le combustible de synthèse. Celui-ci est envisagé afin de remplacer à terme le pétrole. Le combustible le plus étudié est l'hydrogène qui permet de stocker et de distribuer l'énergie tout en étant peu polluant. L'avantage de ce combustible est, lors de sa réaction avec l'oxygène, qu'il ne produit ni de mono et ni de dioxyde de carbone (CO/CO_2), ni d'oxydes d'azote (NO_x) mais seulement de l'eau. L'hydrogène est l'élément le plus abondant dans l'univers (88 % des atomes). Présent en milieu naturel sous forme atomique comme par exemple dans l'eau et les hydrocarbures, il reste néanmoins très rare sous forme moléculaire ou diatomique (dihydrogène H_2). Il est donc nécessaire de produire de l'hydrogène de manière industrielle soit par vaporeformage du gaz naturel, soit par électrolyse de l'eau ou encore à partir de la biomasse et la production de biogaz. L'enjeu de la production d'hydrogène se situe tout aussi bien au niveau de sa production que de son stockage et de sa distribution. En effet, sa faible densité est un inconvénient puisque dans des conditions normales de pression et de température, un kilo d'hydrogène correspond à un volume de 11 250 litres et demande donc de grands volumes pour le stockage. Un fort intérêt pour les dispositifs utilisant l'H_2 comme comburant, tel que les piles à combustibles, est donc né au cours des dernières décennies. Il s'inscrit comme un élément clé pour le développement de la filière hydrogène du fait de leur capacité à utiliser cet élément pour convertir électrochimiquement l'énergie chimique en électricité tout en ne produisant que de l'eau [6].

2. Des piles à combustibles aux biopiles

2.1. Généralités

Une pile à combustible (PAC) est un système électrochimique permettant de convertir une énergie chimique en électricité. Cette électricité est produite par l'oxydation d'un combustible (tel que l'hydrogène) au niveau d'une électrode, l'anode, et la réduction d'un comburant (tel que l'oxygène) au niveau de la cathode. Ces réactions d'oxydo-réduction permettent de produire des électrons au niveau de l'anode. Six types de PAC sont recensés :

- Piles à combustible à méthanol direct : DMFC (*Direct Methanol Fuel Cell*)
- Piles à combustible à membrane échangeuse de protons : PEMFC (*Proton Exchange Membrane Fuel Cell)*
- Pile à combustible alcaline : AFC (*Alkaline Fuel Cell*)
- Pile à combustible à acide phosphorique : PAFC (*Phosphoric Acid Fuel Cell*)
- Pile à combustible à carbonate fondu : MCFC (*Molten Carbonate Fuel Cell*)
- Pile à combustible à oxyde solide : SOFC (*Solide Oxide Fuel Cell*)

Ces PACs se différencient par la nature de leur combustible, de leur électrolyte et de leur température de fonctionnement comme reporté sur la **Figure 2**.

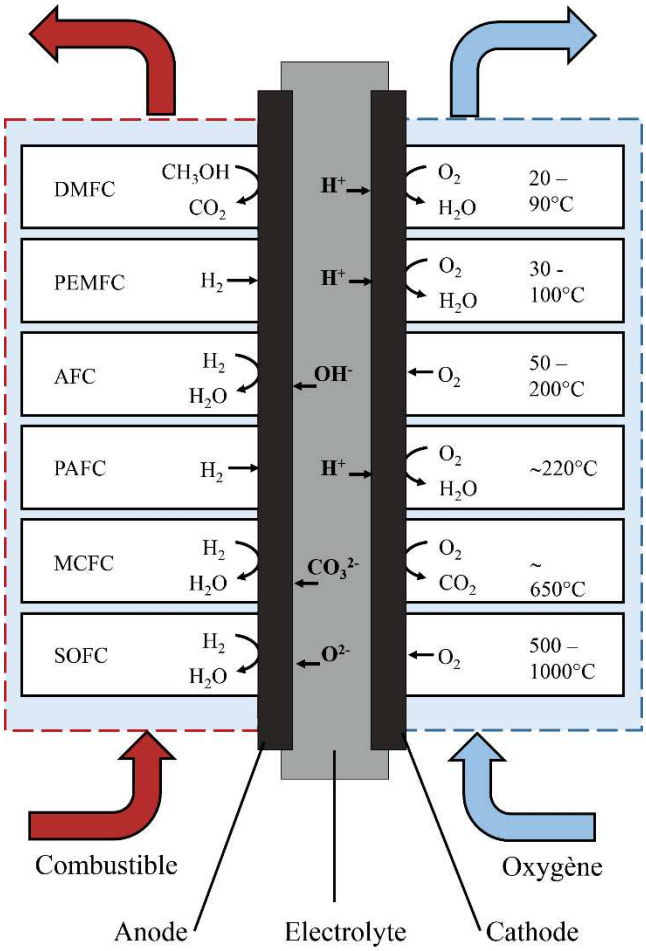


Figure 2 : *Les différents types de PACs associées à leurs températures de fonctionnement, leurs combustibles et leurs électrolytes [7].*

A partir de la **Figure 2**, il est possible de classer les PACs selon trois catégories dépendantes de leurs températures de fonctionnement :

- Basses températures (20 – 100°C) : DMFC, PEMFC, AFC
- Moyennes températures (~ 220°C) : PAFC
- Hautes températures : MCFC (650 °C) et SOFC (500 – 1000°C)

Selon les PACs, les gammes de puissance ne sont pas les mêmes. Du fait de ces différences, les applications dédiées varient d'une PAC à une autre. Les plus développées actuellement sont les PACs basses températures. Les différentes applications ainsi que les différentes gammes de puissance des piles à combustible sont reportées dans le **Tableau 1**.

Applications	**Equipements électroniques portables**	**Voitures, bateaux, cogénération domestique**	**Production d'électricité distribuée, cogénération, autobus**
Puissance en Watt	1 10 100	1 k 10 k 100 k	1 M 10 M
Principaux avantages	Plus grande densité d'énergie que les batteries, recharge plus rapide	Aucune émission, grande efficacité	Grande efficacité, peu de pollution, silencieux
Gamme d'applications des piles à combustible	DMFC ↔	AFC ↔	MCFC ↔
		SOFC ↔	
	PEMFC ↔		
		PAFC ↔	

***Tableau 1** : Applications et principaux avantages de piles à combustible de différents types et dans différentes applications [7].*

Parmi toutes ces piles à combustible, une catégorie se distingue de par son utilisation à basse température (60-100°C) et sa gamme d'application allant des équipements électriques portable (téléphones, ordinateur…) à l'automobile : ce sont les piles à combustible à membrane échangeuse de protons.

2.2. Principe de fonctionnement des piles à combustible à membrane échangeuse de protons

Les piles à combustible à membrane échangeuse de protons permettent donc de transformer directement une énergie chimique en énergie électrique. Ces piles sont composées d'un compartiment anodique (dans lequel se trouve l'anode qui catalyse la réaction d'oxydation) séparé d'un compartiment cathodique (dans lequel se trouve la cathode qui catalyse la réaction de réduction) par une membrane échangeuse de protons comme représenté sur la **Figure 3**.

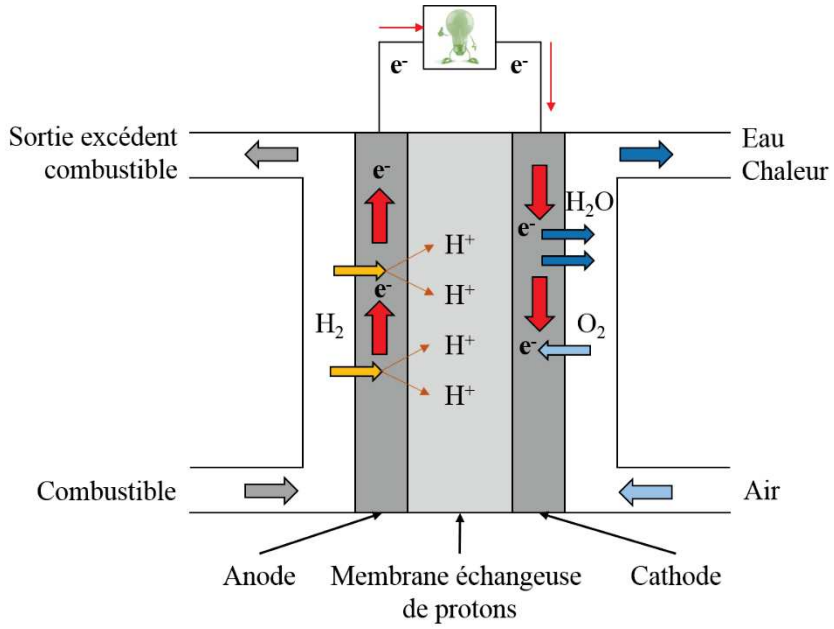


Figure 3 : *Schéma du principe de fonctionnement d'une PEMFC [8].*

La réaction d'oxydation de l'hydrogène (**Équation 1**) se situe au niveau de l'anode comme représenté sur la **Figure 3** :

$$H_2 \rightarrow 2H^+ + 2e^-$$ **Équation 1**

L'oxydation du dihydrogène produit deux protons et deux électrons par molécule de dihydrogène. Les protons sont ensuite transférés à la cathode par la membrane échangeuse de protons tandis que les électrons sont transportés de l'anode vers la cathode par un circuit électrique. Les électrons vont réduire l'oxygène, au niveau de la cathode, pour former de l'eau (**Équation 2**) :

$$4H^+ + 4e^- + O_2 \rightarrow 2H_2O$$ **Équation 2**

L'échange d'électrons entre l'anode et la cathode produit ainsi du courant. Un catalyseur situé sur les électrodes est toutefois nécessaire pour augmenter les vitesses de réaction d'oxydo-réduction et améliorer les performances des piles à combustibles au démarrage. Le catalyseur le plus couramment utilisé est de type métallique : le platine.

Actuellement, ce type de PAC est largement envisagé dans le domaine de l'automobile du fait de leur faible impact sur l'environnement (pas de rejet de gaz à effet de serre) [9], [10], de leurs rendements énergétiques élevés (de l'ordre de 60 %) [6], [11] et dans une moindre mesure, de faibles émissions sonores puisqu'elles n'ont pas de pièces mobiles (40 à 50 dB).

Cependant, de nombreux problèmes persistent dans le développement et l'optimisation des piles à combustible et notamment pour le secteur de l'automobile. Du fait de l'utilisation du platine comme catalyseur, les coûts de fabrication restent très élevés. En effet, le platine représente 25 % du coût total d'une pile à combustible [12] et son prix est de l'ordre de 25 € / g. Ce prix risque encore d'augmenter puisque le platine se fait rare et que son coût de recyclage est élevé. Aussi, la recherche tend de plus en plus à diminuer le pourcentage de platine dans la fabrication des électrodes en arrivant à des valeurs de ~0,15 mg/cm² en 2011 et en visant une valeur de 0,125 mg/cm² en 2020 [13]. Pour atteindre ces valeurs, le platine est déposé sous forme de fines couches sur des matériaux carbonés qui vont constituer les électrodes [14]. Néanmoins, l'utilisation de ce catalyseur reste toujours une barrière majeure en raison de sa rareté. Une possibilité serait de le remplacer par des matériaux carbonés (nanotubes de carbone, graphène, nanofibres de carbone), dépourvus de métaux [15]. Le deuxième verrou technologique concerne la durabilité de telles piles à combustibles. En effet, les électrodes et les membranes se dégradent à long terme. Alors que l'industrie requiert un temps de vie de 5000 heures dans le cas des véhicules légers, la plupart des PACs présentent une diminution des performances de 34 % au bout d'un millier d'heures [14]. Enfin, des problèmes liés à une contamination au niveau de l'anode par du monoxyde de carbone persistent toujours. Le monoxyde de carbone peut être présent dans les flux d'hydrogène lorsque le carburant est obtenu par reformage d'hydrocarbures liquides ou de carburants à alcool. Ce monoxyde de carbone s'adsorbe alors sur le platine et empêche ainsi l'oxydation de l'hydrogène. Une quantité de 50 ppm (partie par million) de monoxyde de carbone est suffisante pour contaminer l'électrode [14].

Dans le but de remplacer ce catalyseur onéreux qu'est le platine, la recherche se tourne vers l'utilisation de catalyseurs biologiques. Ces biopiles à combustibles vont donc utiliser soit des enzymes soit des bactéries organisées sous forme de biofilm pour catalyser les réactions d'oxydo-réduction aux surfaces des électrodes.

Même si la technologie des piles à combustible biologique se base sur celle des piles à combustibles classique, les applications visées ne sont pas les mêmes en raison des différences de puissances produites. La gamme de puissance des PACs (de 200 kW à 2 MW) vise des applications dans le secteur de la motorisation (voitures, bateaux…) et comme source d'alimentation en cas de panne électrique. A l'inverse, les biopiles enzymatiques délivrent une puissance de l'ordre de quelques mW permettant ainsi d'alimenter de petits appareils électroniques (comme un lecteur MP3) [16], [17] ou encore des appareils médicaux implantables dans le corps humain [18]. De plus, contrairement aux catalyseurs métalliques, les enzymes catalysent des réactions spécifiques ce qui permet de diminuer le problème des réactions parasites et permet de travailler sans membrane de séparation [19]. Dans le cas des biopiles microbiennes, elles peuvent, en plus de produire de l'électricité, permettre le traitement des effluents. Le coût de ces deux types de catalyseurs est aussi à prendre en compte puisque les enzymes et les microorganismes ont un coût plus faible et sont totalement biodégradables, donc respectueux de l'environnement. De plus, les biopiles peuvent utiliser des carburants, comme par exemple le glucose, dont le coût est négligeable comparé à celui de l'hydrogène pur. Enfin, les températures de fonctionnement ne sont pas les mêmes puisque les biopiles ont des températures de fonctionnement en-dessous de 40 °C alors que les PACs traditionnelles opèrent à des températures allant jusqu'à 1 000 °C.

Les objectifs de ce travail portent sur la construction et la caractérisation de biopiles microbiennes en raison de leurs stabilités et des puissances générées. Les biopiles enzymatiques issues de l'utilisation directe d'enzymes immobilisées sur électrode ne seront pas détaillées ici.

3. Concept de biopiles microbiennes

Les piles à combustible microbiennes (PACM) utilisent comme biocatalyseur des microorganismes représentés le plus souvent par des bactéries. Le courant généré appelé bioélectricité, provient de l'oxydation de matière organique ou inorganique.

3.1. Historique

Le concept de biopile microbienne est apparu en 1911 avec les travaux de M. C. Potter, professeur de botanique à l'Université de Durham (Grande Bretagne) lorsqu'il a mesuré pour la première fois un courant électrique généré à partir de levures (*Saccharomyces cerevisiae)* et de bactéries (*Escherichia coli*) [3]. Au début des années 1930, B. Cohen confirma ces résultats.

Il connecta en série des biopiles à combustible et obtint une tension de 35 V pour un courant de 2 mA [20]. Mais c'est surtout au début des années 1960 que le développement des biopiles s'est accentué. La NASA s'est intéressée à cette technologie afin de recycler les déchets organiques accumulés au cours de séjours spatiaux tout en produisant de l'électricité [21], [22]. Cependant, cette technologie est peu à peu délaissée en raison des faibles coûts des énergies fossiles jusqu'aux chocs pétroliers (1973 et 1979). C'est au cours des années 1980 qu'un regain d'intérêt est suscité. En effet, Benetto et Allen ont démontré que l'ajout d'un médiateur électrochimique permettait d'améliorer le transfert d'électrons et donc d'augmenter les capacités des biopiles [23]–[25]. Cependant, la véritable percée dans les biopiles microbiennes a eu lieu en 1999 lorsqu'il a été montré que l'utilisation d'un médiateur n'était pas indispensable au transfert d'électrons [26], [27].

Plus d'un siècle après la découverte de la capacité de micro-organismes à catalyser et générer de l'électricité, le domaine des PACMs est en plein essor depuis une dizaine d'années comme l'atteste le nombre de travaux publiés qui a quadruplé de 2006 à 2015 (**Figure 4**).

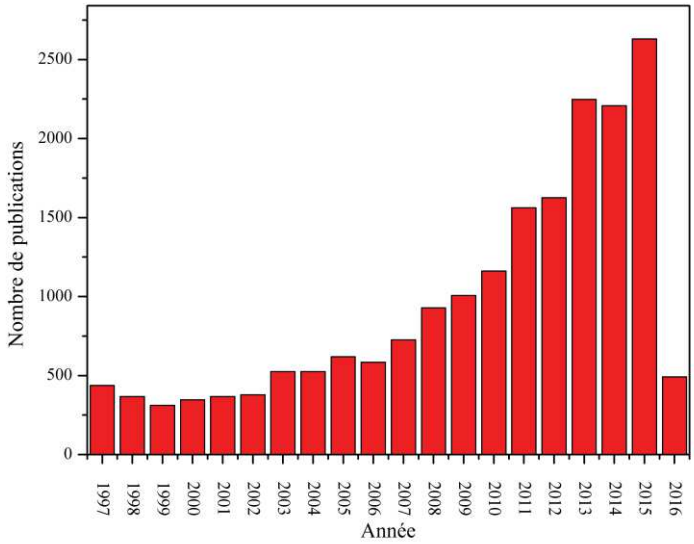


Figure 4 : *Evolution du nombre de publications pour le terme "Microbial Fuel Cell" dans la littérature depuis 1997 (d'après Science Direct – Décembre 2015).*

Le domaine des PACMs met en synergie différentes disciplines qui sont l'électrochimie, la microbiologie et l'ingénierie des procédés.

3.2. <u>Principe de fonctionnement d'une pile à combustible microbienne.</u>

Comme il a été vu précédemment, la différence entre une pile à combustible et une pile à combustible microbienne se situe au niveau du catalyseur qui est d'origine biologique. Des microorganismes, présents à la surface de l'électrode sous forme de biofilm, oxydent un substrat carboné (comme l'acétate, le glucose, l'acide lactique…). Les électrons produits sont alors transférés vers un accepteur d'électrons, en l'occurrence l'électrode (**Figure 5**). Différents types de transfert d'électrons peuvent avoir lieu : le transfert médié (qui nécessite un médiateur exogène ou produit par les bactéries elles-mêmes) et le transfert direct.

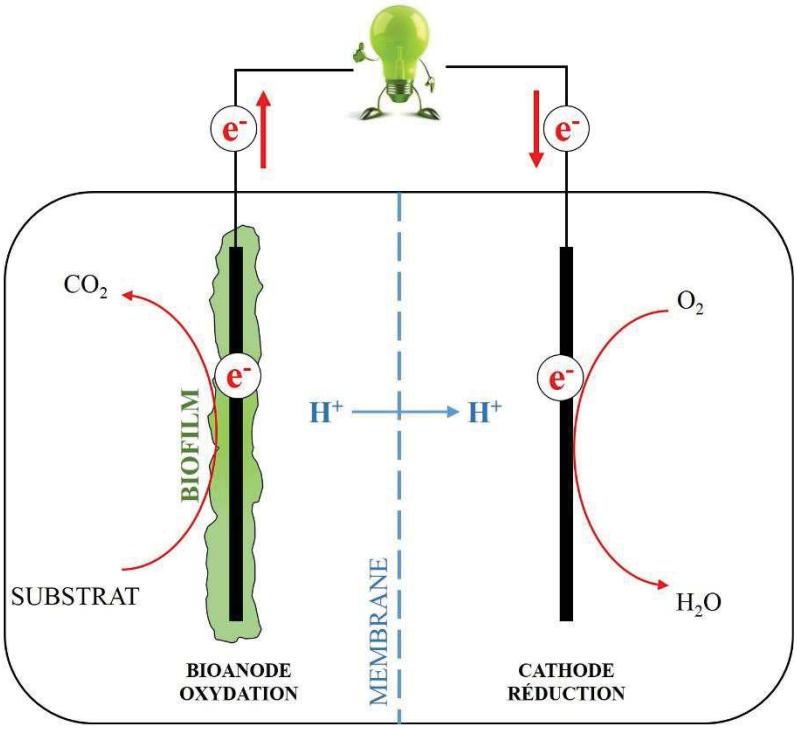


Figure 5 : *Schéma du principe de fonctionnement d'une biopile microbienne avec une anode biologique et une cathode abiotique.*

Dans le cas de l'utilisation d'acétate comme substrat carboné à la bioanode, la réaction d'oxydation (**Équation 3**) suivante va se produire au niveau du biofilm [28] :

$$CH_3COO^- + 2H_2O \rightarrow 2CO_2 + 7H^+ + 8e^-$$ **Équation 3**

Tandis qu'au niveau de la cathode abiotique la réduction de l'oxygène s'effectue selon (**Équation 4**) :

$$O_2 + 4e^- + 4H^+ \rightarrow 2H_2O$$ **Équation 4**

L'oxydation du substrat par les microorganismes au niveau de l'électrode produit du dioxyde de carbone, des protons et des électrons. Les électrons sont transférés *via* le biofilm au niveau du matériau d'électrode et *via* un circuit électrique au niveau de la cathode. Dans le

même temps, les protons passent du compartiment anodique au compartiment cathodique à travers une membrane échangeuse de protons (de type Nafion® 117). L'électroneutralité est ainsi respectée entre les deux compartiments en raison d'un transfert de charge équivalent. Au niveau de la cathode, les électrons réduisent l'oxygène présent dans le compartiment pour former de l'eau en présence de protons.

Il est important de noter que la population de microorganismes présente à la surface de l'électrode doit être électroactive, c'est-à-dire qu'elle est capable de transférer les électrons au niveau de l'anode. C'est tout l'enjeu de la croissance et du développement du biofilm bactérien.

4. Les biofilms

Dans l'environnement, les microorganismes se développent sous deux formes : une forme libre ou planctonique, et une forme sessile ou attachée à un support. Le mode de vie planctonique permet aux microorganismes de proliférer et de coloniser de nouvelles niches environnementales par adhésion à une surface. Cette forme planctonique n'est que transitoire puisque plus de 99% des cellules sont sous forme sessile [29]. L'immersion de n'importe quel type de matériau dans l'eau se traduit après un séjour de quelques semaines par l'apparition d'un gel visqueux en surface. Ce gel constitué de microorganismes enveloppés d'une matrice exopolymérique hautement hydratée, visqueuse et élastique, correspond à un biofilm, terme proposé par J.W. Costerton en 1978 [30]. Dans cet ensemble, les microorganismes ne représentent que 2 à 15 % du volume total, le reste correspond à une matrice exopolymérique constituée en majorité de sucres (entre 40 et 95 % de la masse de la matière sèche), mais aussi de lipides (< 1 - 40 %), de protéines (< 1 - 60 %), d'acides nucléiques extracellulaires (< 1 - 10%) et des matières minérales.

Un biofilm se caractérise par une structure hétérogène composée de régions denses, c'est-à-dire de microcolonies engluées dans une matrice, et de régions moins denses constituées de canaux d'eau qui relient les microcolonies entre elles et assurent le transfert des substrats et des produits du métabolisme. L'hétérogénéité de structure est due aussi à la présence de différentes espèces, procaryotes et eucaryotes, et de différentes sous-populations d'une même espèce. Ces différentes sous-populations sont engendrées par l'existence de micro-environnements dus aux gradients de substrats/métabolites entre la surface et la base de la matrice.

4.1. Formation et croissance d'un biofilm

Le processus de formation d'un biofilm est composé de cinq étapes distinctes. Prenons comme exemple la formation d'un biofilm bactérien, celui de *Pseudomonas aeruginosa* (**Figure 6**).

Une étape préliminaire est l'établissement d'un film primaire conditionnant la surface et facilitant l'attachement des bactéries. C'est un phénomène rapide n'excédant pas quelques heures. Durant cette première phase, les molécules organiques et inorganiques présentes dans le milieu se déposent sur la surface. Cette accumulation de molécules à l'interface liquide/solide modifie les propriétés de surface du support et permet une concentration de nutriments.

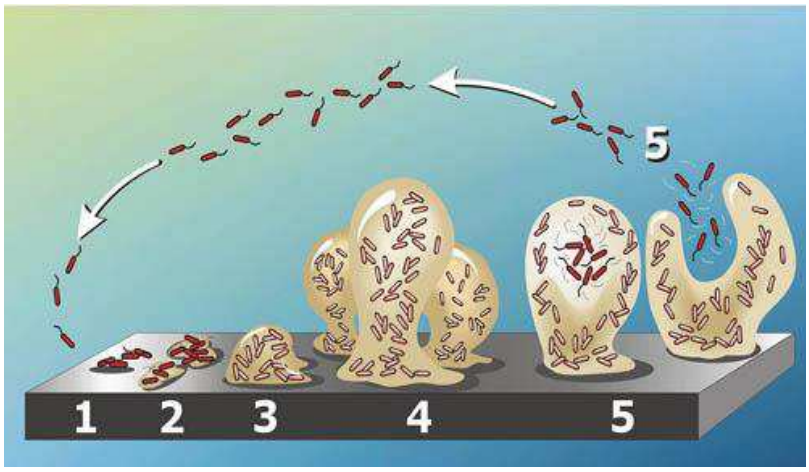


Figure 6 *: Etapes de formation d'un biofilm selon Costerton* [31].

- Etape 1 : Adhésion réversible des micro-organismes sur la surface

Cette étape correspond au transport ou au déplacement des microorganismes vers une interface liquide/solide. Elle dépend de la composition du milieu (viscosité, force ionique) et des mouvements des microorganismes. Lorsque les forces de cisaillement sont nulles ou faibles (en condition statique ou en écoulement laminaire) les microorganismes peuvent s'approcher de la surface par différents mécanismes :

- ❖ Actifs : les cellules se déplacent grâce à des appareils locomoteurs comme les flagelles (structures fines de 10 µm de long) vers un support ou vers des substances nutritives. Il s'agit alors du chimiotactisme, c'est-à-dire du déplacement des cellules en réponse à un gradient de concentration de substrats. La motilité flagellaire n'est toutefois pas nécessaire pour l'attachement et l'adhésion d'un biofilm
- ❖ Passif : les cellules s'attachent au support par sédimentation qui est menée soit par un mouvement brownien soit par des mouvements de convection du milieu.

Cette première étape conduit à l'adsorption réversible et non-spécifique des cellules à une surface. L'attachement primaire à une surface est sous l'influence de nombreux facteurs : pH,

osmolarité du milieu, température, propriétés de surface du matériau (charge, hydrophobicité, rugosité). Cette adhésion fait intervenir des interactions de faible énergie de type van der Waals, électrostatique, des interactions hydrophobes et acide-base de Lewis, dépendant de l'état de surface du support.

Pendant cette phase initiale, les bactéries subissent encore un mouvement brownien et peuvent se détacher facilement sous l'action de contraintes hydrodynamiques.

- Etape 2 : Adhésion irréversible et production de polymères extracellulaires

L'adhésion irréversible, quant à elle, correspond à une fixation active et spécifique des cellules sur une surface. Cette fixation est assurée par des structures d'adhésion et des molécules pariétales spécifiques. On peut ainsi citer les pili ou fimbriae de type I, les curli (chez les bactéries à Gram négatif), les structures pariétales particulières comme des capsules et du glycocalix (chez les bactéries à Gram positif et négatif). La fixation des cellules, au support et entre-elles, est renforcée d'une part par la synthèse de molécules de surface spécialisées, les exopolysaccharides, l'adhésine, le lipopolysaccharide A (pour les surfaces hydrophobes) et le lipopolysaccharide B (pour les surfaces hydrophiles) [32] et d'autre part par les interactions ioniques avec les groupements phosphate $-PO_4^{2-}$ et carboxyle $-COO^-$. Cette matrice d'exopolymères peut représenter jusqu'à 75 – 95 % du volume d'un biofilm mature [33].

- Etape 3 et 4 : Maturation et croissance du biofilm

Dès que l'attachement au support devient irréversible, le biofilm entame une phase dite de maturation qui se traduit par des changements dans l'expression des gènes engendrant un changement marqué du phénotype des cellules par rapport à celui des formes planctoniques. Par exemple, au cours de la formation d'un biofilm d'*Escherichia coli*, l'expression de 22 % des gènes est stimulée et 16 % des gènes sont réprimés. Ces changements entrainent :

- une synthèse accrue des substances exopolymériques (exopolysaccharides),
- des variations dans l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme énergétique qui s'explique par la répartition des cellules au sein du biofilm et la limitation de l'oxygène dans les zones les plus proches du support,
- dans la mobilité qui se traduit par une perte des flagelles,
- la mise en place de mécanismes d'adaptation et de défense / réponse générale au stress régulée par le facteur RpoS.

Suite à cette étape, la croissance des bactéries se caractérise par la formation d'un biofilm plus épais [34]. Lors de cette croissance, des micro-canaux se forment afin de permettre la circulation des substrats comme l'oxygène dissous et les micronutriments [35]. La structuration des biofilms est souvent contrôlée par des phénomènes de *Quorum sensing*[1]. Une fois le biofilm mature, son épaisseur se stabilise.

- Etape 5 : Détachement du biofilm

Lorsque l'épaisseur maximale du biofilm est atteinte ou lors de changements environnementaux comme une limitation en oxygène, le biofilm subit des phénomènes de dispersion, c'est-à-dire que les formes planctoniques sont relarguées dans le milieu extérieur et peuvent de nouveau coloniser de nouvelles surfaces. La libération des cellules à partir du biofilm peut se faire de plusieurs façons :

- De façon passive par érosion, par relargage (détachement massif et rapide de quantités importantes de cellules).
- De façon active due à des remaniements de l'expression de certains gènes spécifiques comme par exemple l'induction de répresseurs provoquant l'arrêt de la synthèse de matériaux constitutifs du biofilm (polysaccharides), ou l'expression d'enzymes dégradant la matrice.

L'expression des gènes responsables de la formation et de la dispersion du biofilm est contrôlée par des mécanismes de *Quorum sensing*.

Une fois formés, les biofilms peuvent néanmoins présenter un certains nombres d'aspects négatifs.

4.2. Les aspects négatifs des biofilms

[1] *Quorum sensing* : capacité qu'a une bactérie à communiquer et à coordonner son comportement avec les autres bactéries d'une même colonie en utilisant des molécules de signalisation. Grâce au quorum sensing, les bactéries d'une même espèce coordonnent certains comportements ou actions entre elles, en fonction de leur nombre. Dans le cas des bactéries opportunistes, comme *Pseudomonas aeruginosa,* elles peuvent croître dans l'organisme hôte sans effets pathogènes jusqu'à ce qu'elles atteignent une certaine concentration. Ces bactéries deviennent alors agressives et leur nombre suffit à dépasser le système immunitaire hôte et à former un biofilm, entraînant la maladie.

Les biofilms permettent aux microorganismes de se maintenir dans une niche écologique protégée et de résister ainsi à de nombreux stress environnementaux : pH, oxygène, dessiccation et composés antimicrobiens. Les biofilms sont identifiés comme la source de lourds problèmes industriels et de santé publique.

Dans le domaine médical, la formation de biofilms est source de nombreuses infections chez l'homme. Il est acquis que 65 % des infections bactériennes chez l'homme impliques des biofilms. Ces biofilms peuvent se former au niveau du matériel médical (seringues, cathéters, prothèses, implants…) ou sur des tissus biologiques (yeux, oreilles, poumons, dents…) [35]. Une des souches les plus étudiées dans le domaine médical est *Pseudomonas aeruginosa* qui est responsable, entre autres, d'infections pulmonaires chroniques chez les patients atteints de mucoviscidose.

En milieu industriel, et plus particulièrement dans le secteur des industries agroalimentaires, ces biofilms peuvent conduire à la dégradation des qualités organoleptiques des produits et au développement de toxi-infections alimentaires du fait de l'accumulation de pathogènes à la surface des équipements sur tous types de matériaux (métaux, polymères, ciments…). Ils engendrent également une diminution des flux des liquides par un encrassement des conduites ainsi qu'une diminution des capacités d'échange thermique par la formation de couche isolante dans les échangeurs thermiques.

En milieu marin, ils sont responsables de la corrosion des matériaux, du colmatage des canalisations, de l'augmentation significative du poids des navires et des bouées, de l'augmentation des forces de frottement des navires induisant une surconsommation de carburant et des émissions de CO_2.

Enfin la formation de ces biofilms a un impact sur l'environnement puisque leur élimination nécessite l'utilisation de biocides et d'anti-adhésifs, composés nocifs et qui polluent l'eau et les sols.

Néanmoins, les biofilms ont aussi des aspects positifs et sont même nécessaires dans l'environnement.

4.3. Les aspects positifs des biofilms

Les biofilms jouent un rôle majeur dans le recyclage des nutriments dans les sols. Dans le cas de la biominéralisation des eaux issues des nappes souterraines, ils permettent la fixation de l'azote et du carbone [36].

Ils participent également à la dégradation de polluants par des réactions d'oxydo-réduction, c'est-à-dire à la transformation ou la neutralisation de matières organiques et inorganiques indésirables ou toxiques : on parle alors de bioremédiation [37]. A titre d'exemple, le perchlorate peut être réduit en eau et en chlore ; les nitrates et les phosphates sont dégradés.

Les biofilms peuvent également être mis à profit en catalysant des réactions d'oxydo-réduction lors de la dégradation de matière organique ou inorganique et ainsi permettre la production d'électricité. En effet, parmi ces biofilms, certains sont dits électroactifs, c'est-à-dire qu'ils sont capables de transférer les électrons à un substrat solide.

5. Biofilms électroactifs et transferts extracellulaires d'électrons

De manière générale, le principe d'électroactivité est toujours le même. La bactérie, en absence de son accepteur final d'électrons naturel utilise pour le remplacer une électrode, participant ainsi à la génération d'un courant électrique. Par exemple, *Geobacter sulfurreducens*, qui est une des bactéries les plus étudiées dans ce domaine, utilise en culture de laboratoire l'acétate comme donneur d'électrons et le fumarate comme accepteur final d'électrons. Si l'on ne fournit que l'acétate à la bactérie, elle est capable d'utiliser l'électrode comme accepteur final d'électrons en remplacement du fumarate.

Une des premières étapes dans l'étude de l'interaction bactérie-anode a été de comprendre que les bactéries électroactives utilisent un métabolisme respiratoire à l'anode [38], [39].

5.1. Respiration des microorganismes électroactifs

Les microorganismes électroactifs utilisent un métabolisme respiratoire à l'anode afin de produire de l'énergie à partir de l'oxydation de substances organiques comme les sucres, les lipides, les protéines et leurs dérivés [38], [39]. Le métabolisme respiratoire est un ensemble de réactions enzymatiques ordonnées qui oxydent progressivement ces composés en CO_2. L'énergie produite est stockée sous forme d'Adénosine Tri Phosphate (ATP) et son rôle principal est de fournir de l'énergie nécessaire aux réactions chimiques des cellules. Il existe deux sources d'ATP : la première est formée au niveau du substrat et la deuxième au niveau de la chaîne de transport des électrons, c'est-à-dire lors de la phosphorylation oxydative de l'ADP en ATP grâce à l'énergie libérée par l'oxydation de donneurs d'électrons de la chaîne respiratoire. La **Figure 7** représente la métabolisation de l'acétate chez les microorganismes électroactifs.

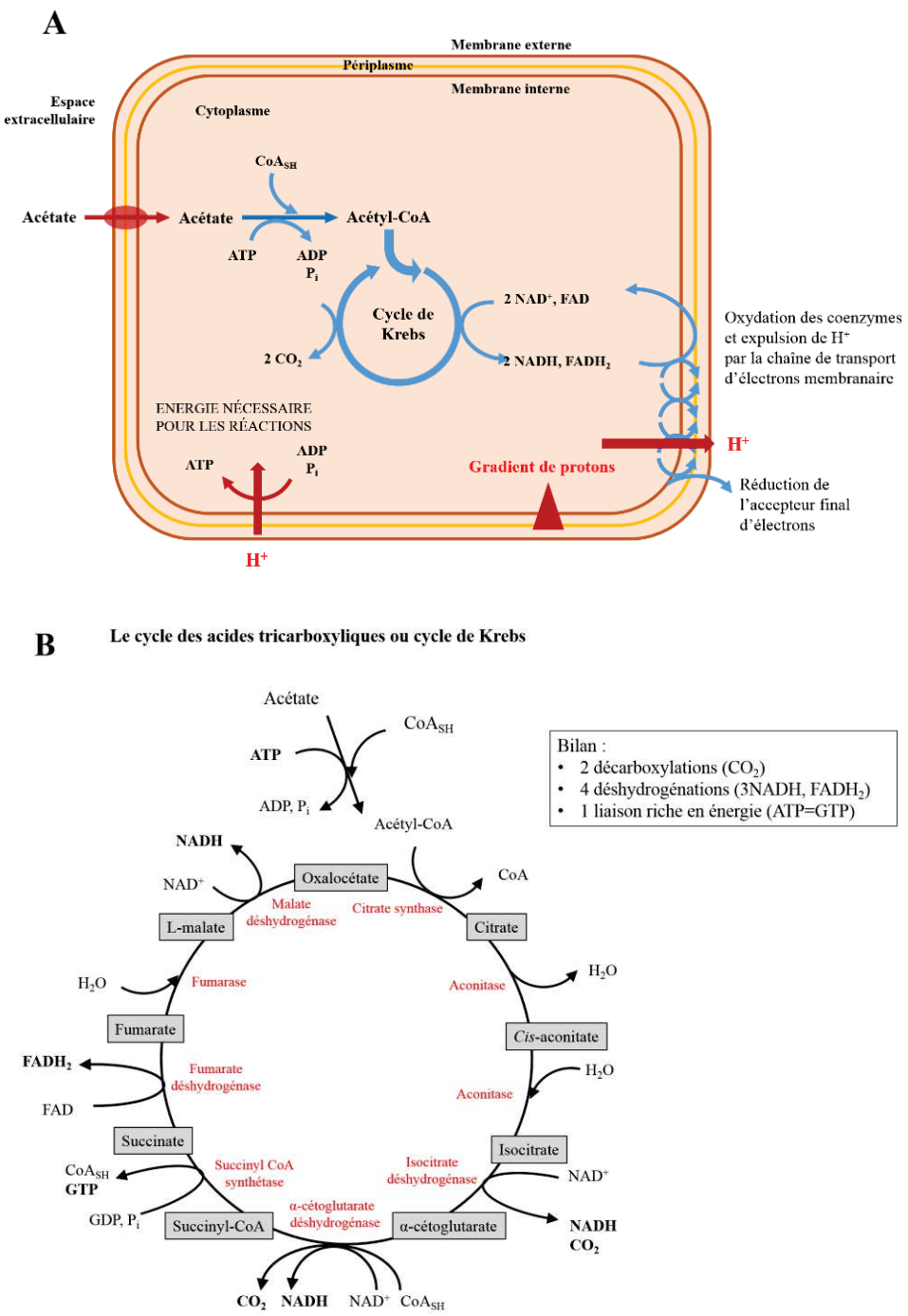


***Figure** 7 : (A) Schéma de la métabolisation de l'acétate chez les microorganismes électroactifs* [40] *et (B) schéma du cycle de Krebs.*

Plusieurs étapes de la voie métabolique sont nécessaires pour oxyder les composés chimiques. L'oxydation de l'acétate, substrat le plus communément utilisé dans le cas des bioanodes microbiennes, est représentée en **Figure 7.A**. L'acétate traverse les membranes de la bactérie. Dans le cytoplasme, l'acétate est converti en acétyl-coenzyme A par réaction avec une coenzyme A et de l'ATP. Cet intermédiaire réactionnel subit ensuite une oxydation complète *via* une voie métabolique cyclique constituée de huit réactions appelée le cycle de Krebs

(**Figure 7.B**) dont quatre qui sont des réactions d'oxydation couplées à la réduction de coenzymes. Ces coenzymes, NADH et $FADH_2$, sont réoxydées au niveau de la chaîne de transport d'électrons transmembranaire qui génère de l'ATP par phosphorylation oxydative. Elles permettent ainsi le transfert des électrons à une série de complexes protéiques et de relais redox situés dans la membrane jusqu'à un accepteur final d'électrons. L'expulsion de protons se fait au cours du transport des électrons à travers la chaine ce qui crée un gradient de proton.

Ce gradient de protons est utilisé pour créer une force proton-motrice fournissant l'énergie nécessaire à la synthèse d'ATP. Cette réaction est appelée phosphorylation oxydative et permet de créer la source d'énergie (ATP) universellement utilisée par les êtres vivants.

Lors de la respiration aérobie, l'accepteur final d'électrons est le dioxygène dissous dans le milieu intracellulaire. Dans le cas des bactéries électroactives, l'accepteur final d'électrons est un substrat solide : l'électrode. Le transfert d'électrons peut se faire de façon directe mais dans certains cas la captation des électrons par l'électrode nécessite l'intervention d'une molécule intermédiaire, un médiateur, et se fait de façon indirecte. Il est important de comprendre ces mécanismes puisqu'ils sont au cœur du fonctionnement des biopiles microbiennes.

5.2. Les mécanismes

Le premier type de transfert d'électrons présenté est le transfert indirect. Ce type de transfert fait intervenir des médiateurs qui permettent de transporter les électrons par des réactions d'oxydo-réduction.

5.2.1. Transfert indirect

On retrouve deux sortes de médiateurs : les médiateurs chimiques artificiels, appelés exogènes, et les médiateurs sécrétés par les microorganismes qui sont appelés endogènes.

- Transfert indirect par des médiateurs exogènes :

Dans le cas où le transfert direct d'électrons ne peut être assuré, l'utilisation de médiateurs devient nécessaire. Les médiateurs chimiques (exogènes) sont des couples redox qui permettent de transporter les électrons des bactéries à la surface de l'électrode (**Figure 8**).

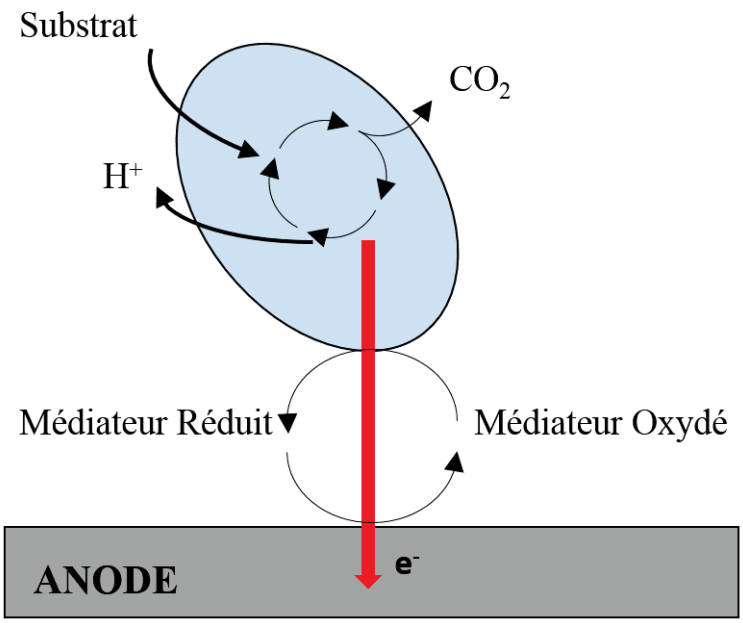


Figure 8 : *Schéma du mécanisme de transfert d'électrons par médiateur exogène* [41].

Lorsque ces médiateurs sont utilisés à l'anode, les bactéries sont capables de les réduire au niveau de leurs membranes puisque la chaîne de transport d'électrons est située dans la membrane plasmique. Le médiateur sous forme réduite peut ensuite être ré-oxydé au contact de l'électrode, phénomène assurant le transfert d'électrons entre les bactéries et l'anode. Les médiateurs sont souvent utilisés pour les souches *Escherichia coli* [42], *Proteus vulgaris* [43], *Actinobacillus succinogenes* [42], *Erwinia dissolvens*, *Pseudomonas* et *Bacillus* [44] qui sont connues pour leur incapacité à transférer directement les électrons à l'anode. Ce mécanisme a été décrit par Cohen en 1931 qui, afin de palier un manque de produits actifs permettant l'oxydo-réduction, proposa d'introduire un composé inorganique tel que le ferricyanure de potassium ou la benzoquinone pour faciliter le transfert d'électrons entre les bactéries et l'électrode [20]. Dans les années 1980, ces travaux ont été repris par Benetto et al [45] et depuis, de nombreux médiateurs exogènes ont été testés dont la majorité sont des phénazines, phénothiazines et des quinones.

Le **Tableau 2** donne quelques exemples de PACMs qui utilisent des médiateurs électrochimiques.

Souche	Substrat	Médiateur	Anode	Densité de courant	Tension (V)	Puissance et densité de puissance	Réf.
Erwinia dissolvens	Glucose	Fer chélaté	Tissu de carbone	< 89,2 µA	< 0,05	4,5 µW	[46]
Lactobacillus plantarum				< 89,2 µA	< 0,05	4,5 µW	
Streptococcus lactis				714,3 µA	0,4	0,286 mW	
Saccharomyces cerevisae	Glucose	Aucun	Carbone	533,3 mA/m²	-	30,8 mW/m²	[47]
		Bleu de méthylène		1115 mA/m²	-	103,8 mW/m²	
Saccharomyces cerevisae	Glucose	Aucun	Graphite	-	-	3 mW/m²	[48]
		Thionine		400 mA/m²	-	60 mW/m²	
Escherichia coli	Glucose	Rouge neutre	Feutre de graphite tissé	4,5 mA	0,68	3,06 mW	[42]
Escherichia coli	Glucose	New methylene blue (NBM)	Papier de carbone	1287,5 mA/m²	0,598	263,94 mW/m²	[49]

		Bleu de méthylène		-	-	31,77 µW	
Escherichia coli	Sucrose	2-hydroxy-1,4-naphthoquinone (HNQ)	Fibre de carbone	-	-	29,83 µW	[50]
		Thionine		-	-	28,84 µW	
		Bleu de Meldola		-	-	26,12 µW	
		Rouge Neutre		-	-	12,73 µW	
Escherichia coli				44,05 mA/m²	-	22,27 µW	
Desulfovibrio desulfuricans	Sucrose	Bleu de méthylène	Fibre de carbone	67,41 mA/m²	-	45,50 µW	[50]
Geobacter sulfurreducens				21,16 mA/m²	-	4,62 µW	

Tableau 2 *: Tableau récapitulatif des caractéristiques obtenues dans des piles à combustible microbiennes utilisant des médiateurs électrochimiques.*

Ce tableau montre clairement que la présence d'un médiateur augmente les performances de la biopile microbienne. Dans le cas de la levure *S. cerevisae*, avec une électrode anodique en carbone et en absence de médiateur, la densité de puissance obtenue est de 30,8 mW/m². Lorsque du bleu de méthylène est ajouté, la puissance augmente à 103,8 mW/m². Il est aussi intéressant de remarquer que la nature du médiateur mis en jeu fait aussi varier les valeurs obtenues. Dans les mêmes conditions, l'utilisation de rouge neutre pour le cas de *E. coli* apparait être moins efficace que l'utilisation de bleu de méthylène avec des puissances respectives de 12,73 µW et de 31,77 µW.

L'utilisation de ces médiateurs redox présente néanmoins un certain nombre d'inconvénients. D'une part les applications liées aux PACMs sont généralement en continu, ce qui nécessite un renouvellement des médiateurs qui augmente le coût d'utilisation des PACMs et d'autre part du fait de leur toxicité, des questions se posent sur l'impact écologique de ce genre d'ajouts. Ils ne peuvent donc pas être rejetés dans l'environnement sans traitement préalable. La tendance actuellement est donc l'abandon de cette approche, d'autant plus que le transfert médié d'électrons n'impose pas d'utiliser un médiateur chimique puisque certaines souches sont capables de produire leurs propres médiateurs. Cela constitue le deuxième genre de transfert d'électrons indirect. Ce transfert se caractérise par l'utilisation de médiateurs issus de la production des bactéries et qui sont appelés médiateurs endogènes.

❖ Transfert indirect par médiateurs synthétisés par les bactéries

Dans certains cas, les microorganismes sont capables de réaliser le transfert d'électrons de façon médiée par la synthèse de métabolites qui sont utilisés comme médiateurs [51]–[53].

Il faut distinguer les métabolites primaires des métabolites secondaires selon leurs rôles dans le métabolisme microbien :

- Métabolites primaires : ils sont essentiellement liés à la croissance, c'est-à-dire au métabolisme énergétique, et correspondent aux produits issus de l'oxydation plus ou moins complète du substrat carboné [41].
- Métabolites secondaires : lorsqu'aucun accepteur d'électrons soluble n'est présent en solution, ou lorsque l'accepteur d'électrons solide (matériau d'électrode) n'est pas en contact direct [41], alors les microorganismes peuvent synthétiser des composés transporteurs d'électron par voie métabolique secondaire.

Comme représenté en **Figure 9**, il existe trois voies possibles de transfert d'électrons indirect par des médiateurs endogènes : une concerne les métabolites secondaires et les deux autres utilisent les métabolites primaires.

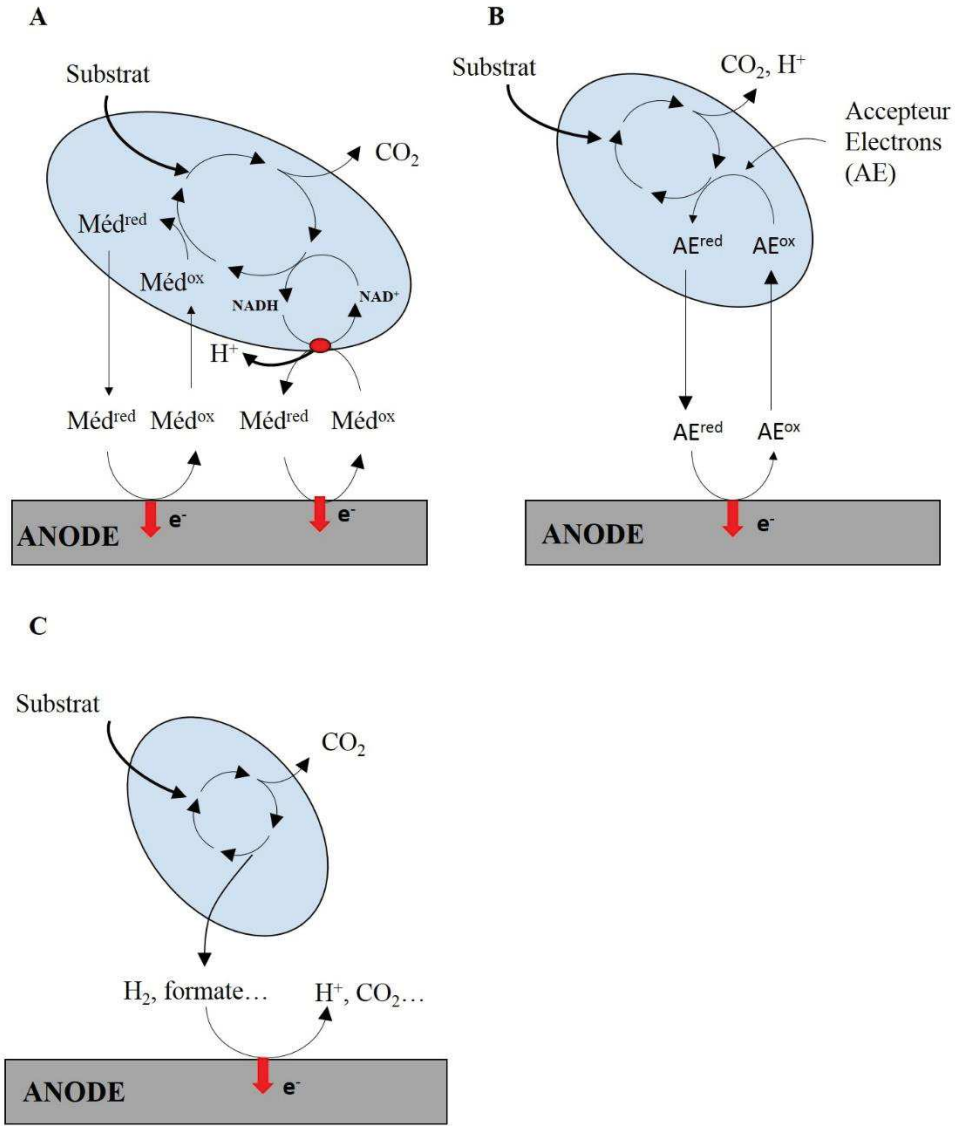


Figure 9 : *Schémas des différents mécanismes de transfert indirect d'électrons par métabolites secondaires (A) couple redox endogène, et par métabolites primaires (B) via des accepteurs d'électrons réduits terminaux (respiration anaérobie) et (C) via l'oxydation de produits de fermentation réduits* [54].

Les médiateurs endogènes (**Figure 9.A**) sont utilisés comme accepteurs finaux d'électrons pour transporter les électrons des cellules soit à un oxydant solide (l'anode), soit aux couches aérobies du biofilm, où ils sont ré-oxydés et redeviennent donc disponibles pour

d'autres réactions redox. Une molécule peut donc être utilisée pour des milliers de cycles redox. Deux mécanismes redox ont été proposés : le transport à travers la membrane externe des cellules par des couples redox periplasmique ou cytoplasmique (cytochrome représenté en rouge sur la **Figure 9.A**). On peut prendre comme exemple les phénazines et les pyocyanines qui sont des médiateurs sécrétés par *Pseudomonas aeruginosa* [55] ou encore la production de quinones par *Shewanella oenidensis* [51]. Cependant, cette production de médiateurs est coûteuse en énergie pour les bactéries, il est donc nécessaire que ces médiateurs soient utilisés plusieurs fois afin de récupérer ces « investissements » énergétiques. Cette stratégie convient parfaitement à une utilisation en mode batch (milieu non renouvelé) car les médiateurs produits restent dans la cellule, tandis qu'en mode continu, les médiateurs seraient évacués provoquant une diminution des performances de la PACM [54].

La deuxième voie possible (**Figure 9.B**) est l'utilisation d'un accepteur d'électron final possédant un potentiel redox suffisamment négatif par rapport à celui de l'oxygène sur l'électrode, qui est réversiblement oxydable et qui est soluble dans l'eau (aussi bien sous sa forme réduite qu'oxydée). On nomme ce mécanisme la respiration anaérobie. Dans l'exemple de *Desulfovibrio desulfuricans*, les ions sulfate (SO_4^{2-}), dont le potentiel standard est de -0,22 V, sont utilisés comme accepteurs d'électrons (**Équation 5**) :

$$SO_4^{2-} + 8H^+ + 8e^- \rightleftarrows S^{2-} + 4H_2O \qquad \textbf{Équation 5}$$

La réaction de réduction de SO_4^{2-} en S^{2-} est réalisée par les bactéries, tandis que la réaction de ré-oxydation de S^{2-} en SO_4^{2-} est réalisée par l'anode. Néanmoins, la ré-oxydation des sulfures reste difficile puisque l'électrode métallique se dégrade facilement en raison de la forte et souvent irréversible adsorption des sulfures. En effet, les sulfures se solidifient à la surface de l'électrode et entravent ainsi l'oxydation électrochimique. Il est cependant possible de remédier à ces problèmes en modifiant la nature de l'électrode avec de l'hydroxyde de cobalt (en faible quantité : 1 à 3% massique) comme proposé par Pommer et Habermann [56]. L'électrode ainsi modifiée présente une grande activité catalytique pour l'oxydation du sulfure en sulfate.

La dernière configuration possible est le mécanisme issu de la fermentation microbienne (**Figure 9.C**). La fermentation permet de produire des métabolites d'intérêts comme l'hydrogène, l'éthanol ou le formate. Ces composés peuvent être directement oxydés dans le milieu microbien tandis que l'anode est utilisée pour faciliter l'oxydation.

Enfin, le dernier type de transfert d'électrons que l'on peut trouver est le transfert d'électrons direct entre le biofilm et l'anode.

5.2.2. Transfert direct

Le transfert d'électrons direct a lieu grâce à un contact physique entre les microorganismes et la surface de l'électrode. Ce contact physique fait intervenir soit la membrane ou la paroi des bactéries, soit des appendices de la surface des bactéries comme les pili (nanofils ou nanocables organiques) (**Figure 10**).

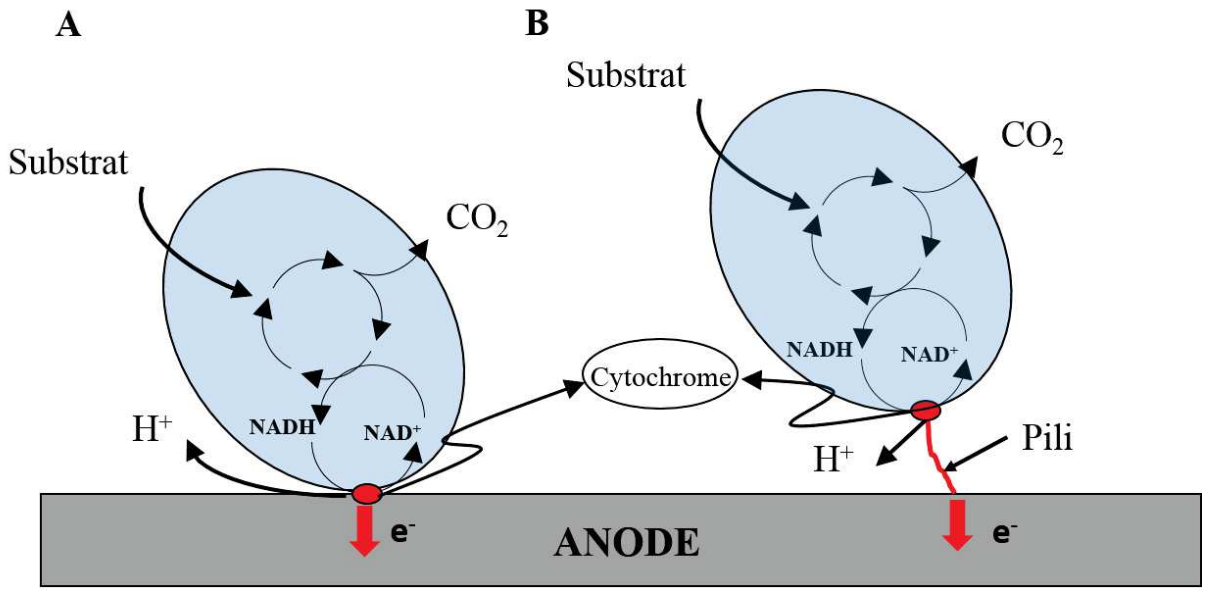


Figure 10 *:Schéma du mécanisme de transfert direct d'électrons par (A) les cytochromes de la membrane, (B) les pili conducteurs* [41].

Ce transfert direct des cellules à l'électrode a été rapporté pour la première fois dans la littérature en 2002 par l'équipe de D. Lovley [38],[57]. Ces travaux menés sur *Geobacter sulfurreducens* ont démontré que le transfert est assuré par des protéines membranaires : les cytochromes de type c. Les cytochromes sont constitués d'une porphyrine complexée avec un atome de fer. C'est grâce à ce dernier que les cytochromes possèdent des propriétés oxydoréductrices avec le couple Ox/Red : Fe^{3+}/Fe^{2+}. Ceci implique que la première couche de bactéries adhérées à la surface de l'électrode est importante pour le transfert d'électrons (**Figure 10.A**) [58]. Depuis, un certain nombre de bactéries ont été décrites comme capable de transférer les électrons de façon directe comme : *Geobacter sulfurreducens* [39], *Geobacter metallireducens*, *Rhodoferax ferrireducens* [59], *Desulfuromonas acetoxidans* [38], *Desulfobulbus propionicus* [60], *Enterococcus gallinarum* [61]. Néanmoins, le transfert direct

d'électrons de la bactérie à l'électrode reste controversé pour les souches à Gram positif comme *Clostridium butyricum* [62], et à Gram négatif comme *Aeromonas hydrophila* [63], *Shewanella putrefaciens* [26] et *Shewanella oneidensis* [64]. Pour ces dernières, le courant obtenu semblerait provenir d'un transfert direct, entre la bactérie et l'électrode, couplé à un transfert indirect par des médiateurs sécrétés par les bactéries. Ce transfert d'électrons permet de générer du courant mais la quantité d'électricité mesurée varie selon les bactéries.

Dans le cas de certaines souches du genre *Geobacter* et *Shewanella*, le type de contact entre le biofilm et l'électrode a en partie été élucidé. Celui-ci se fait par l'intermédiaire de pili comme décrit par Reguera et al [65] (**Figure 10.B)**. Ces pili, connectés à la membrane, permettent de transférer les électrons de la membrane de la bactérie à la surface de l'électrode. Les pili sont des structures protéiques formées par l'assemblage de monomères de protéines appelées pilines et mesurent de 3 à 5 nm de diamètre et jusqu'à 20 µm de long. Le mécanisme de transfert électronique à l'intérieur des pili reste sujet à débats puisque deux théories sont proposées. La première hypothèse de mécanisme est dite classique, c'est le *superexchange model* [66]. Les électrons sont transmis d'hèmes en hèmes (cofacteur contenant un atome de métal) par échange d'électrons entre les cytochromes associés aux pilis. La deuxième théorie proposée suggère une conductivité de type métallique liée aux protéines formant les pili [67]. Les électrons sont délocalisés à l'intérieur des résidus aromatiques des acides aminés des monomères de piline, et la conductivité se fait par interactions π-π entre les résidus aromatiques. De tels appendices présentent des avantages évidents pour la bactérie [68] comme celui de faciliter le transfert d'électrons puisqu'il n'y a plus forcément besoin de contact direct avec la surface de la bactérie ; on peut même imaginer que ces « nanofils » permettent d'atteindre des zones inaccessibles à la cellule elle-même.

Les souches connues pour ne pas faire intervenir de médiateurs exogènes sont regroupées dans le **Tableau 3** et sont classés par année de mise en évidence.

Année de mise en évidence	Souche	commentaire	substrat	Anode	Courant et densités de courant	Puissance et densité de puissance	Réf
1999	*Shewanella putrefaciens IR-1*	Génération direct d'un courant électrique dans une PACM par des bactéries réductrices de métaux (Gammaprotéobactéries)	Lactate	Feutre de graphite	2,9 µA	-	[69]
2002	*Desulfuromonas acetoxidans*	Identifiée dans les communautés de PACMs sédimentaires	Acétate	Graphite	0,4 mA	16 mW/m²	[38]
2002	*Geobacter metallireducens*	Génère de l'électricité dans un système avec un potentiel imposé (Deltaprotéobactéries)	Benzoate	Graphite	0,67 mA	0,13 mW	[38]
2003	*Geobacter sulfurreducens*	Génère de l'électricité sans potentiel imposé (Deltaprotéobactéries)	Acétate	Graphite	65 mA/m² (R = 500 Ω) 376 mA/m² (+200 mV)	13,9 mW/m²	[39]

2003	*Rhodoferax ferrireducens*	Utilise le glucose (Betaprotéobactéries)	Glucose	Mousse de graphite	74 mA/m²	32,8 mW/m²	[59]
2005	*Geopsychrobacter electrodihilus*	Cryophile (Deltaprotéoabctéries)	Fumarate		8,89 mA/m² (+0,52 V)	4,6 mW/m²	[60]
2006	*Shewanella oneidensis DSP10*	Permet d'obtenir de grandes densités de puissance (Gammaprotéobactéries)	Lactate	Feutre de graphite	13 mA/m²	6,5 mW/m²	[70]
2006	*Shewanella oneidensis MR-1*	Mutant identifié permettant d'augmenter le courant (Gammaproteobactéries)	Lactate	Feutre de graphite	138 mA/m²	382 µW/m²	[71]

Tableau 3 : *Tableau récapitulatif des principales études mettant en jeu le transfert direct d'électrons par année de mise en évidence, adapté de B. Logan et al* [72].

Même s'il s'agit de bactéries d'un même groupe, bactéries à Gram négatif, il est clair que toutes les bactéries n'ont pas la même faculté à produire de l'électricité puisque les électrodes sont de même nature, le graphite. Les valeurs de courant varient de quelques µA à quelques centaines de mA.

Depuis la découverte d'un transfert électronique direct entre les bactéries et la surface d'une électrode, les densités de courant ont augmenté de manière significative passant de quelques centaines de micro-ampères en 2002 à une centaine de milliampères en 2006. Ces variations sont dues à la nature des souches utilisées mais aussi à la nature du matériau d'électrode.

Les différents types de microorganismes utilisés pour la formation de biofilms électroactifs sont présentés dans le paragraphe suivant.

5.3. Sources de microorganismes pour la formation de biofilms électroactifs

Deux sortes d'inoculum sont utilisées pour la formation de biofilms électroactifs dans les biopiles microbiennes :

- Inoculum complexe :

C'est un consortium multi-espèces. L'utilisation d'une culture mixte se rapproche des conditions réelles de mise en œuvre.

- Inoculum simple :

L'inoculation à partir d'une culture pure permet de travailler dans des conditions strictement contrôlées. L'objectif est alors de comprendre les mécanismes de transfert d'électrons et d'établir des relations entre la croissance microbienne et le courant électrique délivré.

5.3.1. Culture complexe

Il est possible de former des biofilms électroactifs à partir d'inocula complexes provenant d'environnements naturels ou de milieux industriels riches en microorganismes. C'est à partir de ces cultures complexes que reposent les applications des biopiles microbiennes. En effet, les inocula complexes utilisés dans les biopiles microbiennes proviennent des eaux usées, des effluents urbains, des sédiments marins, des boues, du sol, de la mangrove ou encore du terreau

de jardin. Dans le cas des sédiments marins, des densités de puissance de 5 W/m² ont été obtenues [73]. Le terreau de jardin a aussi démontré d'excellentes capacités à former des biofilms électroactifs [74], [75].

Le **Tableau 4** reprend une partie des cultures complexes naturelles recensées dans la littérature.

INOCULUM	SUBSTRAT	MATERIAU D'ELECTRODE	J_{max} (mA/m²)	P_{max} (mW/m²)	Réf
Eaux usées domestiques	Acétate	Papier de carbone	4 200	1 330	[76]
Sédiments marins	Acétate	Graphite	1 200	5 000	[73]
Lixiviat de terreau	Jus de pomme fermenté	Feutre de graphite	404	92	[77]
Boues activées	Acétate	Tissu de carbone	2 000	550	[78]
Sol	Acétate	Tissu de carbone	-	44	[79]
Boues prélevées d'une station d'épuration	Lactate	Graphite	1 750	790	[80]
Boues anaérobies issues d'une brasserie	Sucrose	Carbone vitreux	1 000	170	[81]

Tableau 4 *: Exemple de densités de courant et densités de puissance obtenues avec divers inocula complexes naturels* [82].

On peut constater une grande variation des densités de puissance et de courant en fonction des inocula utilisés allant de 44 mW/m² à 5 000 mW/m² et de 404 mA/m² à 4 200 mA/m² respectivement. Il faut toutefois nuancer ces résultats en raison des conditions d'utilisation, du design de la biopile et des matériaux d'électrodes utilisés.

5.3.2. Souche pure

Plusieurs souches pures sont capables de transférer des électrons à la surface d'une électrode. Ces souches ont été isolées à partir de biofilms électroactifs multi-espèces ou ont été sélectionnées par criblage systématique de collections de micro-organismes. Elles servent

maintenant de souches modèles pour comprendre les phénomènes de transfert électronique à l'interface bactérie/électrode.

Parmi les souches d'étude, *Pseudomonas aeruginosa* est d'un intérêt particulier en raison de son adaptation à de nombreux environnements et de sa facilité à former des biofilms électroactifs [83], [84]. De plus, elle présente l'avantage de produire des métabolites redox solubles, les phénazines, qui peuvent être utilisés comme médiateurs pour le transfert d'électrons entre les microorganismes et l'anode dans une biopile microbienne. Deux types de phénazines sont produits : la pyocyanine et la phénazine-1-carboxamide [85], [86] (**Figure 11**).

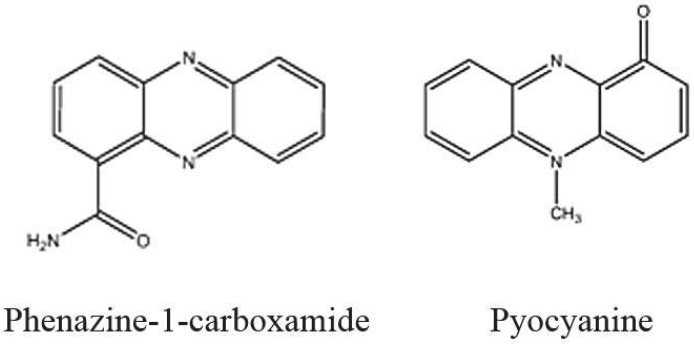


Figure 11 *: Formules développées de la phénazine-1-carboxamide et de la pyocyanine.*

La production de ces médiateurs permet donc d'éviter l'utilisation de médiateurs exogènes coûteux et toxiques pour les microorganismes à long terme [87].

Un autre aspect d'étude pour le développement des biopiles microbiennes concerne le matériau d'électrode. Les électrodes servent de supports à la croissance des biofilms et sont donc le siège des réactions électrochimiques. Le choix du matériau, et plus particulièrement à l'anode, est donc un enjeu important pour l'efficacité des biopiles.

6. Les matériaux d'anode

Le matériau d'électrode utilisé à l'anode doit être capable de jouer le rôle d'accepteur d'électrons issus des microorganismes avant que les électrons ne soient ensuite transmis à la cathode par un circuit électrique. Il est donc nécessaire que le matériau utilisé présente les caractéristiques suivantes :

- Biocompatibilité (non cytotoxique)
- Permettre l'oxydation électrocatalytique de nombreux métabolites
- Avoir une bonne activité électrocatalytique à de basses températures (10-40°C) et à un pH entre 5 et 7
- Etre chimiquement et électrochimiquement stable
- Etre insensible aux dégradations dues aux produits biologiques
- Avoir une grande surface spécifique

De ce fait, les électrodes à base d'oxydes métalliques et de métaux de transition comme le Nickel, le Cuivre et le Cobalt ne peuvent être utilisés comme tel en raison de leurs instabilités aux pH ciblés ainsi que de leurs propriétés antibactériennes [54]. De plus, en environnement aqueux, les microorganismes se développent à la surface du métal et accélèrent la corrosion métallique en altérant l'interface métal/solution [88], [89].

Actuellement, les électrodes les plus utilisées sont de type carboné : tige en graphite [90], brosse de graphite [91], tissu de carbone [92], papier carbone [93], feutre de carbone [94], carbone vitreux réticulé [81], [95]. Les électrodes à base d'acier inoxydable sont aussi envisagées en raison de leurs propriétés mécaniques et de leur résistance à long terme [96]. Cependant, la recherche actuelle se focalise de plus en plus sur la modification chimique de la surface des électrodes afin d'améliorer le transfert électronique à l'interface électrode/biofilm, de favoriser l'adhésion microbienne et d'augmenter la surface spécifique d'un matériau afin d'avoir une plus grande surface d'échange. Une voie de modification de ces matériaux est l'utilisation de graphène.

6.1. Le graphène

6.1.1. Historique : du carbone au graphène

Le carbone est un matériau essentiel dans la société moderne puisqu'il peut être utilisé pour de nombreuses applications. Par exemple, le carbone est utilisé comme source d'énergie (charbon), dans les filtres à eau et pour la digestion en médecine (charbon actif), dans la bijouterie (sous forme de diamant), sous forme d'alliage et de carbures dans l'aéronautique, les réacteurs nucléaires, les prothèses et les équipements sportifs [97]. De surcroit, les matériaux à base de carbone peuvent être obtenus à partir de polymères biosourcés, ce qui en fait une voie de production durable [98]. Le carbone est présent en abondance dans la nature et sous

différentes formes : cristalline ou allotropes. En effet, le carbone possède quatre électrons de valence et peut donc se lier aussi bien à des éléments électronégatifs qu'électropositifs. Il est important de noter qu'il peut faire des liaisons simples, doubles ou triples, ce qui explique la présence de nombreux allotropes [99]. La **Figure 12** représente les différentes formes allotropiques du carbone en fonction de son hybridation.

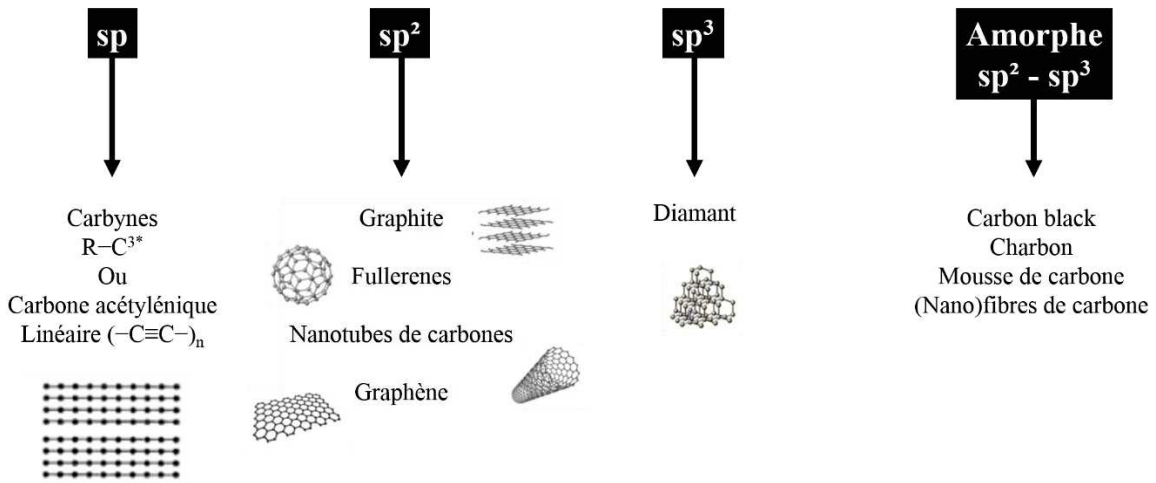


Figure 12 : *Représentations schématiques des différentes formes du carbone en fonction de son hybridation.*

On peut voir sur la **Figure 12** que le graphite (de forme tridimensionnelle) est formé de plans atomiques qui s'empilent les uns sur les autres. Ces plans atomiques (bidimensionnels) sont en fait des monocouches de carbone présentant un arrangement régulier d'atomes de carbone situés au sommet d'hexagones et possédant une structure en nid d'abeille : le graphène. Le graphène, dont la découverte a été récompensée par un prix Nobel en 2010, est donc un cristal bidimensionnel de carbone (sp^2). C'est pour la première fois, en 2004, en parvenant à isoler un feuillet d'une seule couche atomique par délamination du graphite, que le graphène (2D) est découvert par A. Geim et N. Novoselov [100].

L'intérêt porté au graphène depuis sa découverte ne cesse de grandir en raison de ses propriétés remarquables. En effet, c'est un des matériaux présentant la plus grande résistance mécanique (avec un module d'Young d'environ 1 TPa), une extraordinaire capacité à transférer les électrons (200 000 cm^2/Vs), une très bonne conductivité électrique ($2x10^4$ S/m pour une monocouche de graphène), une excellente conductivité thermique (5 000 $W.m^{-1}.K^{-1}$), une grande surface spécifique (2 630 m^2/g) [101]–[114] et il est biocompatible [108], [115], [116]. A titre d'exemple, le graphite possède les propriétés suivantes : un module d'Young de 8-15

GPa, une conductivité électrique (10^5 S/m), une conductivité thermique de 25-470 $W.m^{-1}.K^{-1}$ et une surface spécifique de 3,5-7,5 m²/g.

Du fait de ses propriétés, le graphène est très prometteur pour de nombreuses applications.

6.1.2. Applications

La première des applications visée concerne l'électronique à grande vitesse telle que les transistors. Cependant, malgré sa grande conductivité, le problème réside dans son absence de bande interdite. Dans les appareils électroniques, cette bande interdite est indispensable afin d'obtenir des états « on » et « off ». La recherche actuelle se focalise donc sur la création de dérivés du graphène afin d'obtenir cette bande interdite dans le but de créer des transistors à grande vitesse dans les 10 prochaines années [117], [118].

Le stockage de données, comme le cas des clés USB, est aussi envisagé. En effet, il a été démontré qu'une électrode d'oxyde d'indium-étain (ITO) modifiée avec un polymère et de l'oxyde de graphène permettait d'obtenir des capacités de stockage de 0,2 $Tbits/cm^3$, soit environ 10 fois plus que pour une clé USB de 16 GB [119].

Une autre application concerne les fenêtres intelligentes LCD. Le graphène possède des propriétés d'opacité en fonction de l'existence d'un courant. La fenêtre reste opaque jusqu'à ce que l'on applique un champ électrique afin de la rendre transparente [119], [120].

Les écrans à OLED (Organic Light Emitting Diode) flexibles sont aussi visés. Selon l'épaisseur du graphène, celui-ci peut être très flexible, ce qui permettrait de remplacer les contre électrodes en ITO, qui sont cassantes, pour les télévisions ou encore les écrans tactiles (ex : Samsung).

Une autre voie d'utilisation du graphène concerne les cellules photovoltaïques qui actuellement utilisent du platine à la contre électrode. Comme nous l'avons vu, le platine présente des problèmes liés aux ressources et donc un coût de plus en plus élevé. Ainsi, grâce à son excellente conductivité, le graphène pourrait remplacer le platine actuellement présent et ainsi permettre de réduire les coûts de production tout en maintenant une bonne efficacité [121]. Il en est de même pour les piles à combustibles ainsi que les biopiles.

Enfin, la détection électrochimique dans le cas des biocapteurs implantables est très largement envisagée notamment pour le suivi du glucose en continu. Ce suivi en continu permettrait de détecter les variations de concentration en glucose et donc de délivrer le médicament avant une crise d'hypo ou d'hyper glycémie. Le graphène permet d'augmenter la

sensibilité, la vitesse de détection ainsi que la stabilité de ces biocapteurs travaillant généralement avec une enzyme : la glucose oxydase [122].

Plusieurs voies de synthèse pour le graphène sont possibles en fonction des besoins pour les différentes applications.

6.1.3. Synthèse

Il existe plusieurs approches pour synthétiser le graphène (**Figure 13**). La première méthode de production du graphène est la « méthode du ruban adhésif » présentée pour la première fois par A. Geim et K. Novoselov [123]. Cette méthode consiste à utiliser un ruban adhésif afin d'enlever des flocons de graphite d'un bloc de graphite pyrolytique hautement ordonné. Cette méthode est répétée plusieurs fois afin d'exfolier les flocons de graphites et d'obtenir des couches de plus en plus fines de graphite jusqu'à obtenir une seule couche de graphite, épaisse d'un atome, qui est du graphène. Le graphène est ensuite transféré sur un support en oxyde de silicium. Cette méthode de production pose cependant rapidement un problème puisque les quantités de graphène produites restent faibles et cela reste un procédé laborieux.

Depuis, de nouvelles méthodes de synthèse du graphène ont été développées mais restent cependant peu utilisées. Ces techniques sont : le dépôt chimique en phase vapeur (CVD) [124], [125], l'exfoliation phase-liquide [126], [127] et la croissance épitaxiale sur du carbure de silicium [128].

La voie de synthèse du graphène la plus utilisée a été présentée par Kovtyukhova et al et consiste à l'oxydation et l'exfoliation de graphite en oxyde de graphène [129], [130]. L'oxyde de graphène ainsi produit possède de nombreux groupements riches en oxygène (CO, COOH et COH) à sa surface. (**Figure 13**). Ces groupements peuvent ensuite être enlevés par réduction de l'oxyde de graphène. Plusieurs voies de réduction sont possibles : chimiques [114], thermiques [131] et électrochimiques [132].

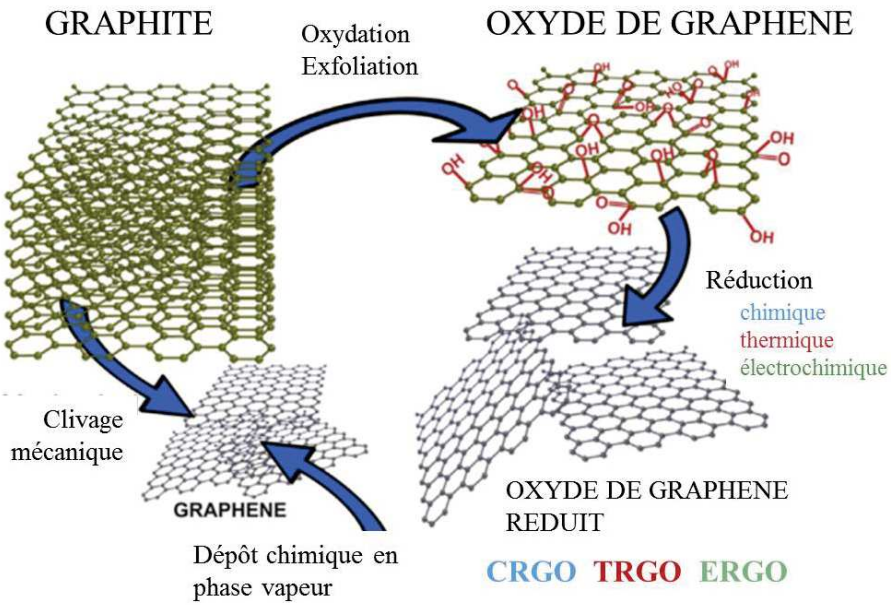


Figure 13 *:Représentation schématique des différentes possibilités pour synthétiser du graphène et de l'oxyde de graphène réduit* [133].

Ces différentes techniques de synthèse du graphène permettent de modifier un matériau de différentes façons et ainsi d'adapter la technique de modification aux supports utilisés. Nous nous intéressons ici à la modification de surface d'électrodes utilisées dans les biopiles microbiennes.

6.1.4. Les différents types de modification des matériaux par le graphène

On retrouve principalement deux méthodes pour modifier une électrode avec du graphène : un dépôt physique sur un substrat conducteur ou un dépôt électrochimique.

Parmi les dépôts physiques, il existe plusieurs façons de procéder selon la nature du matériau utilisé pour faire l'électrode. La première technique est le « spin-coating » ou enduction centrifuge. Le graphène, en suspension dans de l'eau pure, est déposé sur un matériau conducteur possédant une surface plane. Le matériau et le graphène sont ensuite placés sur un plateau sous vide et tournant à haute vitesse (de façon constante) afin que le dépôt soit réalisé de façon uniforme sur toute la surface du matériau. L'épaisseur de la couche déposée est inférieure à 10 nm, on parle de couche mince [134]. Une seconde technique utilisée est le « drop casting » ou dépôt par goutte. Cette technique est particulièrement utilisée lorsque l'on veut déposer une plus grande quantité de graphène et que le besoin d'avoir un dépôt uniforme n'est pas nécessaire. Une ou plusieurs gouttes d'une suspension de graphène sont déposées à la

surface de l'électrode. L'électrode est ensuite séchée jusqu'à évaporation totale du liquide [135]. La dernière technique de dépôt physique utilisée est l'adsorption. Généralement, cette technique est associée à la méthode dite couche-par-couche. Grâce à ce procédé, il est possible de déposer une monocouche de graphène à la surface de l'électrode. Il est également possible de contrôler l'épaisseur ainsi que le nombre de couches à déposer. La monocouche se forme à la surface d'un matériau, de charge opposée, par adsorption. Le graphène étant chargé négativement, il faut que la couche ou la surface soit chargée positivement. L'adsorption du graphène se réalise dans une dispersion de graphène sous forme aqueuse. Dans le cas où la surface du matériau est de charge positive, l'électrode est immergée dans la dispersion aqueuse de graphène afin de procédé à l'adsorption d'une monocouche de graphène. L'électrode est ensuite rincée à l'eau et séchée. C'est cette technique qui a été utilisée pour modifier la surface des électrodes dans ce travail.

Un autre type de dépôt est le dépôt électrochimique. Cette technique consiste à électro-réduire l'oxyde de graphène à la surface d'un matériau. Pour cela, l'électrode est plongée dans une solution aqueuse d'oxyde de graphène. Dans un système à deux électrodes où la contre électrode est une grille de platine, l'oxyde de graphène (chargé négativement) est transporté par électrophorèse à la surface de l'électrode [132].

Le graphène présente donc une solution intéressante afin d'améliorer les performances des PACMs.

6.2. Le graphène au service des PACMs

La majorité des articles parus sur la fabrication de bioanode pour les PACMs utilisent des matériaux de types carbonés comme vu précédemment. Mais depuis quelques années, de plus en plus d'articles sont consacrés à la modification des matériaux d'électrodes, principalement issus du carbone, avec du graphène afin d'augmenter leur surface spécifique, leur capacité à transporter les électrons plus rapidement, ne pas interférer avec le développement microbien ou encore à protéger les électrodes de la biocorrosion. Très récemment, la modification surfacique a été utilisée sur des matériaux comme l'acier inoxydable, l'or ou encore le nickel. Le nickel n'est, à la base, pas un bon candidat pour le développement de bioanode puisque celui–ci est facilement corrodé en présence de microorganismes [136] (**Figure 14**). Cependant, il est

possible de protéger le nickel de la biocorrosion en le modifiant avec du graphène comme présenté par Prasai et al [137].

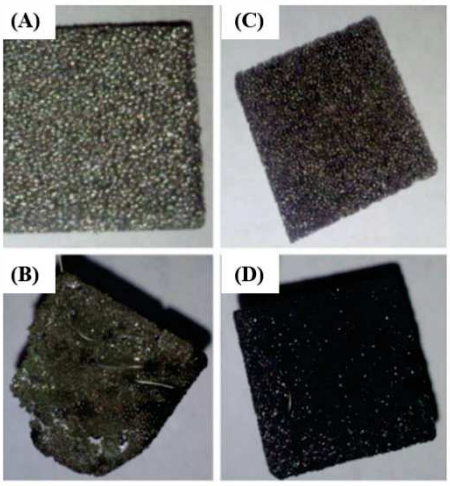


Figure 14 *: (A) anode en mousse de nickel non modifiée, (B) mousse de nickel biocorrodée après 2 000 h de fonctionnement en biopile, (C) mousse de nickel modifiée avec du graphène, (D) mousse de nickel modifiée résistante à la biocorrosion après 2 800 h de fonctionnement en biopile* [136].

On peut observer sur les **Figure 14.A et B** l'effet de la biocorrosion sur de la mousse de nickel utilisée comme anode après 2 000 h de fonctionnement en biopile. Il apparaît clairement qu'il y a eu une détérioration du matériau par les microorganismes avec la présence de fractures. A l'opposé, les **Figure 14.C et D** démontrent une résistance durable à la biocorrosion en présence de graphène à la surface de la mousse de nickel.

Il est acquis que le graphène permet d'améliorer les performances des biopiles microbiennes en modifiant simplement la surface de la bioanode. Les matériaux de base utilisés pour ces modifications sont principalement le tissu de carbone, le feutre de carbone, le papier carbone et le graphite comme reporté dans le **Tableau 5**. On peut constater que la modification surfacique des matériaux permet d'augmenter les puissances délivrées. Lorsque du tissu de carbone est modifié avec du graphène, la densité de puissance obtenue passe de 19,5 mW/m² à 52,5 mW/m². Dans le cas du papier de carbone, la puissance a quant à elle été multipliée par 100 en passant de 0,3 mW/m² à 34,2 mW/m². En plus d'améliorer les performances énergétiques, ces nouveaux matériaux semblent stables dans le temps.

Anode	Inoculum	Substrat	Cathode	Catholyte	Configuration de la biopile	Densité de courant A/m²	Densité de puissance mW/m²	Réf
Tissu de Carbone	*Pseudomonas aeruginosa*	Glucose	Tissu de carbone	$Fe(CN)_6$ (III)	2 compartiments (180 mL)	15,8	19,5	[132]
Tissu de carbone/ERGO						24,5	52,5	
Feutre de carbone	*Shewanella oneidensis*	Lactate	Feutre de carbone	$Fe(CN)_6$ (III)	2 compartiments (25 mL)	NA	161,94	[138]
Feutre de carbone/PPy-GO						NA	1665,7	
Tissu de carbone	Effluents d'eau domestique	Acétate	Tissu de carbone	$Fe(CN)_6$ (III)	2 compartiments (90 mL)	1,13	476	[139]
Tissu de carbone/Graphène (adsorption)						2,9	1018	
Papier de carbone	*Shewanella oneidensis*	Lactate	Papier de carbone	$Fe(CN)_6$ (III)	2 compartiments	0,075	6,8	[140]
Papier de carbone/GONR						0,3	34,2	
Graphite	Boues anaérobies	Acétate	Tissu de carbone	Cathode à air	1 compartiment	2,4	0,39	[141]
Graphite/GL						5,89	0,67	
Graphite/EGO						3,91	0,53	
Graphite/rGO						2,91	0,43	

Tableau 5 *: Configurations et caractéristiques d'une sélection d'anodes modifiées par du graphène. ERGO - Oxyde de graphène réduit électrochimiquement; PPy-GO - Polypyrrole-oxyde de graphène; GONR - Nanoribbon d'oxyde de graphène; GL - Graphene layer (couche de graphène).*

La deuxième électrode composant les biopiles microbiennes est la cathode. Elle joue un rôle important dans les performances des PACMs puisqu'elle permet la réduction d'une espèce comme l'oxygène. La cathode peut également servir de support à la formation d'un biofilm électroactif. Cependant, dans ces travaux nous nous sommes uniquement intéressés aux cathodes abiotiques, c'est-à-dire sans microorganismes.

7. Les matériaux de cathode

La catalyse électrochimique de la réaction de réduction de l'O_2 reste le principal point de recherche pour l'amélioration des performances de la cathode. Le platine est un catalyseur efficace pour la réduction de l'oxygène, mais son utilisation n'est pas adaptée à cause de son prix élevé, sa rareté et son empoisonnement possible lors du traitement de l'eau. Ainsi, le platine doit être remplacé par un matériau durable, rentable et répandu, notamment pour des applications dans le domaine des biopiles [142].

Les métallo-phthalocyanines et porphyrines sont de bons candidats pour catalyser la réaction de réduction de l'oxygène dans les biopiles. En effet, ces complexes organométalliques permettent d'abaisser le potentiel élevé de la réaction de réduction de l'oxygène et améliorent les puissances générées [142]–[144]. De nombreuses études utilisant les métallo-phthalocyanine et les porphyrines comme matériaux d'électrode montrent une augmentation de puissance par un facteur quatre [142], [143], [145]. Il a également été démontré que le mécanisme de la réaction de réduction de l'oxygène est sensible à la nature du métal central du complexe [146]. En effet, les métallo-phthalocyanines de fer et de manganèse, à des faibles potentiels, permettent la réduction de l'oxygène en quatre électrons avec rupture de la liaison O-O et sans formation de peroxyde d'hydrogène. Il faut aussi noter que dans le cas des tétra-amino phthalocyanines de cobalt polymérisées, la réduction de l'oxygène se fait en quatre électrons alors que dans le cas des tétra-amino phthalocyanines de fer polymérisées la réduction se fait en deux électrons [147]. Par contre, les phthalocyanines de cobalt, de nickel et de cuivre peuvent favoriser la réduction à deux électrons produisant ainsi du peroxyde d'hydrogène comme produit principal [145]–[147]. La production de peroxyde d'hydrogène ne présente cependant pas d'inconvénient majeur dans la mesure où cette cathode est utilisée dans une biopile à deux compartiments et qu'aucun microorganisme n'est présent dans ce compartiment.

Par ailleurs, les performances catalytiques des complexes de métallo-phthalocyanines dépendent non seulement de la nature du métal central mais aussi de la nature du milieu puisqu'ils sont plus efficaces en milieu alcalin [146], [147].

Comme dans le cas du graphène, ces complexes organométalliques bioinspirés sont utilisés pour modifier la surface des électrodes. Récemment, la phthalocyanine de nickel tétrasulfonée (notée p-NiTSPc) (**Figure 15**) déposée de façon électrochimique joue le rôle de catalyseur grâce aux ponts oxo Ni-O-Ni formés lors du dépôt obtenu en solution alcaline [148].

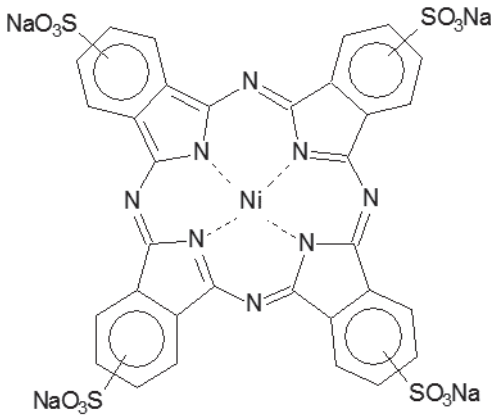


Figure 15 *: Formule développée de la phthalocyanine de nickel tétrasulfonée.*

Bien que le mécanisme de l'électrodépôt (réalisée par voltammétrie cyclique) ne soit pas complètement connu, il a été suggéré que les ponts oxo étaient initiés par l'électro-oxydation des anions OH^- en des radicaux $OH^\bullet$ près de la surface de l'électrode. Ces radicaux aident à l'insertion de l'atome d'oxygène entre les molécules de phthalocyanine de nickel. Plus le nombre de balayages augmente, plus le nombre de radicaux $OH^\bullet$ générés est important, ce qui favorise ainsi la formation de liaisons entre les atomes de nickel et d'oxygène pour former des ponts oxo O-Ni-O à la surface d'électrode [147].

La modification des électrodes par ces complexes métalliques s'avère très intéressante pour l'amélioration des performances catalytiques de la cathode.

La nature des matériaux d'électrodes utilisés ainsi que les microorganismes utilisés ne sont pas les seuls paramètres à influencer les performances et les caractéristiques des biopiles. Le design de la biopile microbienne est aussi important, c'est que nous allons voir par la suite.

8. Les différents designs de PACMs

Parmi les différents types de design rencontrés dans la littérature, il en existe deux catégories : les biopiles à un seul compartiment et les biopiles à deux compartiments séparés par une membrane échangeuse de protons. Les PACMs peuvent fonctionner soit en batch (c'est-à-dire en milieu non renouvelé) soit en flux continu (des réactifs sont apportés en continu à un débit contrôlé). Les PACMs présentées dans cette partie mettent en jeu des microorganismes uniquement du côté anodique.

Une application pratique des PACMs requiert de développer un design qui va non seulement permettre d'obtenir une bonne puissance électrique mais aussi être économiquement intéressant pour un développement en masse à faible coût.

8.1. Piles à combustible microbiennes à deux compartiments

Les PACMs à deux compartiments sont composées d'un compartiment anodique et d'un compartiment cathodique. Ces deux parties sont séparées par une membrane échangeuse de protons : généralement une membrane Nafion® (Dupont) ou Ultrex® (Membrane International Inc.). Comme dans le cas des PAC, la membrane assure le transfert ionique entre les deux compartiments (passage des protons de l'anode à la cathode) et permet d'éviter le mélange des milieux de chaque compartiment. A la cathode, une solution de ferricyanure ($Fe(CN)_6^{3-}$) est généralement utilisée car elle permet d'obtenir des puissance entre 1,5 et 1,8 fois supérieures à celles obtenues avec une cathode en platine qui réduit l'oxygène dissous [149].

Le premier type de PACMs à deux compartiments est composé de deux bouteilles reliées par un tube dans lequel une membrane est introduite (**Figure 16.A**). Cependant, ce système possède une résistance interne élevée en raison de la distance importante entre les deux électrodes et de la présence de la membrane. Plus la résistance interne d'un système est élevée, plus les performances diminuent : on parle de chute ohmique. Ce type de cellules bioélectrochimiques peut aussi avoir une géométrie rectangulaire (**Figure 16.B**).

La miniaturisation des biopiles microbiennes peut aussi permettre d'améliorer les performances du fait de la faible distance entre les deux électrodes. Ringeisen et al ont ainsi fabriqué une biopile microbienne miniature, dont le volume est de 1,2 mL avec une densité de puissance de 24 mW/m² (**Figure 16.C**) [64].

En marge des biopiles microbiennes en batch, il existe des biopiles avec une alimentation continue en substrat. Ce design de PACM est particulièrement intéressant dans le traitement

des eaux usées. Un premier dispositif plaçait l'anode et la cathode de part et d'autre d'une membrane inclinée de 15° afin d'éviter l'accumulation de bulles (**Figure 16.D**) [81]. Néanmoins, les deux électrodes restent assez éloignées l'une de l'autre, créant ainsi une résistance interne non optimisée (84 Ω). Une amélioration de ce système a consisté à placer une cathode en U dans le compartiment anodique, diminuant ainsi la résistance interne du système puisque la cathode est entourée d'une membrane et l'ensemble est plongé dans le compartiment anodique. Dans ce cas, la résistance interne est de 4 Ω (**Figure 16.E**) [150]. Dans ces deux études, les électrodes sont constituées de lits granulaires de carbone, augmentant très largement la surface d'adhésion des microorganismes. L'inconvénient de ce type d'électrode est le colmatage.

Un autre type de PACM a été développé par l'équipe de B. Logan : la *Flat Plate Microbial Fuel Cell* (FPMFC) [151]. Avec ce design, les électrodes sont directement liées à la membrane suite à un pressage à chaud. Cette PACM fonctionne en alimentation continue aussi bien à l'anode qu'à la cathode. A l'anode, l'alimentation peut soit se faire en eaux usées, soit en milieu riche en matière organique biodégradable. Quant à la cathode, elle est constituée d'une cathode à air utilisant une phase gazeuse pour la réduction de l'oxygène (**Figure 16.F**).

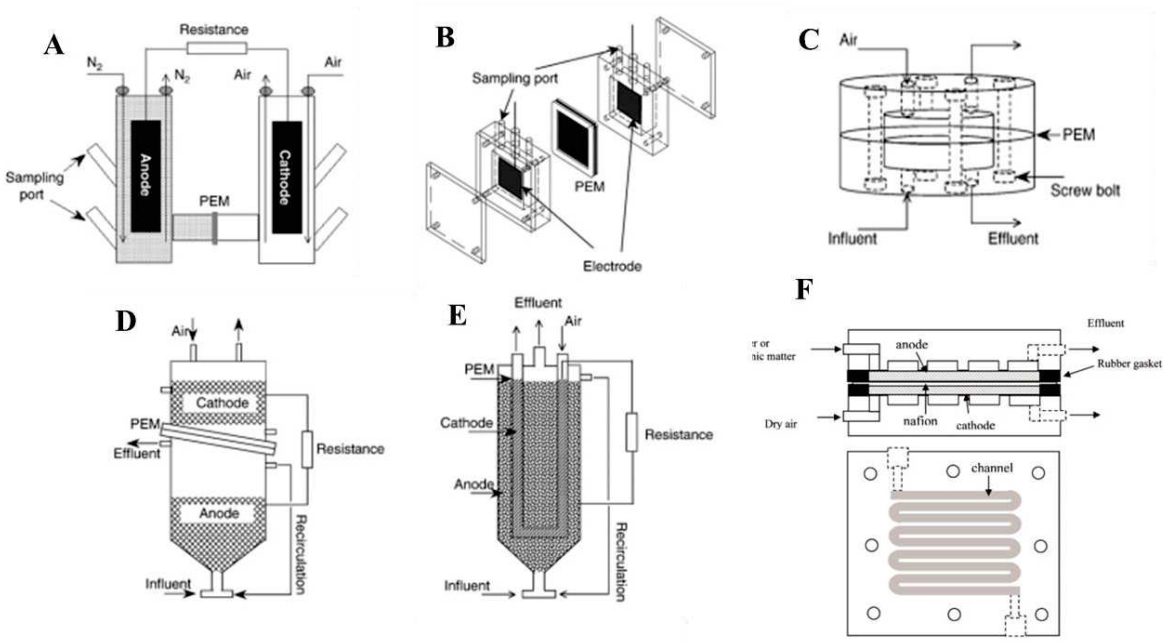


Figure 16 *: (A) Cellule de type "H" d'après Delaney et al* [45]*; (B) Cellule rectangulaire d'après Allen et Benetto* [25]*; (C) Cellule miniature d'après Ringeisen et al* [64]*; (D) Cellule à lits granulaires d'après He et al* [81]*;(E) Cellule à lits granulaires et cathode interne en U d'après He et al* [150]*; (F) Cellule plate à écoulement serpentin d'après Min et Logan* [151]*. Les schémas sont adaptés de Du et al* [152].

Ces trois derniers dispositifs présentés sont bien adaptés pour le traitement des eaux usées en flux continu. Il est toutefois important de noter que les dépenses énergétiques liées à la circulation du fluide sont supérieures aux puissances obtenues, c'est pourquoi ces systèmes visent prioritairement le traitement des eaux plutôt que la production de courant.

8.2. Piles à combustible microbiennes à un compartiment

Les PACMs à compartiment unique sont constituées d'un compartiment anodique et d'une cathode à air, directement en contact avec l'air et avec l'électrolyte. Ce type de cathode permet l'apport d'O_2 directement dans l'électrolyte et est généralement constituée de carbone poreux. Les cathodes à air ont dans un premier temps été développées pour les piles à combustibles [153]. Cependant, l'électrolyte utilisé est de nature alcaline [154], le pH est donc basique, ce qui peut présenter un inconvénient pour l'utilisation de microorganismes. Le principal enjeu se situe donc au niveau du pH de l'électrolyte. En effet, l'oxydation du combustible à l'anode produit des protons, ce qui provoque donc la diminution du pH au niveau de l'anode, tandis que la réduction de l'oxygène à la cathode induit une augmentation du pH à son voisinage. Gil et al ont démontré que l'utilisation d'une solution tamponnée de phosphate permettait de remédier à ce problème en maintenant le pH à 7,0, ce qui est préférable pour les microorganismes [155]. Ce type de design offre la possibilité de s'affranchir d'une membrane échangeuse de protons, même si dans ce cas, les performances sont plus faibles qu'avec l'utilisation d'une membrane. Toutefois, la membrane a un intérêt double : éviter d'avoir un déversement de l'anolyte au niveau de la cathode et réduire la diffusion de l'oxygène vers le côté anodique. En effet, Liu et al ont démontré qu'en présence d'une membrane échangeuse de protons, la diffusion de l'oxygène était de 0,05 mg/h, alors qu'en l'absence de cette membrane, la diffusion était de 0,187 mg/h [90]. La diffusion de l'oxygène vers l'anode reste un problème puisqu'elle favorise une compétition entre l'oxydation du substrat par le biofilm et la réduction de l'oxygène ce qui aura pour résultat de diminuer le rendement de la biopile. Plusieurs design ont été proposés afin d'optimiser les performances des PACMs à cathode à air.

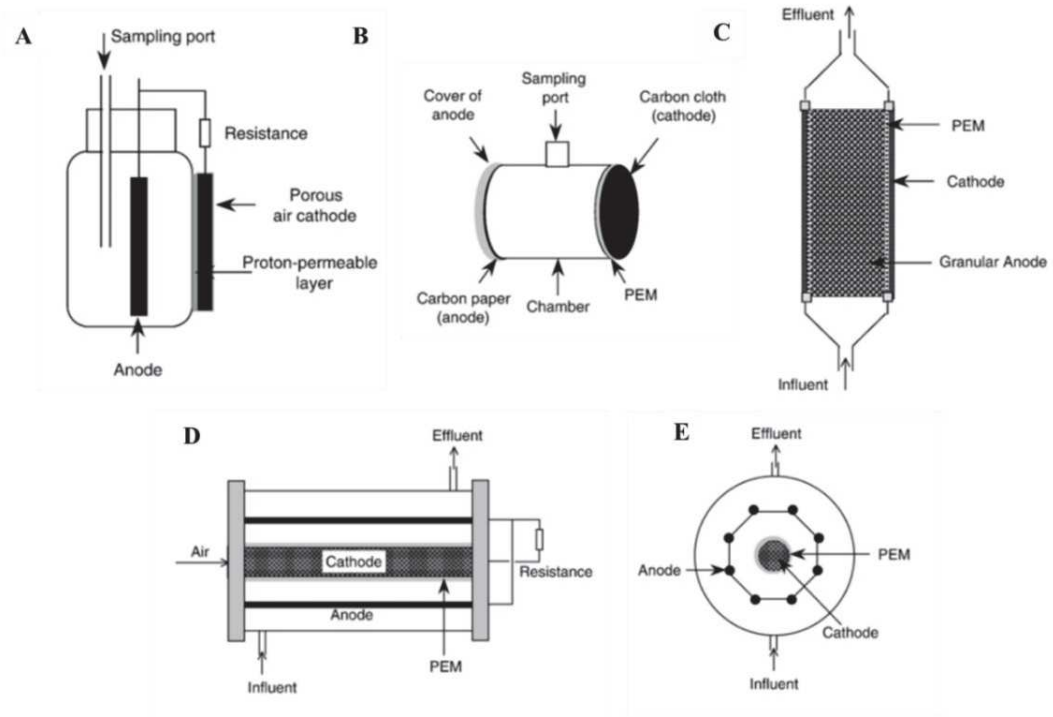


Figure 17 : *Représentation schématique des différents designs de PACMs à cathode à air. (A) PACM avec une couche de membrane échangeuse de protons recouvrant l'intérieur de la fenêtre sur laquelle la cathode est montée* [80] *; (B) PACM cylindrique avec la cathode et l'anode opposées* [90]*; (C) PACM tubulaire avec la cathode à l'extérieur et l'anode à l'intérieur* [156] *; (D et E) PACM contenant 8 électrodes de graphite en tube comme anodes et entourant une cathode unique (vue de profil et de face)* [90]. *Illustrations schématiques issues de Du et al* [28].

Comme pour les PACMs à double compartiment, il est possible d'avoir une configuration en batch ou en alimentation continue.

En batch, deux configurations existent :

- soit la cathode est placée à l'extérieur du compartiment anodique, et est en contact direct avec la membrane, tandis que l'anode se situe au milieu du compartiment (**Figure 17**.**A**),
- soit l'anode et la cathode se font face de part et d'autre du compartiment (la cathode est aussi en contact direct avec la membrane) (**Figure 17.B**).

Dans une configuration en alimentation continue, il existe deux possibilités :

- La cathode est placée à l'extérieur et tout autour de l'anode (séparée par une membrane), ce qui offre une grande surface d'échange (**Figure 17.D**)

- La ou les anodes sont placées autour de la cathode (séparée(s) par une membrane) et le flux d'air passe au sein de la cathode (**Figure 17.E**).

Une autre voie pour augmenter les performances de biopiles microbiennes est l'empilement. Ainsi, plusieurs PACM sont placées en série ou en parallèle. Toutefois, l'inversion de polarité pour une ou plusieurs cellules constitutives d'un empilement en série peut se révéler être un problème puisqu'il peut endommager irréversiblement le biofilm et donc affecter les puissances délivrées [157]–[159].

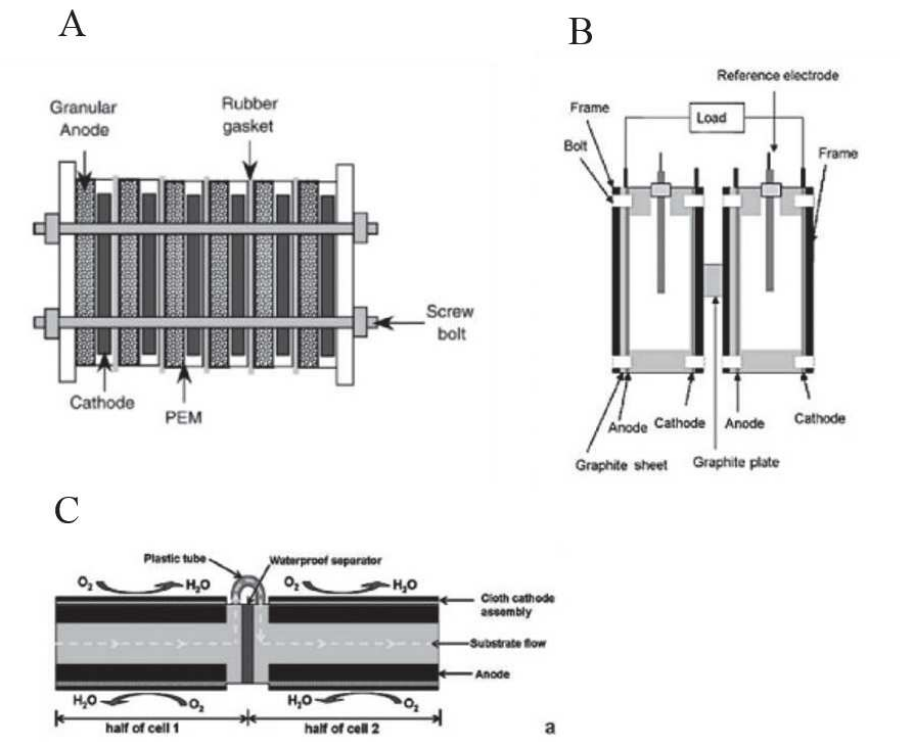


Figure 18 *: (A) Empilement de six cellules à lit granulaire* [157]*, (B) empilement de deux cellules* [158] *et (C) PACM en série* [159].

9. Des piles à combustible microbiennes aux applications

La gamme d'application des biopiles microbiennes est variée et peut concerner de nombreux domaines.

9.1. Traitement des eaux usées

Les eaux usées des industries agroalimentaires ainsi que les effluents urbains sont des combustibles très avantageux pour les biopiles microbiennes. Les avantages d'utiliser les effluents et les eaux usées sont qu'en plus de contenir une grande quantité de matière organique, ils possèdent également les bactéries nécessaires à leur dégradation. Ces bactéries peuvent être utilisées comme inoculum pour la formation de biofilm à la surface d'électrode [80], [160], [161] et ensuite dégrader les matières organiques présentes [157].

L'épuration et le traitement des eaux usées représentent une part économique très importante puisque près de 3 milliards d'euros sont investis chaque année en France. On estime que les eaux usées contiennent environ dix fois plus d'énergie, présente sous forme de matière organique, que celle nécessaire à leur traitement [162]. L'utilisation de PACMs représente une alternative économique très intéressante car en plus de traiter les eaux usées, de l'électricité serait produite et cela à moindre coût. En effet, le substrat utilisé dans ce cas est gratuit.

Le premier prototype de PACM à grande échelle a été conçu en Australie (Queensland) dès 2005. Ce prototype a été testé dans une brasserie de la société Foster. Il est constitué de 12 modules de 3 mètres de hauteur et d'un volume de 1 m^3 chacun. Le but est de traiter les effluents de la brasserie afin d'épurer l'eau tout en produisant de l'électricité. Les anodes sont en brosse de fibre de carbone et les cathodes en brosse de graphite. Cependant, très peu d'informations sur les performances de cette biopile n'ont été communiquées [91]. On ne sait seulement que la limitation des performances est due à la faible conductivité des effluents de la brasserie.

9.2. Dessalement des eaux de mer

Il est estimé que dans les vingt prochaines années, la quantité d'eau potable diminuera d'un tiers [163]. Le dessalement de l'eau de mer pour produire de l'eau potable est une option envisagée, notamment dans certaines parties du monde où l'accès à l'eau est difficile. Les techniques de dessalement actuelles, telle que l'électrodialyse, restent très énergivores et dans certains cas utilisent des pompes à haute pression [164]. L'utilisation de biopiles microbiennes permet de ne plus appliquer de potentiel puisqu'elles utilisent l'électricité produite par la dégradation de matière organique. Le type de PACM utilisé ici est différent des designs présentés auparavant. Une cellule microbienne de dessalement est présentée en **Figure 19**.

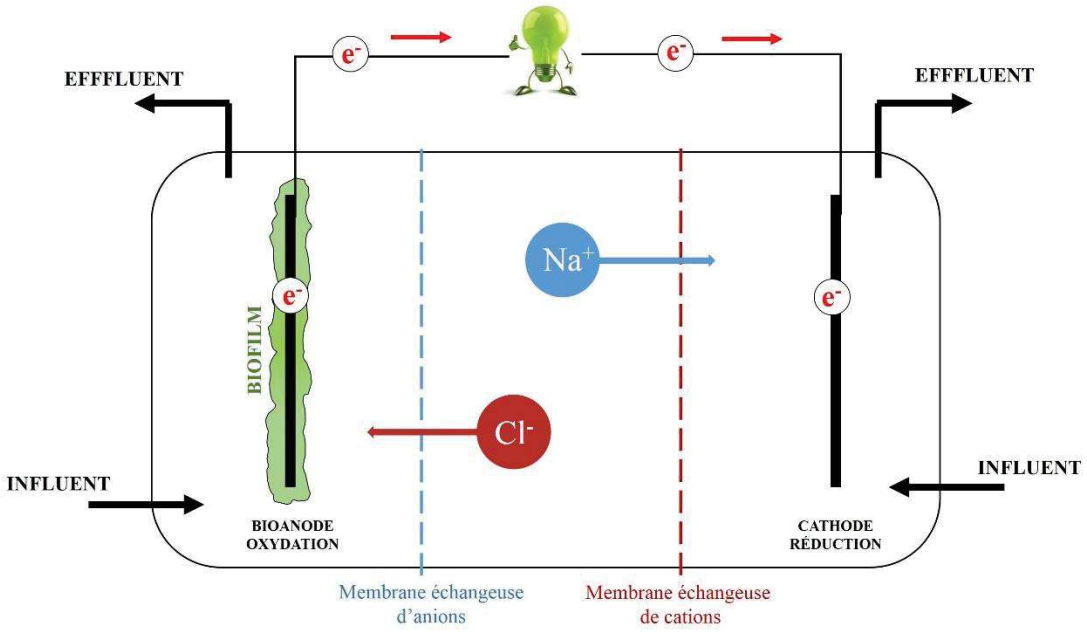


Figure 19 *: Cellule microbienne de dessalement à trois compartiments (adapté de B. Logan et al* [165]*).*

La cellule microbienne de dessalement est composée de trois compartiments : un compartiment anodique, un compartiment cathodique et un compartiment central contenant l'eau de mer. Les compartiments anodique et central sont séparés par une membrane échangeuse d'anions tandis qu'une membrane échangeuse de cations est utilisée pour séparer le compartiment central du compartiment cathodique. Le biofilm formé à l'anode est issu d'une culture mixte de bactéries. Lorsque les électrons sont produits au niveau de la bioanode, les ions chlorures sont alors transférés vers le compartiment anodique tandis que les ions sodium sont transférés dans le compartiment cathodique. Les travaux de B. Logan et al [165] ont montré que la densité de puissance obtenue avec une telle cellule microbienne de dessalement est de 2 W/m² (31 W/m^3) et qu'en un cycle de dessalement, 90 % du sel était enlevé du compartiment central.

De plus, tandis que les techniques actuelles de dessalement nécessitent entre 6 et 68 kWh pour dessaler 1 m^3 d'eau de mer, il a été montré que les cellules microbiennes de dessalement peuvent récupérer 180 à 231 % plus d'énergie (sous forme de H_2) que l'énergie nécessaire pour dessaler une solution de chlorure de sodium d'une concentration allant de 5 à 20 g/L [166]–[168].

Une des limites de ce système reste le développement à grande échelle. Un prototype de 105 L a récemment été développé par Zhang et He [169]. Cette étude démontre que le courant

produit par le prototype est de 670 mA, lorsqu'aucun potentiel n'est appliqué, ce qui correspond à un dessalement de 3,7 kg/(m^3.jour). Cependant, lorsqu'un potentiel de 1,1 V est appliqué, il a été démontré que le courant produit était de 2 000 mA pour un dessalement de 9,2 kg/(m^3.jour). Dans le cas de ce prototype, il est nécessaire de continuer les recherches pour améliorer le système afin de ne plus appliquer de potentiel et donc diminuer la consommation d'énergie.

Cette technologie peut se révéler intéressante dans les régions pauvres n'ayant pas accès à l'eau potable.

9.3. Production d'hydrogène

Un système détourné des PACMs a également été envisagé afin de produire du dihydrogène à la cathode : ce sont les électrolyseurs microbiens [160], [170], [171]. La fermentation bactérienne permet de produire 4 moles de dihydrogène par mole de glucose lorsque le produit final est de l'acétate. Dans ce cas, la fermentation du glucose en acétate produit 2 moles d'acétate (**Équation 6**). Si le produit final est du butyrate, alors seulement 2 moles de dihydrogène sont produites par mole de glucose (**Équation 7**).

$$C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow 4H_2 + 2CO_2 + 2C_2H_4O_2$$ **Équation 6**

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2H_2 + 2\,CO_2 + C_4H_8O_2$$ **Équation 7**

Ainsi en pratique, seulement 2 à 3 moles de dihydrogène sont produites par mole de glucose. Il peut, néanmoins, être envisagé de dégrader l'acétate ainsi produit par des bactéries dans le compartiment anodique d'une biopile microbienne. L'oxydation de l'acétate à l'anode produit 8 moles d'hydrogène (**Équation 8**). Or, lorsqu'un potentiel d'au moins -410 mV (vs NHE) à pH 7 est appliqué à la cathode, il est possible de produire du dihydrogène [172]. Ainsi un potentiel de 250 mV a été appliqué aux bornes de la biopile afin de permettre la réduction de l'hydrogène en dihydrogène (**Équation 9**).

Anode : $$C_2H_4O_2 + 2H_2O \rightarrow 8H^+ + 2CO_2 + 8e^-$$ **Équation 8**

Cathode : $$8H^+ + 8e^- \rightarrow 4H_2$$ **Équation 9**

Potentiellement, il est donc possible de produire 4 moles supplémentaires de dihydrogène par mole d'acétate. Sachant, que pour une mole de glucose, 2 moles d'acétate sont produites, cela ferait donc 8 moles supplémentaires de dihydrogène produites. Il faut, cependant, prendre en compte le rendement faradique de transformation de l'acétate en électrons de 78 % et un rendement de production de l'hydrogène de 92 % ce qui revient à une production de 2 à 3 moles de dihydrogène par mole d'acétate. La combinaison entre la fermentation du glucose et ce système de PACM fournirait alors entre 8 et 9 moles de dihydrogène. Cette production de dihydrogène correspond à un coût énergétique équivalent à 1,2 moles de dihydrogène produit par mole de glucose lorsque le dihydrogène est produit par électrolyse.

9.4. Biocapteurs environnementaux

Les biopiles microbiennes sont aussi envisagées comme biocapteurs environnementaux [173]. Une des applications visées concerne la détection de la demande biochimique en oxygène (DBO). La DBO est la quantité d'oxygène nécessaire pour oxyder les matières organiques biodégradables par voie biologique (oxydation par des microorganismes). La technique actuellement adoptée pour mesurer la concentration de matières organiques biodégradables dans les eaux usées est la DBO_5 (adoptée en 1936 par l'American Public Health Association Standard Methods Comittee). Elle consiste à mesurer la DBO au bout de cinq jours à 20°C (température favorable à l'activité des microorganismes consommateurs d'oxygène) et à l'obscurité (afin d'éviter toute photosynthèse parasite). La concentration initiale en oxygène est dans un premier temps mesurée. Dans un second temps, la concentration résiduelle en oxygène est mesurée cinq jours après. Ainsi la BDO_5 est la différence entre ces deux concentrations. Cette technique n'est donc pas instantanée et consomme du temps. Une alternative envisagée à cette technique est l'utilisation de piles à combustible microbiennes. Une étude de Kim et al [174] a montré qu'à partir d'une biopile, utilisant des boues activées afin de former le biofilm, la charge électrique (exprimée en Coulomb) était proportionnelle à la DBO des eaux usées. Cette biopile a notamment démontré une grande stabilité puisqu'elle a fonctionné pendant au moins 5 ans (date de la publication).

Les biopiles microbiennes submersibles peuvent également être utilisées comme capteur d'oxygène dissous dans l'eau en assurant un temps de réponse de moins de quatre minutes [175]. En effet, la densité de courant augmente linéairement avec la concentration d'oxygène dissous.

9.5. Bioremédiation

La bioremédiation est la décontamination des milieux pollués (par exemple le nitrate ou l'uranium (VI)) par la dégradation chimique de ces polluants ou par l'intermédiaire de bactéries (oxydoréduction).

L'idée d'utiliser des biopiles microbiennes pour la bioremédiation de nitrate in situ a été explorée par Gregory et al [176]. Contrairement aux autres applications, la bioélectrode est la cathode. Les polluants seront donc réduits par le biofilm présent à la surface de la cathode. Le biofilm peut soit être issu d'une culture mixte soit d'une culture pure de *Geobacter metallireducens* dans un système complètement anoxique (privé de dioxygène). L'espèce *Geobacter* est connue pour produire de l'électricité dans les biopiles microbiennes [38], [39] et être utilisée comme accepteur d'électrons, mais il a aussi été démontré que *Geobacter* était capable d'utiliser les électrons de la cathode [176]. En effet, lorsqu'un potentiel de 0,5 V (vs Ag/AgCl) est appliqué, la culture pure de *G. metallireducens* utilise les électrons de la cathode afin de réduire le nitrate en nitrite. Il a aussi été observé que des cultures de *G. sulfurreducens* étaient capables de réduire le fumarate en succinate [176] et que les performances pouvaient être améliorées en remplaçant le graphite par de l'acier inoxydable [177], [178]. La réduction de l'uranium (VI) soluble en uranium (IV) insoluble a aussi été étudiée par Gregory et Loveley [179].

9.6. Production d'électricité

L'utilisation de matières organiques présentes dans l'environnement comme source de combustible présente un intérêt économique pour la production d'électricité [28], [180], [181]. De plus, ces PACMs pourraient être utilisées dans des régions où l'accès à l'électricité est difficile. Le problème majeur actuel réside dans la conception de PACMs à grande échelle [182]. La majorité des biopiles actuelles sont construites en laboratoire.

Un exemple de PACM à grande échelle est celle qui a été construite par l'équipe de L. Tender (Massachussetts University, Etats-Unis) [183]. Il s'agit d'une PACM benthique, c'est-à-dire que l'anode est insérée dans les sédiments marins tandis que la cathode se situe dans l'eau de mer (contenant l'oxygène dissous). Les anodes utilisées sont en plaques de graphite et les cathodes en brosse de graphite. Ce prototype pèse 36 kg. Les performances de cette PACM ont été stables pendant un an (puissance de 36 mW) ce qui a permis d'alimenter des dispositifs

météorologiques en discontinu grâce à un condensateur qui permettait de stocker l'électricité produite pour la délivrer durant le temps de fonctionnement des équipements.

10. Conclusions

Ce chapitre aborde le contexte scientifique dans lequel s'inscrit la thématique de recherche développée lors de ces travaux, à savoir les piles à combustible microbiennes. Il est apparu que même si les systèmes bio-électrogènes ont été découverts au début du XXème siècle, ce n'est seulement qu'au cours des dernières décennies que la recherche s'est intensifiée. Les PACMs sont à l'interface de plusieurs disciplines : la microbiologie qui s'intéresse aux biofilms et aux mécanismes de transfert électronique entre le biofilm et l'électrode, l'électrochimie qui permet de caractériser les performances des biopiles, la chimie pour le développement et la caractérisation de nouveaux matériaux d'électrodes et de membranes et l'ingénierie des procédés pour la conception et le pilotage de ce procédé de valorisation électrique des eaux usées.

Le principe de fonctionnement des PACMs, ainsi que les mécanismes mis en jeu lors de l'oxydation d'une source carbonée par un biofilm électroactif ont été présentés. Les pistes pouvant être suivies pour l'amélioration des performances des biopiles ont également été avancées. Il en ressort deux axes principaux pour augmenter ces performances : la modification des matériaux constituant les électrodes et le design de la biopile. Ce seront principalement ces deux points qui seront développés dans la suite de ces travaux.

CHAPITRE 2 :

MATERIEL ET METHODES

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

1. Préparation et modification d'électrode

1.1. Synthèse du graphène

La synthèse du graphène est réalisée en trois étapes :

- Graphite pré-oxydé :

L'oxyde de graphite a été synthétisé à partir de poudre de graphite (40798 Graphite Powder, synthetic, conducting grade, 325 mesh, 99,9995 %, metal basis, Alfa Aesar) par la méthode d'Hummers modifiée [129], [130]. La poudre de graphite (20 g, Alfa Aesar) est ajoutée dans une solution à 80 °C d'acide sulfurique concentrée (30 mL, H_2SO_4, Sigma Aldrich), de persulfate de potassium (10 g, $K_2S_2O_8$, Sigma Aldrich) et de pentoxyde de phosphore (10 g, P_2O_5, Sigma Aldrich). Le mélange obtenu (de couleur bleu foncé) est laissé à température ambiante pendant 6 h. Il est ensuite dilué avec de l'eau distillée, filtré et lavé à l'eau distillée jusqu'à ce que l'eau de rinçage atteigne un pH neutre. Le produit obtenu est mis à sécher à température ambiante toute la nuit. La poudre obtenue est du graphite pré-oxydé.

- Graphite oxydé :

Le graphite pré-oxydé est ensuite oxydé selon la méthode décrite par Hummers [129]. La poudre de graphite pré-oxydé (20 g) est ajoutée dans une solution d'acide sulfurique concentré (460 mL) à une température de 0 °C. Du permanganate de potassium (60 g, $KMnO_4$, Sigma Aldrich) est ajouté petit à petit sous agitation (agitateur magnétique) et en maintenant le bain de glace afin que la solution ne dépasse pas 20 °C (réaction exothermique). La solution est laissée sous agitation pendant 2 h à 35 °C. De l'eau distillée (920 mL) est ajoutée et après 15 min, la réaction est terminée par l'ajout d'une grande quantité d'eau distillée (2,8 L) et de peroxyde d'hydrogène 30 % (50 mL). La couleur du mélange devient jaune clair. Ce mélange est ensuite filtré et rincé avec 5 L d'une solution 1/10 d'acide chlorhydrique (37 %, Sigma Aldrich) dans le but d'éliminer les ions métalliques.

La poudre obtenue est de l'oxyde de graphite. Elle est suspendue dans de l'eau distillée afin d'obtenir une dispersion visqueuse marron à 2 % en masse. Cette dispersion est ensuite dialysée dans un sac à dialyse (Spectra/Por® 4, Spectrum Labs) afin d'éliminer complètement les ions métalliques et les acides. La dispersion d'oxyde de graphite obtenue à 0,5 % m/v est stable pendant plusieurs mois à température ambiante [130].

- Oxyde de graphène réduit :

La dispersion d'oxyde de graphite est ensuite dispersée dans de l'eau Milli-Q afin de réaliser une dispersion à 0,05 % m/v. L'exfoliation de l'oxyde de graphite en oxyde de graphène est réalisée par sonication dans un bain à ultrason (150 W, EMAG) pendant 30 min. La dispersion marron obtenue est ensuite centrifugée à 3 000 tours par minute (Centrifuge 5804, Eppendorf) afin d'enlever toute trace d'oxyde de graphite non exfolié. Dans le but de convertir chimiquement l'oxyde de graphite en graphène, la dispersion (5 mL) est mélangée avec de l'eau Milli-Q (5 mL), de l'hydrazine (5 µL, N_2H_4, 35 % en masse dans de l'eau) et de l'ammoniaque (35µL, NH_4OH, 28 % en masse dans de l'eau) dans un flacon hermétique. Après avoir été vigoureusement agité, le flacon est placé dans un bain marie à 95 °C pendant 1 h. La dispersion obtenue de couleur noire est de l'oxyde de graphène réduit (rGO pour Reduced Graphene Oxide) [184].

1.2. Méthode de dépôt dite couche par couche

L'électrode en mousse d'acier inoxydable (AISI 316, 6,35 mm d'épaisseur, Good Fellow) a été modifiée avec du rGO en utilisant la méthode dite couche par couche [185]. Dans le but d'adsorber le rGO (qui est négativement chargé) sur la surface de l'électrode, il est important de former une première monocouche chargée positivement sur la surface de l'électrode. Ainsi, la première couche est formée par l'adsorption d'un poly-cation, le PolyEthylèneImine (PEI) à la surface de l'électrode. L'électrode est donc plongée dans une solution de PEI à 1 mg/mL pendant 15 min et est ensuite rincée avec de l'eau distillée et séchée à l'azote. L'électrode, avec la première couche de PEI, est ensuite plongée dans la dispersion de rGO pendant 15 min, rincée avec de l'eau distillée et séchée à l'azote. Ce processus est répété 5 fois dans le but de faire 5 bicouches de PEI/rGO (**Figure 20**). Cette électrode est nommée SSF/$(PEI/rGO)_5$.

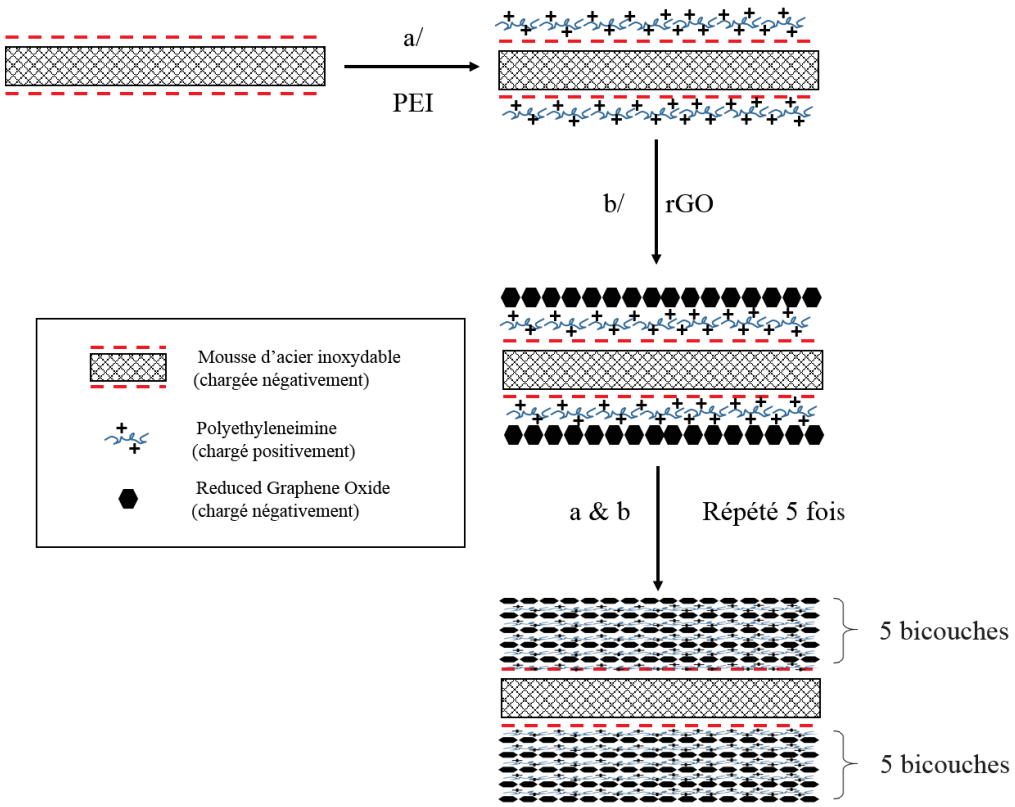


Figure 20 *: Schéma de la modification de l'électrode par du rGO en utilisant la méthode couche par couche.*

2. Techniques de caractérisation électrochimique

Il est important de présenter l'équation gouvernant les systèmes électrochimiques : l'équation de Nernst (**Équation 10**) qui permet de relier le potentiel de l'électrode aux concentrations des espèces participantes au processus d'oxydo-réduction à l'électrode du type « *Ox* + *ne*$^-$ → *Red* », où Ox est la forme oxydée et Red la forme réduite du couple redox [186].

$$E = E_0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[Oxydant]}{[Réducteur]} \qquad \textbf{Équation 10}$$

Avec :

E le potentiel de l'électrode en [V]

E_0 le potentiel standard du couple redox mis en jeu en [V],

R la constante des gaz parfaits égale à 8,31 J/(mol.K)

n le nombre d'électrons transférés lors de la demi-réaction d'oxydo-réduction

F la constante de Faraday égale à 9,6485x10^4 C/mol

[Oxydant] et [Réducteur] les concentrations en espèces oxydées et réduites en [mol/L]

L'équation de Nernst permet de déterminer la tension d'équilibre de l'électrode par rapport au potentiel standard du couple redox mis en jeu en fonction des concentrations des espèces oxydées et réduites.

2.1. Electrodes

Les caractérisations électrochimiques ont été réalisées dans un système classique composé de trois électrodes (**Figure 21**) : une électrode de travail (l'anode), une électrode de référence (Ag/AgCl saturée en KCl) et une contre électrode, constituée soit d'un bloc de graphite soit d'un fil de platine.

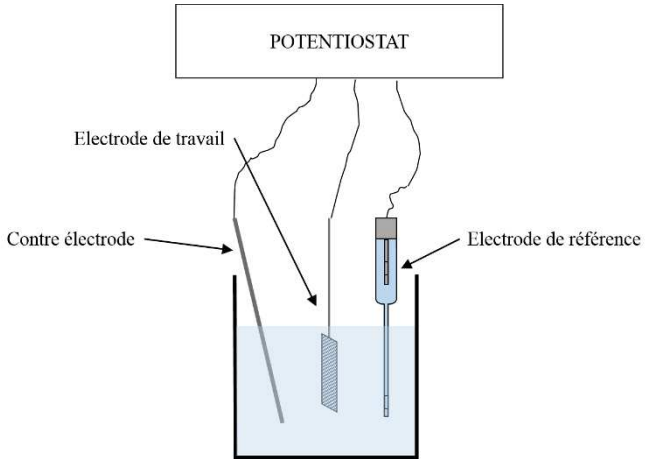


Figure 21 *: Système électrochimique à trois électrodes.*

Trois types d'électrode de travail ont été testés : de la mousse d'acier inoxydable, de la mousse d'acier inoxydable modifiée par du graphène (SSF/(PEI/rGO)$_5$) et du feutre de carbone (6,35 mm d'épaisseur, porosité de 99,0 %, diamètre des fibres de 6 µm, Alfa Aesar). Avant utilisation, les mousses d'acier inoxydable sont nettoyées dans une solution 50 : 50 (v/v) d'acétone : éthanol pendant 20 min et ensuite rincées à l'eau distillée.

Afin de comparer les résultats obtenus avec la littérature, les densités de courant ainsi que les puissances obtenues sont normalisées avec la surface géométrique de l'électrode. La surface géométrique de l'électrode est de 10 cm² sauf indication contraire.

2.2. Chronoampérométrie

La chronoampérométrie est une technique utilisée afin d'enregistrer le courant en fonction du temps à un potentiel imposé à l'électrode de travail et choisi par l'utilisateur [186]. Cette

technique permet notamment de suivre la formation d'un biofilm électroactif à la surface de l'électrode en observant une augmentation de courant au cours du temps correspondant ainsi à l'activité catalytique du biofilm.

2.3. Voltammétrie cyclique

La voltammétrie cyclique (VC) est une technique potentio-dynamique durant laquelle un potentiel est balayé à une vitesse constante entre deux potentiels limites, imposés par l'utilisateur, pendant que le courant généré est mesuré [187]. Pour une expérience non faradique, c'est-à-dire quand il n'y a pas d'espèces redox actives présentes dans la solution ou associées à l'électrode, la courbe de VC générée sera de forme rectangulaire et présentera un comportement de charge et décharge : c'est le courant capacitif (**Figure 22.a**).

Lorsqu'une espèce redox active est présente en solution, la courbe de VC comporte deux pics distincts correspondant à l'oxydation et la réduction de cette espèce (**Figure 22.b**).

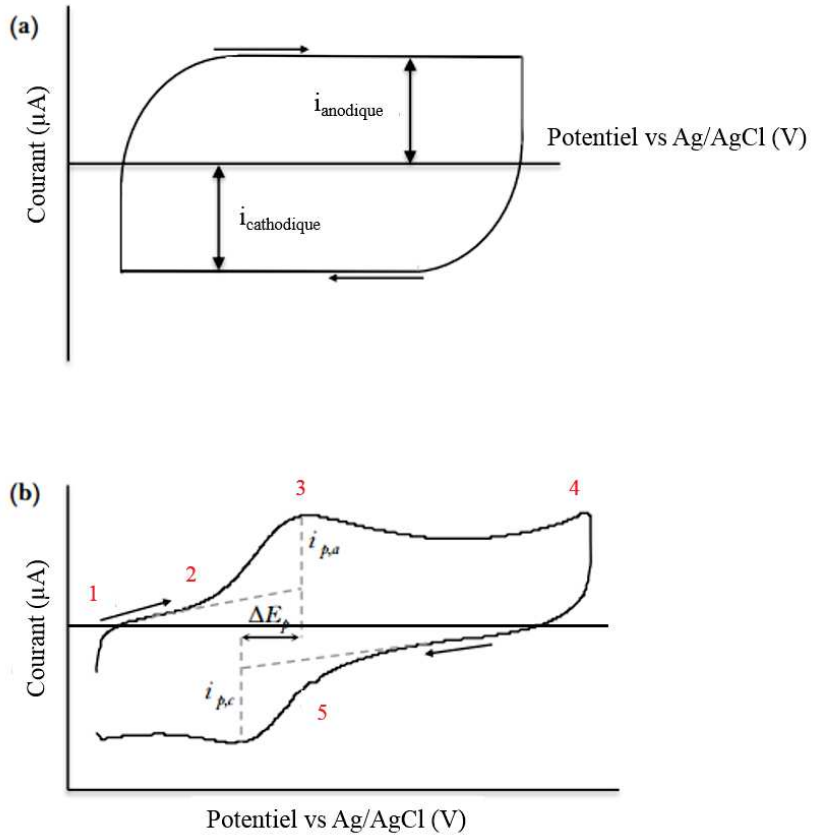


Figure 22 *: représentation schématique d'une courbe de voltammétrie cyclique (a) réponse d'un courant non-faradique et (b) réponse du courant en présence d'un couple redox, les flèches représentent le sens de variation du potentiel.*

Au début du balayage, on observe le courant non-faradique (point 1). Lorsque le potentiel d'électrode se rapproche du potentiel d'oxydation, le courant augmente et indique que l'oxydation commence à se produire à la surface de l'électrode (point 2). Au pic du potentiel d'oxydation, l'oxydation du couple redox est instantanée et le processus est uniquement limité par le taux de diffusion de l'espèce réduite en solution jusqu'à la surface de l'électrode (point 3). Le point 4 indique le potentiel auquel le balayage est inversé. L'espèce produite précédemment commence à être réduite lorsque l'on se rapproche du potentiel de réduction de l'espèce (point 5). Lorsque le système est complètement réversible, la hauteur des pics d'oxydation et de réduction ($i_{p,a}$ et $i_{p,c}$ respectivement) doit être identique. Il en est de même pour la largeur du pic ainsi que la forme générale de la courbe.

Cette technique permet ainsi de caractériser l'électroactivité du biofilm présent à la surface de l'électrode. Plus le biofilm électroactif sera important sur l'électrode, plus le pic d'oxydation (dans le cas de l'anode) sera grand. Dans le cas d'un système à un seul compartiment, le montage utilisé sera un montage à trois électrodes dans le même compartiment. Dans le cas d'une configuration biopile à deux compartiments, le montage sera aussi à trois électrodes. Cependant, l'électrode de travail sera l'anode, la contre électrode sera la cathode et l'électrode de référence sera située dans le compartiment anodique afin de caractériser l'anode.

2.4. Courbes de polarisation et courbe de puissance

La courbe de polarisation correspond à la courbe caractéristique tension-courant d'une biopile. Cette courbe est obtenue en faisant varier une résistance branchée aux bornes de la biopile (à l'anode et à la cathode). Un ampèremètre est branché en série et un voltmètre en parallèle (**Figure 23**) afin de s'assurer des valeurs obtenues. De plus, dans le cas où la résistance variable ne serait pas calibrée, cette technique permet de s'affranchir d'utiliser la valeur de la résistance pour extraire les valeurs caractéristiques de la biopile. La résistance variable est placée sur la valeur la plus élevée puis est progressivement diminuée. La tension ainsi que le courant caractéristique de chaque valeur de résistance sont enregistrés. Il est important, lorsque l'on change de décade, de ne pas avoir une valeur de résistance nulle afin de ne pas court circuiter la biopile.

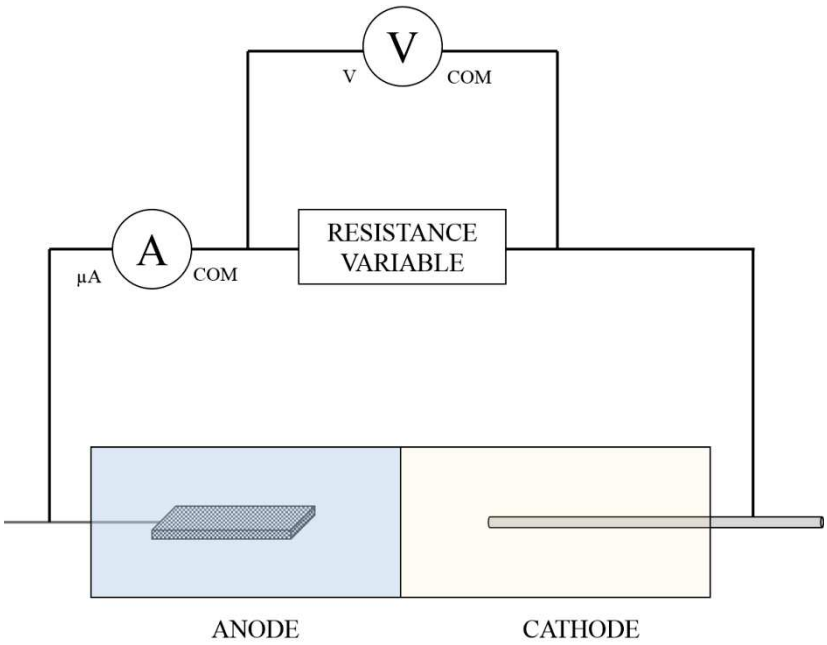


Figure 23 : *schéma du montage lors de la caractérisation de la puissance de la biopile.*

Grâce à cette technique, il est possible d'extraire quatre paramètres de performance : la tension en circuit ouvert (OCV), le courant de court-circuit (i_{cc}), la puissance maximale (P_{max}) et la résistance interne du système (R_{int}). La courbe de puissance est obtenue par la relation suivante (**Équation 11**) :

$$P = U * I$$ **Équation 11**

Avec

P la puissance en [W],

U la tension en [V],

I l'intensité en [A].

L'allure des courbes obtenues est représentée en **Figure 24**.

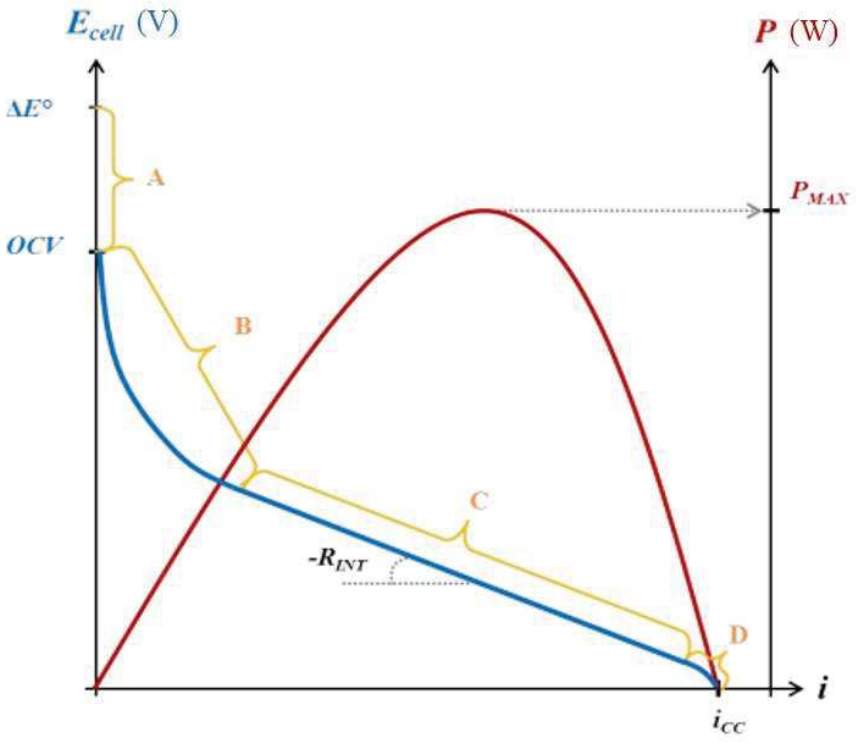


Figure 24 : *Exemple de courbe de polarisation (tension et puissance en fonction du courant).*

L'énergie libérée lors d'une réaction redox (cas de la pile galvanostatique) ou l'énergie nécessaire pour accomplir une réaction redox (cas de l'électrolyseur) est liée à la différence de potentiel thermodynamique ΔE^0 du système électrochimique. Cette force correspond à la différence entre les potentiels standards de l'anode et de la cathode. Dans un cas idéal, la mesure de cette différence de potentiel est mesurée en circuit ouvert entre l'anode et la cathode (OCV pour open circuit voltage), c'est-à-dire sans passage de courant électrique entre les deux électrodes. Expérimentalement, la différence de potentiel mesurée est différente de la valeur théorique car il existe un certain nombre de pertes survenant à l'anode et les surtensions à la cathode, ce qui limite les performances du système. On peut diviser ces pertes en deux catégories : celles liées aux limites de fonctionnement du système électrochimique et celles liées aux catalyseurs. Quatre zones distinctes sont observées sur la **Figure 24** :

- Zone A : pertes liées à la thermodynamique des réactions et aux courants internes.

La perte thermodynamique est liée au caractère vivant et métaboliquement actif du catalyseur bactérien à l'anode. Une partie de l'énergie est utilisée pour le maintien et la reproduction des bactéries électroactives. Cette dissipation d'énergie est une perte nécessaire au développement d'un biofilm dense et actif. La grande majorité de l'énergie récupérée par les

microorganismes est sous forme d'ATP. La quantité d'énergie dissipée est liée aux voies de transfert électronique extracellulaires des bactéries et notamment aux potentiels des molécules redox employées pour les étapes ultimes de transfert d'électrons avec l'anode. En effet, les électrons sont transmis au système à un potentiel supérieur au potentiel redox du donneur d'électrons. Ce potentiel supérieur correspond au potentiel de la molécule électroactive impliquée dans le transfert électronique avec l'électrode.

La diminution du potentiel d'abandon (OCV) par rapport à la valeur théorique déterminée par la thermodynamique (ΔE_0) est également liée aux courants internes. Ce phénomène est attribué à deux facteurs : la perméabilité de la membrane à d'autres espèces électroactives (oxydant, réducteurs et électrons) ainsi que le manque de sélectivité chimique de l'électrode aussi capable de catalyser des réactions parasites. Il en résulte l'apparition d'un potentiel mixte. Par exemple, au niveau de l'anode, l'oxydation d'une espèce comme l'acétate produira des protons, du dioxyde de carbone et des électrons. En condition aérobie, la présence des électrons permettra ainsi la réduction de l'oxygène (**Figure 25**).

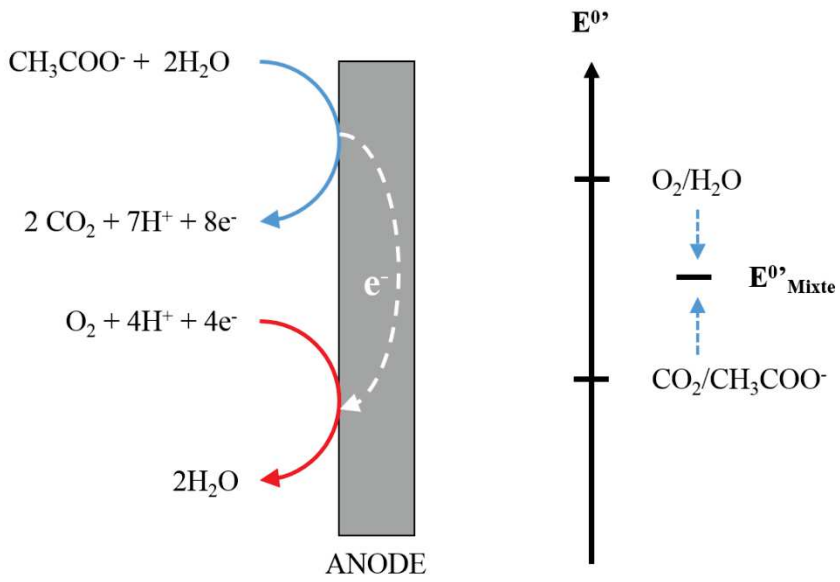


Figure 25 : *Schéma de principe des pertes liées aux courants internes et apparition d'un potentiel d'abandon mixte.*

- Zone B : pertes d'activation et limites d'interface.

Ces pertes d'énergies sont liées d'une part à l'initiation des réactions d'oxydation et de réduction (comme la chaleur) et d'autre part à la cinétique des réactions de transfert électronique extracellulaire (pili, médiateur ou le cytochrome terminal) vers l'anode pour les biofilms anodiques. La diminution des pertes est liée à la quantité de microorganismes électroactifs

connectés aux électrodes, à la vitesse de transfert des électrons de la réaction limitante dans la chaine de transport des électrons ainsi qu'à l'activité métabolique du biofilm électroactif. Ces pertes sont particulièrement présentes à des faibles densités de courant (lorsque la résistance est la plus élevée). Il est possible de réduire ces pertes en améliorant le catalyseur à la cathode ou la bioanode en sélectionnant une espèce ou un consortium bactérien performant dans le transfert électronique extracellulaire. Il est également possible d'améliorer les propriétés de surface des électrodes afin d'améliorer la connexion des microorganismes sur l'électrode et d'en augmenter l'attachement.

- Zone C : pertes ohmiques et transfert de charge.

Ces pertes sont dues à la résistance du flux d'électrons à travers les électrodes et du flux des ions à travers l'électrolyte et la membrane. Ces deux phénomènes se caractérisent par une diminution du potentiel de façon linéaire par rapport à l'intensité et obéissent donc à la loi d'Ohm. La pente de cette portion correspond à la résistance interne (R_{int}) de la biopile correspondant aux résistances électriques (liées aux contacts et à la conductance des électrodes) et les résistances ioniques (conductivité de la membrane et de l'électrolyte) (**Équation 12) :**

$$\Delta U_{cellule} = R_{int} * \Delta I$$ **Équation 12**

Avec

U la tension de la biopile [V]

R_{int} la résistance interne [Ω]

I le courant [A]

Il est possible de minimiser ces pertes en augmentant la conductivité des matériaux utilisés et en améliorant le transfert des ions en diminuant, par exemple, la distance entre l'anode et la cathode.

- Zone D : limites au transfert de masse et pertes de diffusion et de concentration.

Il y a une limitation du transfert massique des réactifs (ou des produits réactionnels) de ou vers la surface de l'électrode et qui correspond à la cinétique de l'étape de transfert limitante. Pour un microorganisme, les cinétiques de la catalyse se résument à la vitesse globale du métabolisme. A fort courant, le métabolisme des bactéries électroactives n'est plus capable de fournir les espèces réduites au niveau de l'électrode avec une vitesse suffisante créant ainsi une limite. Cependant, il est difficile de détecter un tel gradient au sein du biofilm et la nature de cette étape limitante n'est pas connue.

Ces pertes sont aussi liées au gradient de concentration de l'espèce redox active qui réagit au niveau de la surface de l'électrode. Il y a un épuisement des réactifs à proximité de l'électrode et une accumulation des produits issus de la réaction lorsque le courant est élevé.

A partir de la courbe de puissance, il est possible de déterminer la résistance interne propre à la biopile. En effet, lorsque la biopile délivre la puissance maximale, la résistance interne est égale à la résistance externe. On parle donc de circuit adapté. Il est donc possible de déterminer la résistance inter à partir de la relation suivante (**Équation 13**) :

$$R_{int} = \frac{P_{max}}{I^2}$$ **Équation 13**

Où :

R_{int} est la résistance interne de la biopile en Ω

P_{max} la puissance maximale délivrée par la biopile en W

I le courant associé à la puissance maximale en A

2.5. Calcul du rendement faradique

Les rendements faradiques (RF) sont calculés comme le rapport de la quantité d'électricité (Coulomb) obtenue par intégration du courant (C_E) par rapport à la quantité théorique d'électrons disponibles dans le substrat oxydé (C_T) (**Équation 14**) :

$$RF = \frac{C_E}{C_T} * 100$$ **Équation 14**

où C_E est la quantité d'électricité (Coulomb) mesurée expérimentalement par l'intégration du courant I (en Ampère) par rapport au temps t (en secondes) (**Équation *15***) :

$$C_E = \int_{t0}^{tf} I.dt$$ **Équation 15**

et C_T représente la quantité d'électricité (en Coulomb) théorique calculée par (**Équation *16***) :

$$C_T = \frac{F.\mathrm{n.C.V}}{M}$$ **Équation 16**

Avec

F est la constante de Faraday (96 485 C/mol d'électrons)

n le nombre d'électrons générés par mole de combustible

C la concentration de combustible consommée dans l'anolyte (g/L)

V le volume de l'anolyte (L)

M la masse molaire du combustible

3. Caractérisations physico-chimiques

3.1. Microscopie électronique à balayage

Des images de microscopie électronique à balayage (MEB) ont été prises afin d'observer la surface des électrodes avant et après modification ainsi que l'adhésion de biofilm à la surface de l'électrode. Le MEB utilisé est un S4800 FEG – HR d'Hitachi (IEM, Université de Montpellier).

Avant analyse, les échantillons d'électrodes sont placés sur un disque en acier avec du ruban adhésif double face en carbone. Les échantillons sont ensuite recouverts d'une fine couche de Pt/Pd (4nm) déposée par évaporation sous vide afin d'avoir une couche conductrice à la surface de l'échantillon.

Les échantillons possédant un biofilm à leurs surfaces sont prétraités avant analyse afin de fixer les bactéries à la surface de l'électrode. Les échantillons sont plongés dans une solution à 4 % de glutaraldehyde pendant 4 h. Ils sont ensuite rincés avec de l'eau ultra pure trois fois, puis déshydratés à l'éthanol. Pour ce faire, les échantillons sont placés successivement 10 minutes dans des solutions de concentrations croissantes d'éthanol : 20 %, 40 %, 60 %, 80 % et 98 %. Les solutions d'éthanol ont été préparées à partir de la table de Gay-Lussac (v/v). Les échantillons sont finalement rincés dans une solution d'isoamyl acétate (deux fois pendant 10 min) et séchés pendant 3 h dans un dessiccateur [188].

3.2. Microscopie à force atomique (AFM)

Des images de microscopie à force atomique ont été réalisées afin de caractériser l'oxyde de graphène synthétisé [189]. Cette technique permet de visualiser la topographie de la surface d'un échantillon. Ainsi, il est possible de déterminer l'épaisseur des feuillets d'oxyde de graphène et de démontrer que la dispersion d'oxyde de graphène est bien constituée de monocouche d'oxyde de graphène.

3.3. Diffraction aux rayons X

La diffraction aux rayons X (DRX) [190] a été utilisée afin de déterminer les structures de la poudre de graphite, de l'oxyde de graphène et de l'oxyde de graphène réduit et ainsi vérifier que de l'oxyde de graphène réduit a bien été synthétisé.

La DRX se réalise sur des poudres. Dans les cas de l'oxyde de graphène et de l'oxyde de graphène réduit qui sont en suspension dans une solution aqueuse, une poudre anhydre est obtenue après centrifugation à 4000 tour/min pendant 30 minutes (Centrifuge 5804, Eppendorf), et séchage des culots pendant 48h dans un dessiccateur.

3.4. Spectrométrie photoélectronique X

La spectrométrie photoélectronique (XPS) [191] a été utilisée afin de confirmer la réduction de l'oxyde graphène par voie chimique en oxyde de graphène réduit. Les analyses se font seulement sur des poudres. Aussi, le même protocole que celui décrit pour l'analyse de DRX est appliqué aux suspensions d'oxyde de graphène et d'oxyde de graphène réduit.

4. Détermination du régime permanent et du flux dans le compartiment anodique

Il est important de connaître le temps nécessaire pour l'établissement d'un régime permanent au sein du bioréacteur. Un régime dit permanent est atteint quand le milieu en sortie du réacteur correspond au milieu d'alimentation. Il est caractérisé par le temps de séjour qui correspond à l'inverse du taux d'alimentation.

Le taux d'alimentation a été déterminé pour différents débits : 10, 50 et 100 mL/h. Comme le volume du réacteur est constant, l'équation du taux d'alimentation s'écrit (**Équation 17**) :

$$D = \frac{Q_v}{V}$$ **Équation 17**

Où

D est le taux d'alimentation en [h^{-1}],

Q_v le débit d'alimentation en [mL/h],

V le volume du compartiment en [mL].

Le volume du réacteur étant égal à 50 mL, les débits appliqués correspondent à des taux d'alimentation allant de 0,2 à 2 h^{-1}, soit un temps de passage dans le compartiment anodique allant de 5 h à 0,5 h respectivement.

L'évaluation du régime permanent a été réalisée avec du permanganate de potassium ($KMnO_4$) [192]. Le $KMnO_4$ étant de couleur violette, il est donc possible de suivre l'évolution de la concentration par mesure d'absorbance à une longueur d'onde de 535 nm. Etant donné que c'est un oxydant fort, il présente aussi l'avantage de ne pas adhérer aux parois du bioréacteur ce qui facilite le nettoyage contrairement à d'autres colorants tels que le bleu de méthylène.

4.1. Etalonnage

A partir d'une solution mère de $KMnO_4$ à 40 mg/L, différentes solutions étalons ont été préparées à des concentrations de 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 30 et 35 mg/L. Pour chaque concentration, trois solutions ont été testées. Les mesures d'absorbance ont été réalisées à 535 nm. L'évolution de l'absorbance en fonction de la concentration en $KMnO_4$ est reportée en **Figure 26**.

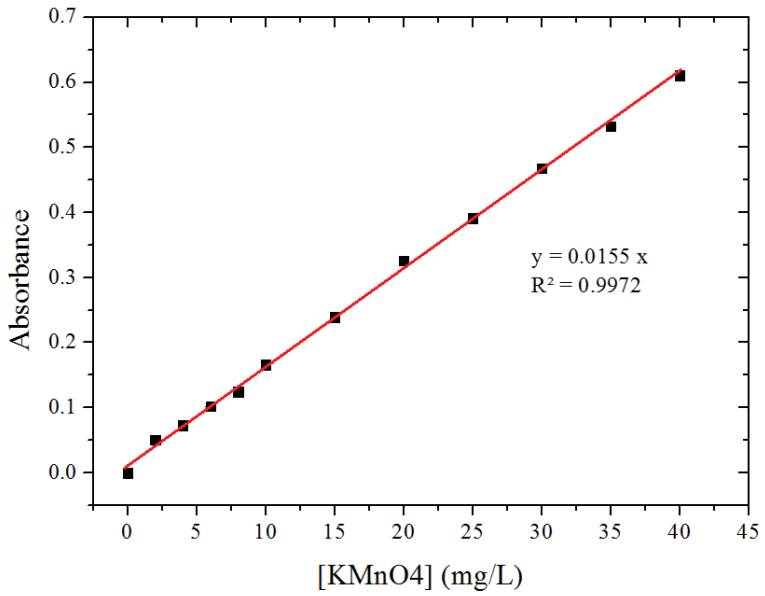


Figure 26 *: Evolution de l'absorbance en fonction de la concentration en $KMnO_4$ avec les écarts-types.*

L'absorbance augmente de façon linéaire avec l'augmentation de la concentration en $KMnO_4$ suivant l'équation (**Équation 18**) :

$$Absorbance = 0{,}0155 * [KMnO_4] \pm 0{,}01 \qquad \textbf{Équation 18}$$

4.2. Détermination de l'écoulement dans le bioréacteur par la mesure de la distribution des temps de séjour

Il est possible de déterminer l'écoulement au sein de la cellule à partir de la distribution des temps de séjour. Le temps de séjour est le temps moyen nécessaire à un élément pour passer au travers d'un système à l'équilibre. Il est défini par l'équation suivante (**Équation *19***) :

$$\tau = \frac{V}{Q} \qquad \textbf{Équation 19}$$

Avec

τ le temps de séjour en [h]

V le volume du compartiment égal à 50 mL

Q le débit en [mL/h]

Dans le cas d'un signal d'entrée ayant la forme d'un échelon unitaire, le bilan massique du traceur (ici le $KMnO_4$) peut s'écrire en prenant compte le fait que le volume V est parfaitement mélangé. On aura ainsi (**Équation 20**) :

$$QC_i = Q * C(t) + V\,\frac{dC(t)}{dt} \qquad \textbf{Équation 20}$$

Avec

Q le débit en [mL/h]

C_i la concentration initiale en $KMnO_4$ injectée dans le compartiment égale à 40 mg/mL

C(t) la concentration au temps t en [mg/mL]

t le temps en [h]

V le volume du compartiment égal à 50 mL

Cette équation est valable pour $t \geq 0$, avec comme condition limite C(t) = 0 pour t = 0. Son intégration est immédiate et l'on obtient la fonction de distribution F(t) (**Équation 21**) :

$$F(t) = \frac{C(t)}{C_i} = 1 - \exp(-\frac{t}{\tau}) \qquad \textbf{Équation 21}$$

Avec

F(t) la distribution des temps de séjour, sans unité

La distribution des temps de séjour au sein du bioréacteur a donc été déterminée par l'évolution de la concentration en $KMnO_4$ en fonction temps pour trois débits différents (10, 50 et 100 mL/h). Pour chaque point de mesure, trois échantillons ont été prélevés. Initialement, le bioréacteur est rempli avec de l'eau distillée. La concentration a été déterminée à partir des mesures de densité optique et a été rapportée en mg/L grâce à l'équation de calibration déterminée précédemment. L'évolution de la fonction de distribution en fonction du temps est représentée en **Figure 27.**

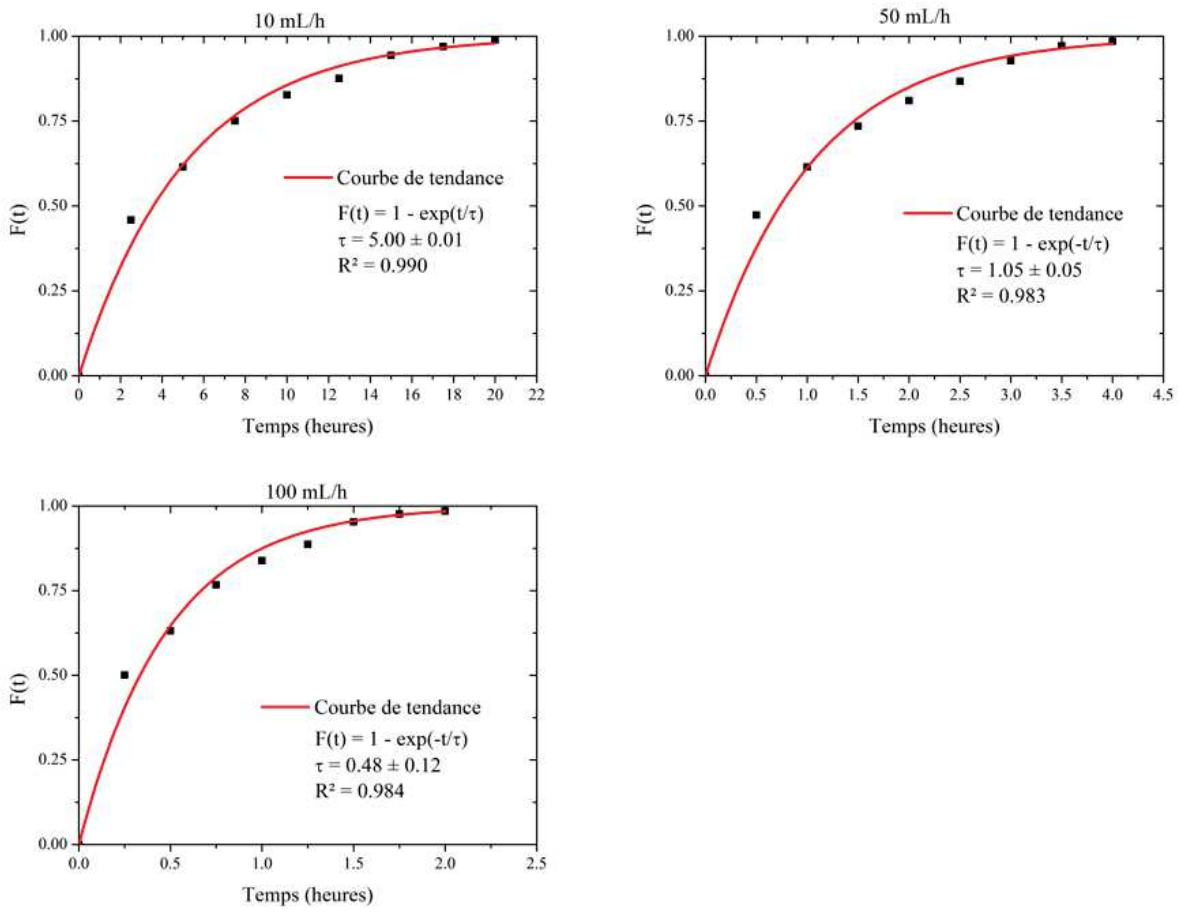


Figure 27 *: Evolution de la distribution des temps de séjour en fonction du temps pour différents débits : (A) 10 mL/h, (B) 50 mL/h et (C) 100 mL/h.*

On peut constater que quel que soit le débit appliqué au sein du compartiment anodique, l'équation régissant la distribution des temps de séjour correspond à un écoulement dans un réacteur parfaitement mélangé [193]. On peut également constater que le régime permanent est atteint après quatre temps de passages, c'est-à-dire que la concentration en sortie de compartiment est similaire à la concentration en entrée.

5. Souches bactériennes

Deux types de matériel biologique ont été utilisés lors de ces travaux afin de former des biofilms électroactifs : du lixiviat de terreau de jardin (chapitre 3) et une souche pure *Pseudomonas aeruginosa* (chapitres 4 et 5).

5.1. Lixiviat de terreau de jardin

Du terreau de jardin universel (Botanic) a été utilisé comme source d'inoculum pour la formation de biofilm électroactif. Sa composition et ses caractéristiques ont été reportées dans le **Tableau 6**.

TERREAU UNIVERSEL – BOTANIC		
COMPOSITION	**Caractéristiques**	
Tourbe noire et blonde écorces compostées compost végétal	Support de culture NFU 44-551	
	Matière sèche	30%
	Matière organique	60%
	Capacité de rétention d'eau	680 mL/L
	Conductivité	0,5 mS/cm
	pH	6,5

Tableau 6 *: Composition et caractéristiques du terreau de jardin.*

Le lixiviat de terreau est préparé en mélangeant 1 L de terreau de jardin (Botanic) avec 1 L d'une solution de chlorure de potassium (KCl) à 60 mM. Le KCl ajouté permet de fixer la conductivité du mélange à environ 7,5 mS/cm. Le mélange est ensuite agité pendant 24 h à température ambiante, puis est filtré. De l'acétate de potassium (20 mM), utilisé comme source de carbone, est ajouté au lixiviat de terreau obtenu. Le lixiviat est utilisé tel quel pour la formation de biofilm électroactif.

5.2. Souche pure : *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa est un bacille (0,5 – 1,0 x 1,5 – 5,0 µm) à Gram négatif, droit et très mobile du fait de son flagelle polaire (ciliature monotriche), et dépourvu de spores et de capsule. Cette bactérie est capable de se développer de +4 °C à +42 °C avec une température optimale de croissance de 37 °C. *P. aeruginosa* a un métabolisme strictement respiratoire avec l'oxygène comme dernier accepteur d'électrons même si dans certaines conditions, les nitrates peuvent aussi servir d'accepteur d'électrons. Largement présent dans la nature (eau, sols,

animaux et plantes), il est possible de retrouver *P. aeruginosa* sous deux formes : une forme libre ou planctonique et une forme sessile ou fixé à un support.

5.2.1. Conservation et inoculum

La souche est tout d'abord isolée sur milieu gélosé TSA-A à partir d'une suspension de *P. aeruginosa* en milieu TSA-B. Des aliquotes ont ensuite été réalisées à partir d'une colonie qui a été adsorbée sur des billes poreuses plongées dans une solution cryoprotectrice (Microbank, Pro-Lab, Etats-Unis) afin de conserver la souche à -80 °C.

Pour disposer de la souche sous forme rapidement utilisable, chaque mois, une nouvelle culture est réalisée à partir d'une cryobille, dans un milieu TSA-B (Biomérieux, France) en aérobiose à 37 °C, 24 h. Des isolements sont ensuite réalisés sur gélose TSA-A qui est incubé 24 h à 37 °C puis conservé à 4 °C. Les compositions des milieux TSA-A et TSA-B sont reportées dans le tableau suivant (**Tableau 7**) :

MILIEU TSA-A		**MILIEU TSA-B**	
Composants	Concentration	Composants	Concentration
Tryptone	17 g/L	Tryptone	17 g/L
Peptone papaïnique de soja	3 g/L	Peptone papaïnique de soja	3 g/L
Glucose	5 g/L	Glucose	5 g/L
Phosphate dipotassique	2,5 g/L	Phosphate dipotassique	2,5 g/L
NaCl	5 g/L	NaCl	5 g/L
Agar	15 g/L	pH	7,3
pH	7,3		

Tableau 7 : *Composition des milieux TSA-A et TSA-B.*

L'inoculum est obtenu en une étape : 10 mL de milieu TSA-B, contenus dans un erlen de 100 mL, sont ensemencés à partir d'une colonie isolée sur TSA-A puis placés 24 h à 37 °C sous agitation (150 rpm). Cette préculture est ensuite utilisée pour inoculer le bioréacteur à 2 % (v/v) de milieu TSA-B.

Deux milieux de cultures ont été utilisés comme électrolyte : un milieu riche et un milieu minimum synthétique.

5.2.2. Electrolytes

Le premier milieu de culture servant d'électrolyte est un milieu complexe favorisant la croissance du biofilm : le milieu TSA-B (Bouillon Trypcase-Soja) [194]. Ce milieu est utilisé pour former le biofilm lors des 24 premières heures en fonctionnement batch. Sa composition est reportée dans le **Tableau 7**. Ce milieu est ensuite remplacé dans le bioréacteur par du bouillon biofilm modifié (BBM). Ce milieu permet le maintien du biofilm [194]. La composition du milieu synthétique BBM est reportée dans le **Tableau 8**.

MILIEU BBM	
Composants	Concentration
$MgSO_4,2H_2O$	0,2 g/L
$FeSO_4,7H_2O$	0,0005 g/L
Na_2HPO_4	1,25 g/L
KH_2PO_4	0,5 g/L
$(NH_4)_2SO_4$	0,1 g/L
Glucose	5 g/L
pH	7,1

Tableau 8 : *Composition du milieu BBM.*

Du côté cathodique, une solution de 0.1 M de $Fe(CN)_6$ (dont de le potentiel de réduction est +0.36 V) sera utilisée comme catholyte afin de pas être limitant à la cathode.

5.2.3. Dénombrement des bactéries

L'évaluation de la population planctonique est réalisée en sortie de bioréacteur par mesure de densité optique (DO) à 620 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (PRIM, SECOMAM, France). Le zéro est fait sur le milieu de culture non inoculé. Lorsque la mesure de DO est supérieure à 0,3 unité densité optique (du fait de la sensibilité du matériel), la suspension cellulaire est diluée dans du milieu de culture.

5.2.4. Fonctionnement du système

Le fonctionnement du système se déroule en deux étapes distinctes : une phase de croissance du biofilm et une phase de maintien. Lors de la première étape, le système fonctionne en batch en milieu TSA-B pendant 24 h afin de favoriser la croissance de *P. aeruginosa*. Le compartiment anodique est ensuite alimenté en continu en milieu BBM à différents débits afin de maintenir le biofilm.

5.2.5. Stérilisation du système

L'ensemble du système est stérilisé à 121 °C pendant 15 minutes avec les électrodes, le milieu TSA-B dans le compartiment anodique et de l'eau distillée dans le compartiment cathodique. Après stérilisation, l'eau distillée est remplacée par une solution contenant 0,1 M de ferrocyanure de potassium et 0,1 M de chlorure de potassium. Tous les tuyaux permettant les connexions entre le milieu d'alimentation, la pompe et le réacteur sont stérilisés à 121°C pendant 15 minutes (il est important dans ce montage de limiter la longueur des tuyaux et de prévoir des tuyaux de remplacement dans le cas où un biofilm se formerait dans les tuyaux). L'inoculation est réalisée sous hotte stérile à flux laminaire de classe 2.

Les tuyaux de la pompe sont quant à eux désinfectés par passages successifs d'eau de Javel, d'éthanol et de milieu stérile. Les branchements avec le bidon d'alimentation et le bioréacteur se font à proximité d'une flamme.

5.3. Dosage du glucose

5.3.1. Méthode de Somogyi-Nelson

Le glucose résiduel (analysé à la sortie du bioréacteur) est quantifié par la méthode de Somogyi-Nelson [195], [196]. Cette méthode utilise les propriétés de réduction de certains sucres comme le glucose qui forme un complexe coloré (bleu) avec le cuivre oxydé et l'arsenomolybdate. La quantité de sucre réducteur est estimée par lecture de l'absorbance à 540 nm, à partir d'une courbe étalon (réalisée avec des concentrations de glucose allant de 0 à 0,25 mg/mL).

5.3.2. Protocole

Pour utiliser cette méthode, il est nécessaire de préparer trois réactifs :

- Réactif de Nelson A :

2,5 g de carbonate de sodium anhydre (Na_2CO_3), 2,5 de tartrate de potassium-sodium ($C_4H_4KNaO_6$), 2 g de bicarbonate de sodium ($NaHCO_3$) sont mélangés à 70 mL d'eau distillée, 2 g de sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4) sont ensuite ajoutés en pluie. La solution est complétée jusqu'à 100 mL avec de l'eau distillée. Ce réactif peut être stocké 3 mois à température ambiante.

- Réactif de Nelson B :

Solution saturée de sulfate de cuivre pentahydraté ($CuSO_4,5H_2O$) à 150 g/L d'eau distillée, acidifiée par ajout d'acide sulfurique concentré (H_2SO_4)

- Réactif d'arsénomolybdate :

5 g de molybdate d'ammonium ($(NH_4)_2MoO_4$) sont dissous dans 80 mL d'eau. 4,2 mL d'acide sulfurique concentré sont ajoutés à cette solution puis 5 mL d'une solution de sodium arséniate ($AsNa_3O_4$) à 0,12 g/L. Le volume final est ajusté à 100 mL avec de l'eau distillée. La solution obtenue est stockée à l'abri de la lumière pendant 24 h à 37°C avant utilisation. Le réactif est jaune avec des reflets verts.

Le protocole de dosage consiste tout d'abord à diluer 50 µL de l'échantillon dans 950 µL d'eau distillée. En effet, la concentration maximale en glucose à doser est de 2,5 g/L et le facteur de dilution doit être de 160 pour un volume final de 8 mL. 1 mL de réactif de Nelson C (25 mL de réactif de Nelson A mélangé extemporanément à 1 mL de réactif de Nelson B) est ensuite ajouté à l'échantillon dilué. Le mélange obtenu est placé dans un bain marie à ébullition pendant 20 min puis refroidi à température ambiante dans un bain d'eau froide pendant 5 minutes. 1 mL de réactif d'arsenomolybdate est ensuite ajouté au mélange et, après une incubation de 5 minutes à 37°C, 5 mL d'eau distillée sont ajoutés avant de lire l'absorbance à 540 nm.

5.3.3. Etalonnage

La courbe d'étalonnage de concentration en glucose est représentée en **Figure 28**.

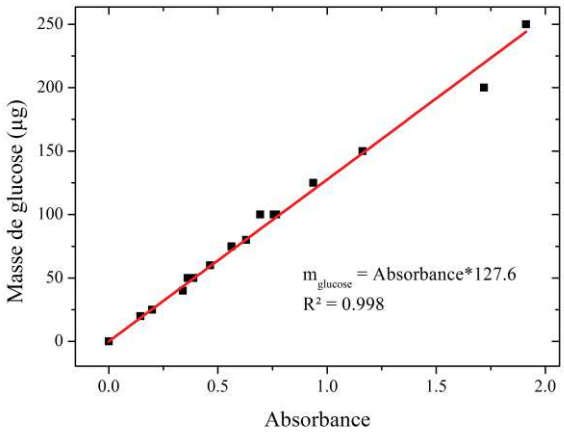


Figure 28 *: Courbe d'étalonnage pour déterminer la concentration en glucose.*

La masse de glucose résiduel est estimée à partir de l'équation suivante (**Équation 22**) :

$$m_{glucose} = 127{,}60 * \text{Absorbance} \pm 0{,}02$$ **Équation 22**

Afin d'estimer la concentration en glucose résiduel, cette équation doit être ramenée au volume de l'échantillon dosé qui est de 50 µL. Ainsi l'équation d'estimation de la concentration en glucose en g/L est (**Équation 23**) :

$$[\text{glucose}] = 2{,}55 * \text{Absorbance} \pm 0{,}02$$ **Équation 23**

5.4. Estimation du pH

L'évolution du pH a été suivie en sortie du compartiment anodique avec un pH-mètre (pH/Cond 720, InoLab). Cette acquisition permet de suivre l'activité métabolique au sein du bioréacteur puisque lors de l'oxydation du glucose par *P. aeruginosa*, il y a une acidification du milieu [197].

5.5. Microscopie optique

La pureté de la souche est contrôlée au cours du fonctionnement de la biopile par réalisation d'un état frais et observation par microscopie optique (Olympus BX51, Japon) à un grandissement x40.

CHAPITRE 3 : DEVELOPPEMENT D'ELECTRODES ET UTILISATION EN BIOPILE

Chapitre 3 : Développement d'électrodes et utilisation en biopile

La recherche sur les biopiles microbiennes est un sujet nouveau au sein de l'Institut Européen des Membranes. Dans un premier temps, il a donc fallu déterminer quelle était la source d'inoculum la plus adéquate afin de tester le matériau d'électrode pour la réalisation d'une anode. Pour cela, la source de microorganismes doit être peu contraignante et facile à mettre en œuvre. Le choix s'est ainsi porté sur le terreau de jardin compte tenu des travaux antérieurs publiés sur ce sujet [82], [198]. En effet, cette source d'inoculum présente l'avantage de pouvoir être utilisée telle quelle et à température ambiante. La première section de ce chapitre introduira les biopiles microbiennes réalisées à partir de terreau de jardin. La seconde partie concernera le choix de l'anode utilisée ainsi que sa modification surfacique par du graphène. La troisième partie concernera la croissance d'un biofilm bactérien à partir de terreau de jardin sur les électrodes modifiées et non modifiées afin d'étudier l'effet de la modification sur les performances électriques obtenues. Les quatrième et cinquième parties porteront sur le développement d'une nouvelle cathode abiotique modifiée avec de la phthalocyanine de Nickel et sur les performances obtenues en biopile complète. Enfin, la dernière partie conclura sur l'ensemble des résultats obtenus dans ce chapitre.

1. Introduction

Dans le domaine des biopiles microbiennes, on retrouve principalement trois sources d'inoculum naturel étudiées : les sédiments [199], les effluents [90] et les boues de stations d'épuration [200]. D'autres sources ont également démontré leurs capacités à former des biofilms électroactifs comme les eaux de mangrove [201], mais une a particulièrement retenu notre attention : le terreau de jardin. En effet, il a été démontré que le terreau de jardin est un excellent candidat pour la formation de biofilms électroactifs à l'anode puisqu'ils sont capables d'oxyder de la matière organique en CO_2 ou, plus généralement, un composé réduit en un composé oxydé [74], [75], [202]. L'intérêt d'utiliser le terreau de jardin comme inoculum est qu'il est très simple à mettre en œuvre et qu'il ne demande pas de conditions particulières et

contraignantes. Il est possible de travailler à température ambiante et il n'est pas nécessaire de travailler en conditions stériles. L'ensemble des travaux présentés dans ce chapitre sont réalisés en batch, c'est-à-dire en milieu fermé sans renouvellement de milieu. Seule la source de carbone est ajoutée manuellement et ponctuellement au cours des expériences. Le carburant utilisé est de l'acétate qui, au cours de l'oxydation, permet de libérer 8 électrons (**Équation 24**) :

$$CH_3COO^- + 3H_2O \xrightarrow{microorganismes} CO_2 + HCO_3^- + 8H^+ + 8e^- \qquad \textbf{Équation 24}$$

Le transfert d'électrons entre les cellules microbiennes et l'électrode de travail est mesuré par un courant qui, en valeur absolue, augmente au cours du temps. Ce courant correspond ainsi au développement d'un biofilm électroactif à la surface de l'anode (**Figure 29**). L'intensité de courant enregistrée est exprimée en densité de courant, ce qui correspond à un courant par unité de surface (géométrique) de l'électrode.

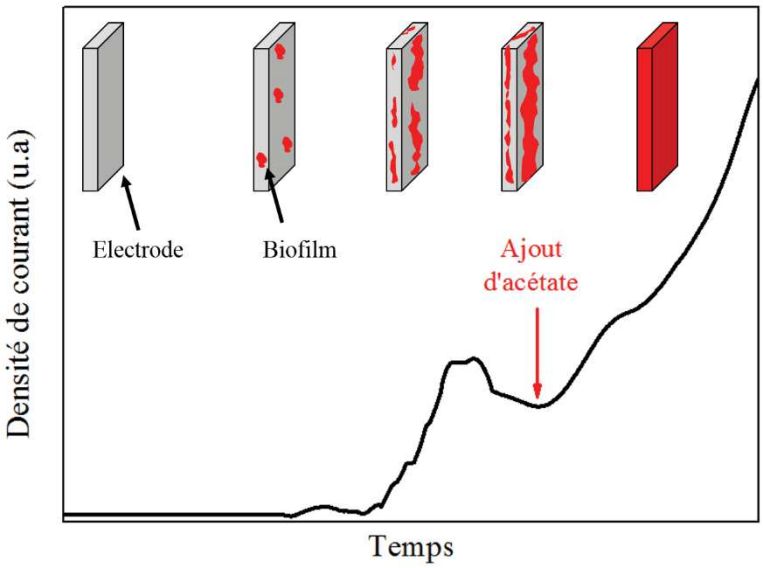


Figure 29 *: Evolution de la densité de courant en fonction du temps correspondant à la formation d'un biofilm électroactif à la surface de l'électrode* [203].

Le terreau de jardin a donc été utilisé comme inoculum pour former un biofilm électroactif et cette formation a été observée en suivant l'évolution de la densité de courant en fonction du temps.

La source des microorganismes ayant été choisie, il est donc nécessaire de sélectionner un matériau pour constituer l'anode.

2. Choix du matériau d'anode et modification

Le choix du matériau d'électrode s'est porté sur de la mousse d'acier inoxydable qui est un matériau prometteur pour une utilisation sous forme d'anode dans les biopiles microbiennes [204].

2.1. Acier inoxydable

L'acier inoxydable a été sélectionné en raison de sa biocompatibilité et de son excellente capacité à transporter les électrons. Il présente aussi l'avantage de pouvoir se trouver sous forme de mousse, ce qui permet d'augmenter sa surface spécifique en raison de sa microporosité et donc, d'augmenter la surface d'adhésion et d'échange du biofilm avec l'électrode. La mousse d'acier inoxydable (1 mm d'épaisseur, taille des pores de 50 µm, AISI 316, Good Fellow, France) est composée de fer (69 %), de chrome (18 %), de nickel (10 %) et de molybdène (3 %).

Dans le but d'améliorer les propriétés de surface de la mousse d'acier inoxydable (conductivité et surface spécifique), et donc les performances électriques, ce matériau a par la suite été modifié avec du graphène. Dans un premier temps, le graphène synthétisé (présenté dans le chapitre 2) a été caractérisé.

2.2. Caractérisation du graphène

Le graphène utilisé pour la modification de l'électrode est de l'oxyde de graphène réduit en suspension en milieu aqueux. A partir de poudre de graphite, de l'oxyde de graphène a été synthétisé selon la méthode d'Hummers modifiée dans de l'eau MilliQ [129], [130]. Il a ensuite été réduit chimiquement afin de le convertir en oxyde de graphène réduit [184]. Les différentes poudres obtenues ont été caractérisées :

- la poudre de graphite a été caractérisée par diffraction à rayons X (DRX),
- l'oxyde de graphène a été caractérisé par DRX, spectrométrie photoélectronique X (XPS) et microscopie à force atomique (AFM),
- l'oxyde de graphène réduit par DRX et XPS.

Les différentes poudres ont tout d'abord été caractérisées par DRX afin de comparer leurs structures cristallines et vérifier que la synthèse du graphène a bien été réalisée.

2.2.1. Diffraction aux rayons X

Les motifs obtenus par DRX de la poudre de graphite, du graphène oxydé et de l'oxyde de graphène réduit sont montrés en **Figure 30**.

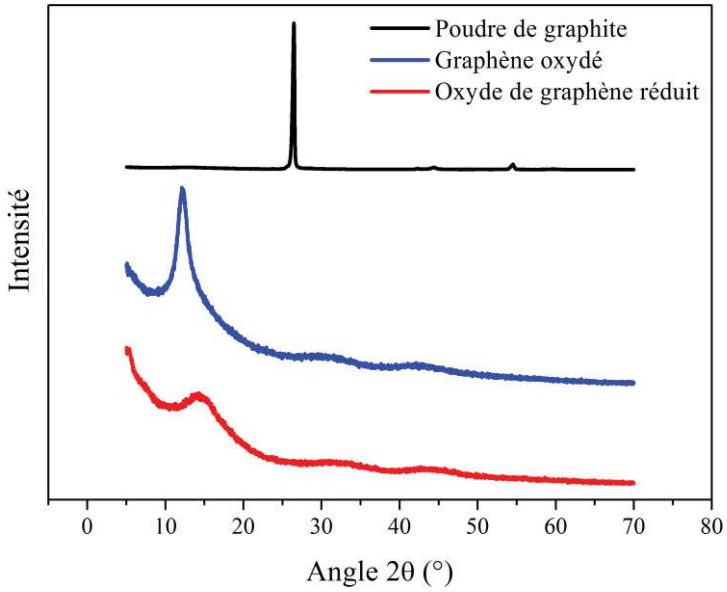


Figure 30 *: Diffraction à Rayon X de la poudre de graphite, de l'oxyde de graphène et de l'oxyde de graphène réduit.*

On peut observer un important et fin pic de diffraction (002) à 2θ = 26,5° indiquant une structure hautement ordonnée de la poudre de graphite. Dans le cas de l'oxyde de graphène, on peut constater une réflexion à approximativement 2θ = 12,5° attestant du fort degré d'oxydation de l'oxyde de graphène obtenu (001) [205]. La DRX montre aussi l'absence d'un pic à environ 26° (002) confirmant que toute la poudre de graphite a bien été convertie en oxyde de graphène. Enfin, concernant la DRX de l'oxyde de graphène réduit, on observe toujours la présence d'un petit pic caractéristique d'oxyde de graphène (001) à environ 2θ = 14°.

La réduction chimique de l'oxyde de graphène en oxyde de graphène réduit a également été analysée par XPS.

2.2.2. Spectrométrie photoélectronique X

L'oxyde de graphène a enfin été caractérisé par XPS avant et après la réduction par l'hydrazine afin de quantifier le ratio carbone/oxygène dans la suspension finale (**Figure 31**).

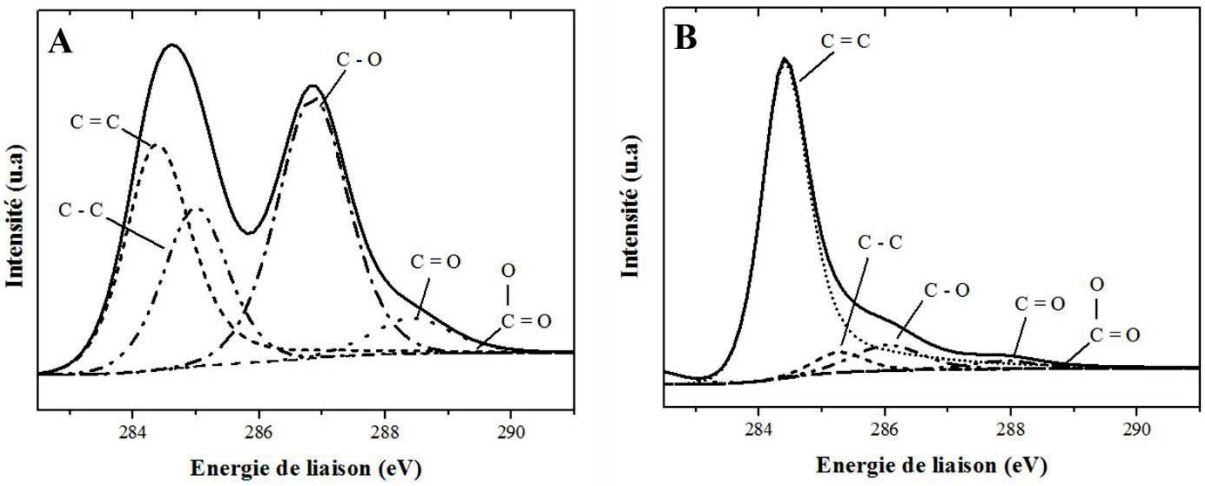


Figure 31 *: XPS de l'oxyde de graphène avant (A) et après (B) réduction chimique.*

On observe clairement une forte diminution de l'intensité du pic caractéristique de la liaison C – O (287 eV) par rapport au pic correspondant aux liaisons C = C / C – C (284,5 eV) après la réduction chimique de la suspension d'oxyde de graphène [206], [207]. Il en est de même pour les pics correspondant aux liaisons CO et COO^-. La présence d'oxygène sur les feuillets d'oxyde de graphène est à l'origine de défauts qui affectent directement la résistivité électrique du matériau [208], [209]. Le pic à 288 eV correspond au groupe C=O permettant de maintenir la suspension d'oxyde de graphène réduit de manière électrostatique et stable [184].

Enfin, l'oxyde de graphène a été observé par AFM afin de s'assurer de la présence de feuillets d'oxyde de graphène.

2.2.3. Microscopie à force atomique

Les images prises par AFM d'oxyde de graphène sont reportées sur la **Figure 32**.

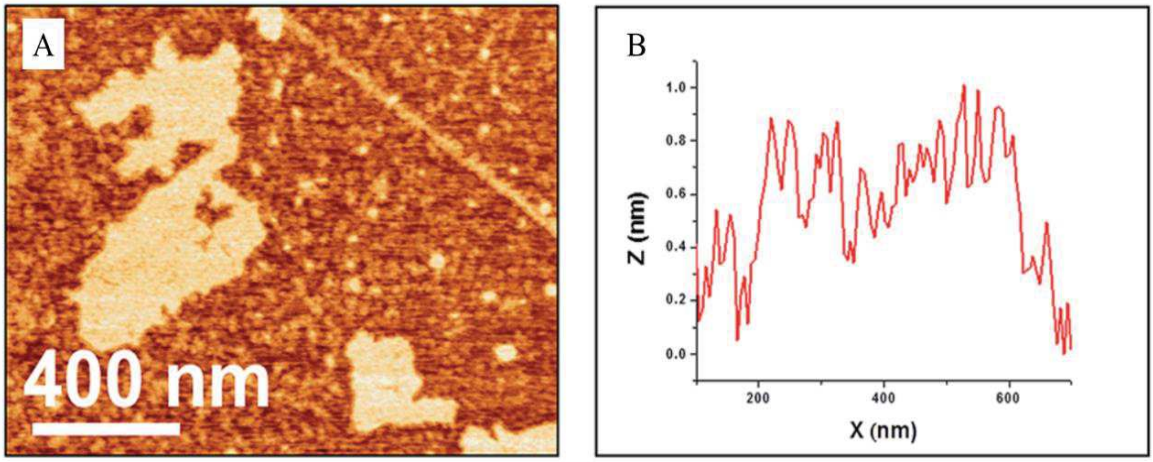


***Figure 32** : (A) Image topographique par AFM et (B) profil de l'épaisseur d'un feuillet d'oxyde de graphène.*

On peut observer sur la **Figure 32.A** la présence de feuillet d'oxyde de graphène (en jaune clair). Le profil d'épaisseur d'un feuillet est représenté en **Figure 32.B**. On peut ainsi constater que l'épaisseur d'un feuillet d'oxyde de graphène réduit est en moyenne de 0,8 nm démontrant ainsi que ce feuillet consiste bien en une monocouche d'oxyde de graphène [210], [211].

2.3. Modification de l'électrode

La mousse d'acier inoxydable (SSF) a donc été modifiée avec de l'oxyde de graphène réduit (rGO) en utilisant la méthode de dépôt couche par couche (**Figure 33**) [212]. Dans le but d'adsorber l'oxyde de graphène réduit (chargé négativement) à la surface de l'électrode (chargée négativement), il est important de former une première monocouche chargée positivement à sa surface. Une alternance de couche positive/négative permet d'avoir des liaisons électrostatiques entre les différentes couches. Le choix s'est porté sur l'utilisation d'un polyélectrolyte positif : le polyéthylèneimine (PEI) de formule brute $H(NHCH_2CH_2)_nNH_2$.

La première étape consiste à adsorber du PEI à la surface de la mousse d'acier inoxydable afin de former une première monocouche chargée positivement. L'électrode est donc immergée dans une solution de PEI pendant 15 minutes puis est rincée avec de l'eau MilliQ et est séchée par balayage d'azote. Dans le but de former la couche de rGO, le même processus est appliqué mais dans une suspension d'oxyde de graphène réduit. Le choix a été fait de réaliser 5 bicouches PEI/rGO suite aux travaux de Müller et al [213]. Le procédé a donc été répété 5 fois dans le but de réaliser 5 bicouches. L'électrode ainsi réalisée est nommée $SSF/(PEI/rGO)_5$.

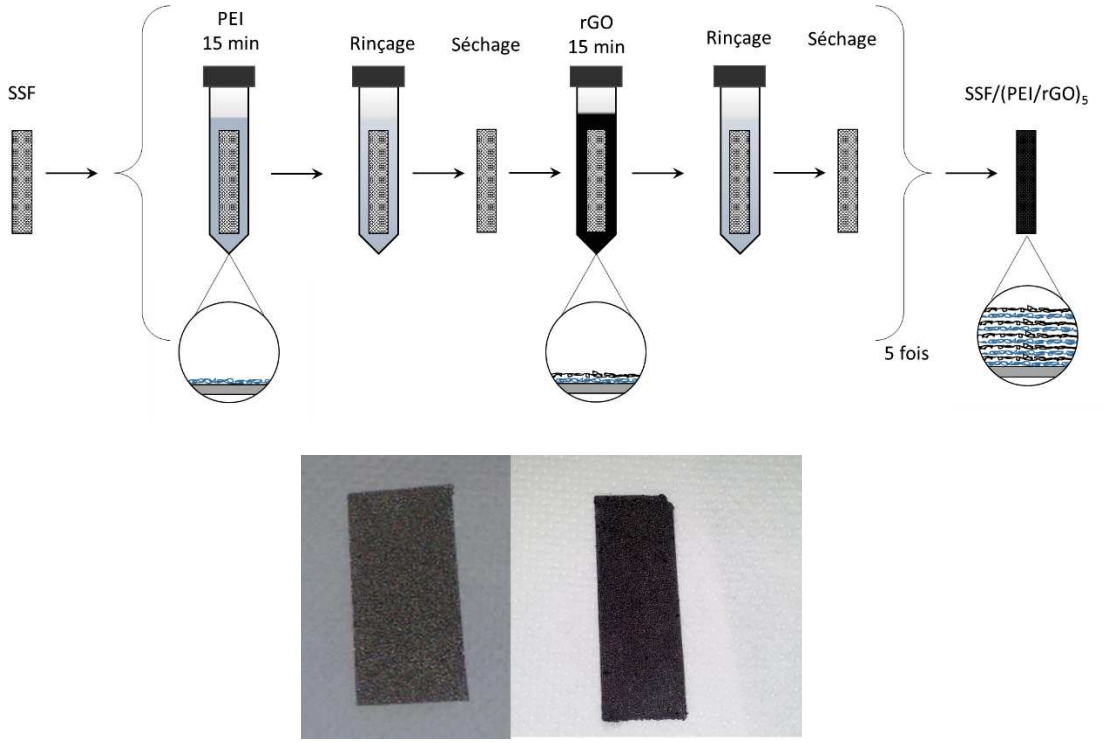


Figure 33 *: Schéma du dépôt couche par couche de l'oxyde de graphène réduit à la surface de l'électrode, photos de l'électrode avant et après modification.*

Cette électrode a été observée au microscope électronique à balayage (MEB) avant et après le dépôt de graphène (**Figure 34**).

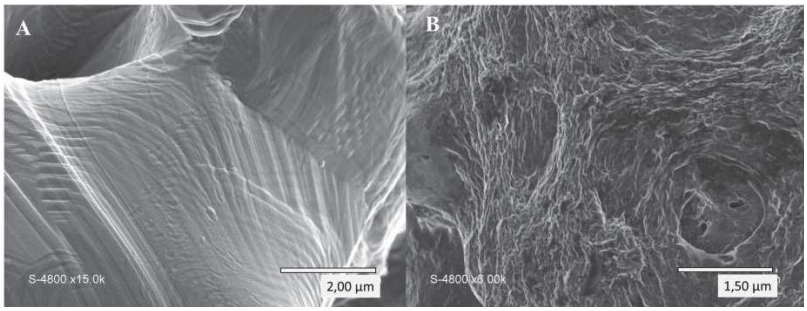


Figure 34 *: Images MEB de (A) l'électrode de mousse d'acier inoxydable non modifiée et (B) de la mousse d'acier inoxydable modifiée par l'oxyde de graphène réduit.*

On peut voir qu'avant modification, l'électrode est lisse tandis qu'après modification, la surface de l'électrode est rugueuse. Cette modification de la surface pourrait permettre ultérieurement une meilleure adhésion des bactéries à la surface de l'électrode.

3. Formation d'un biofilm électroactif à partir de terreau de jardin

La modification de surface de l'électrode ayant été réalisée, son influence sur la formation d'un biofilm électroactif, élément essentiel du fonctionnement de la biopile microbienne, et les performances liées à ce biofilm ont été étudiées.

3.1. Formation d'un biofilm sur le matériau d'électrode

Du lixiviat de terreau de jardin a été choisi comme inoculum pour la formation d'un biofilm électroactif. Ce lixiviat a été réalisé à partir de 1 L de terreau de jardin commercial (Botanic, France) mélangé avec 1 L d'une solution de chlorure de potassium à 60 mM [204]. Ce mélange a été agité pendant 48 h afin de permettre la croissance des microorganismes. Il est ensuite filtré avec un tamis (maille de 1 mm) et le filtrat récolté correspond au lixiviat de terreau. Une solution d'acétate de potassium, utilisé comme source de carbone, a été ajoutée afin d'obtenir une concentration finale de 20 mM.

Une électrode en mousse d'acier inoxydable (SSF pour « stainless steel foam ») et une électrode modifiée par du graphène (SSF/(PEI/rGO)$_5$ ont tout d'abord été placées dans du lixiviat de terreau pendant une période de 10 jours, le temps qu'un biofilm puisse se former à sa surface. Aucun potentiel ni circuit électrique n'ont été mis en place (**Figure 35**).

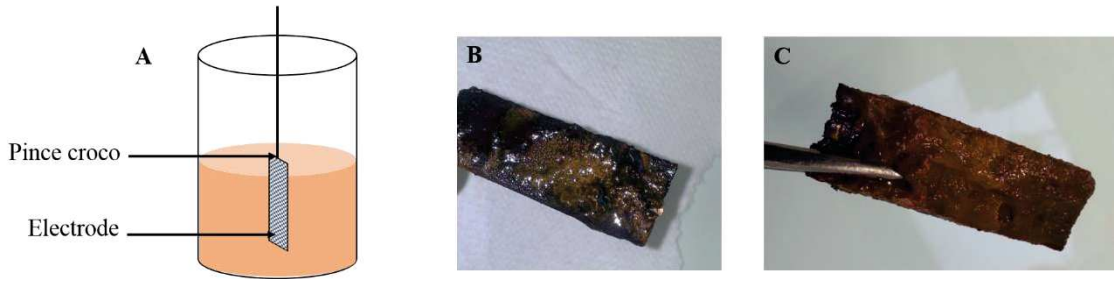


Figure 35 *: (A) Schéma du Montage et photos des électrodes laissées dans du lixiviat de terreau pendant 10 jours ; (B) SSF et (C) SSF/(PEI/rGO)$_5$.*

On peut noter que, quelle que soit la nature de l'électrode, un biofilm d'aspect visqueux s'est formé. De plus, on peut constater une couleur rougeâtre à la surface du biofilm. Ceci correspond à une légère corrosion de la pince permettant de maintenir l'électrode. L'épaisseur du biofilm n'est pas uniforme sur toute la surface de l'électrode.

Ces électrodes ont ensuite été testées par chronoampérométrie à un potentiel de -0,246 V vs Ag/AgCl [204] dans un système à trois électrodes afin d'évaluer l'électroactivité du biofilm

formé à leur surface (**Figure 36**) [204]. La chronoampérométrie est réalisée dans le même milieu, le lixiviat de terreau. De l'acétate (20 mM) a été rajouté, en début d'expérience, comme source de carbone pour la production d'électricité. Le but ici est de savoir si le biofilm formé sur les électrodes est immédiatement électroactif. Dans le cas d'un biofilm électroactif, un courant issu de l'oxydation de l'acétate par le biofilm est attendu.

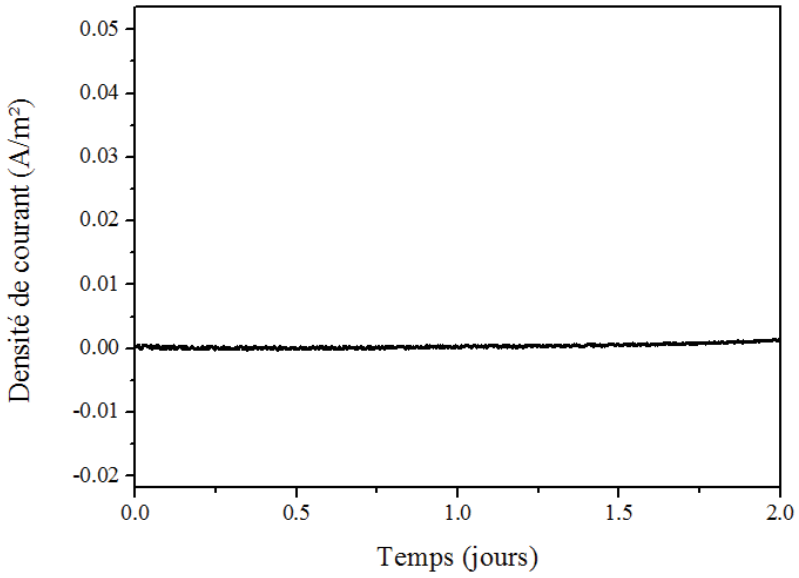


Figure 36 : *Evolution de la densité de courant des électrodes SSF et SSF/(PEI/rGO)$_5$ avec un biofilm de 10 jours par chronoampérométrie à un potentiel de -0,246 V vs AG/AgCl.*

A partir de la **Figure 36**, on peut constater que pour les deux électrodes aucun courant significatif n'est détecté démontrant ainsi qu'il n'y a aucun transfert d'électrons entre le biofilm et la surface de l'électrode. Le biofilm ainsi formé à la surface de l'électrode n'est donc pas électroactif.

L'obtention d'un biofilm électroactif nécessite donc une activation électrochimique. Il a été démontré que sous polarisation de l'anode, c'est-à-dire qu'un potentiel est appliqué au niveau de l'anode, le biofilm formé est électroactif [82]. Il est également possible de réaliser une polarisation retardée, c'est-à-dire qu'un potentiel est appliqué sur un biofilm déjà formé et non électroactif, afin de rendre ce biofilm électroactif comme il en est référé dans les travaux de D. Pocaznoi [82].

3.2. Influence de la polarisation sur la formation d'un biofilm électroactif

Un potentiel est donc appliqué à l'électrode de travail en début d'expérience et le courant produit est enregistré en fonction du temps. Le suivi chronoampérométrique est réalisé grâce à un système à trois électrodes avec : une électrode de référence (Ag/AgCl), une contre électrode (un bloc de graphite) et une électrode de travail (mousse d'acier inoxydable soit non modifiée SSF, soit modifiée SSF/(PEI/rGO)$_5$). La chronoampérométrie est réalisée à l'aide d'un potentiostat (SP 50 Biologic, France). L'ensemble des électrodes est immergé dans le lixiviat de terreau contenant du KCl (60 mM) (permettant de maintenir une conductivité ionique) et de l'acétate (20 mM).

Dans le but d'étudier l'influence du graphène sur la production d'électricité, deux cellules électrochimiques ont été utilisées en parallèle avec un lixiviat de terreau issu de la même préparation et dans les conditions décrites précédemment. Une cellule a permis de tester l'électrode non modifiée SSF, et la seconde a été utilisée pour tester l'électrode modifiée par le graphène SSF/(PEI/rGO)$_5$.

Ces deux électrodes (SSF et SSF/(PEI/rGO)$_5$) ont dans un premier temps été polarisées dans une solution témoin de KCl (60 mM) et d'acétate (20 mM) sans microorganismes à -0,246 V (vs Ag/AgCl) comme décrit par Pocaznoi et al [204] (**Figure 37**). Il s'agit d'obtenir une expérience témoin en absence de biofilm.

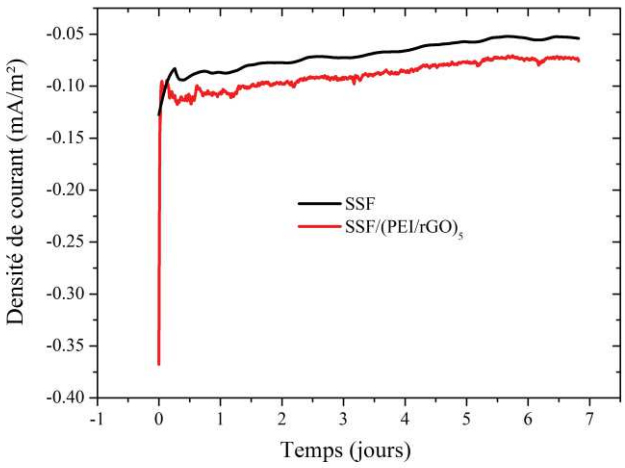


***Figure 37** : Polarisation à -0,246 V (vs Ag/AgCl) des électrodes dans une solution de 60 mM de KCl et 20 mM d'acétate sans microorganismes.*

On peut constater que pour les deux électrodes le courant observé est négatif. Ces densités de courant sont donc liées à un courant de réduction. La densité de courant de l'électrode SSF/(PEI/rGO)$_5$ est légèrement supérieure (-0,11 mA/m²) à celle de l'électrode SSF (-0,09 mA/m²). Après 7 jours de test, les densités de courant des deux électrodes ont diminué jusqu'à à -0,07 mA/m² pour l'électrode SSF/(PEI/rGO)$_5$ et à -0,05 mA/m² pour l'électrode SSF. Il est possible que ce courant soit lié à la réduction de l'oxygène dissous en solution. Néanmoins, aucun courant d'oxydation n'est observé dans les deux cas lorsqu'il n'y aucun microorganisme présent. La modification surfacique de l'électrode n'entraîne pas d'évolution particulière du courant témoin observé en absence de microorganismes.

Les électrodes ont ensuite été polarisées à -0,246 V (vs Ag/AgCl) [204] dans le lixiviat de terreau. L'évolution de la densité de courant est présentée en **Figure 38**.

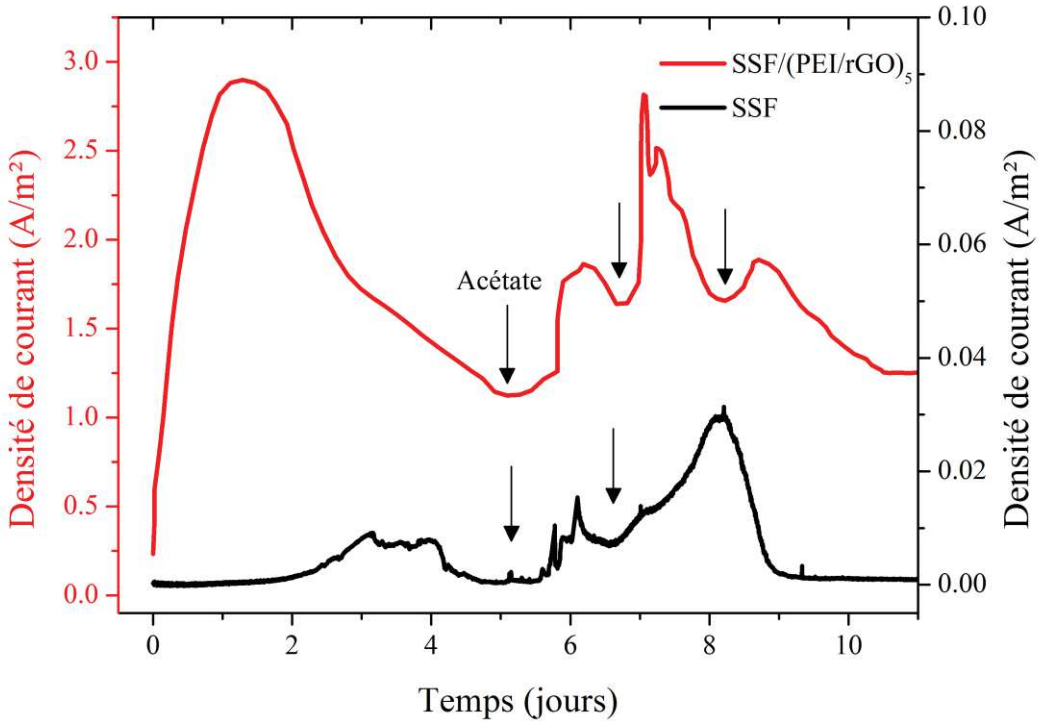


Figure 38 *: Evolution de la densité de courant à un potentiel de -0,246 V (vs Ag/AgCl) au cours du temps pour les électrodes SSF (courbe noire) et SSF/(PEI/rGO)$_5$ (courbe rouge).*

Pour les deux électrodes, les densités de courant sont positives et un comportement similaire est observé au cours du temps : un courant d'oxydation est mesuré témoignant de la formation d'un biofilm électroactif ; il atteint une valeur maximale puis diminue. Cette diminution peut être attribuée à une perte de viabilité du biofilm, une inhibition ou une

limitation des substrats de croissance. L'addition d'acétate (20 mM) dans les deux cas conduit à une reprise immédiate de l'activité électrique, ce qui révèle notamment une limitation par un substrat et confirme que l'acétate est la principale source d'énergie.

Par contre les densités de courant et leur évolution sont très différentes selon la nature de l'électrode. Une électroactivité métabolique liée à un dépôt de cellules est observée dès la première heure de fonctionnement pour l'électrode SSF/$(PEI/rGO)_5$ contre 36 h pour l'électrode SSF. De plus, la densité de courant de l'électrode modifiée atteint une valeur de 2,9 A/m² après un jour et demi contre seulement $9{,}1 \times 10^{-3}$ A/m² après 3 jours pour l'électrode SSF. Il est également intéressant de noter que pour l'électrode SSF/$(PEI/rGO)_5$, les ajouts successifs d'acétate même s'ils se traduisent par une augmentation de courant, ne permettent pas d'atteindre à nouveau la valeur maximale initiale. Pour l'électrode non modifiée, une valeur de plus en plus grande est mesurée après chaque ajout mais cette valeur reste très faible ($29{,}7 \times 10^{-3}$ A/m² après 8,2 jours). Les rendements faradiques ont été également été calculés pour les deux électrodes en considérant que l'acétate avait été entièrement consommé. Dans le cas de l'électrode non modifiée, les rendements faradiques sont compris entre 0,12 et 0,41 % au cours du temps. Pour l'électrode modifiée par du graphène, ces rendements varient entre 30,9 % et 46,3 % en fonction des ajouts d'acétate. Néanmoins, lors de la première phase de croissance du biofilm (de 0 à 5,5 jours), le rendement est de 90,3 %. Ces résultats indiquent donc une meilleure conversion en électricité, issue de la dégradation de l'acétate, avec l'électrode modifiée même si ces rendements restent faibles, et plus particulièrement pour l'électrode non modifiée.

Même si ces expériences ont été répétées et que le comportement électrique était le même, il reste difficile d'interpréter ces différences de réponse aux ajouts d'acétate pour les deux sortes d'électrodes. En effet, les propriétés de surface des électrodes tendent à sélectionner une flore microbienne caractérisée par un état physiologique et des besoins nutritionnels différents [214]–[216]. Un ajout continu de substrat pourrait peut-être limiter ces fluctuations et stabiliser l'activité du biofilm.

Néanmoins ces résultats révèlent clairement que la modification de l'électrode par de l'oxyde de graphène réduit permet de capter plus facilement les électrons puisque la biopile est rapidement fonctionnelle et ses performances sont augmentées de l'ordre de 90 fois.

Ces deux électrodes ont, par la suite, été caractérisées par voltammétrie cyclique afin d'étudier la catalyse d'espèces redox par le biofilm et par microscopie électronique à balayage afin d'observer la morphologie du biofilm.

3.3. Voltammétrie cyclique et MEB

L'électrode non modifiée et l'électrode modifiée ont toutes les deux été caractérisées avant et après formation du biofilm par voltammétrie cyclique dans un système à trois électrodes. Ainsi, il est possible de comparer la catalyse d'espèces redox en présence et en absence de biofilm, et donc d'attribuer cette catalyse au biofilm. Les voltammétries cycliques sont réalisées dans une solution d'acétate (20 mM) et de chlorure de potassium KCl (60 mM) au début et à la fin de l'expérience afin de déterminer l'électroactivité du biofilm, à une vitesse de balayage de 20 mV/s et entre -1 et +0,6 V pour les électrodes sans biofilms et entre -1 et +1 V en présence de biofilm (**Figure 39**). En réalisant ces VC dans le même milieu dépourvu de lixiviat de terreau, il est possible de s'affranchir des réactions parasites pouvant être attribuées aux microorganismes en suspensions et qui dégradent l'acétate.

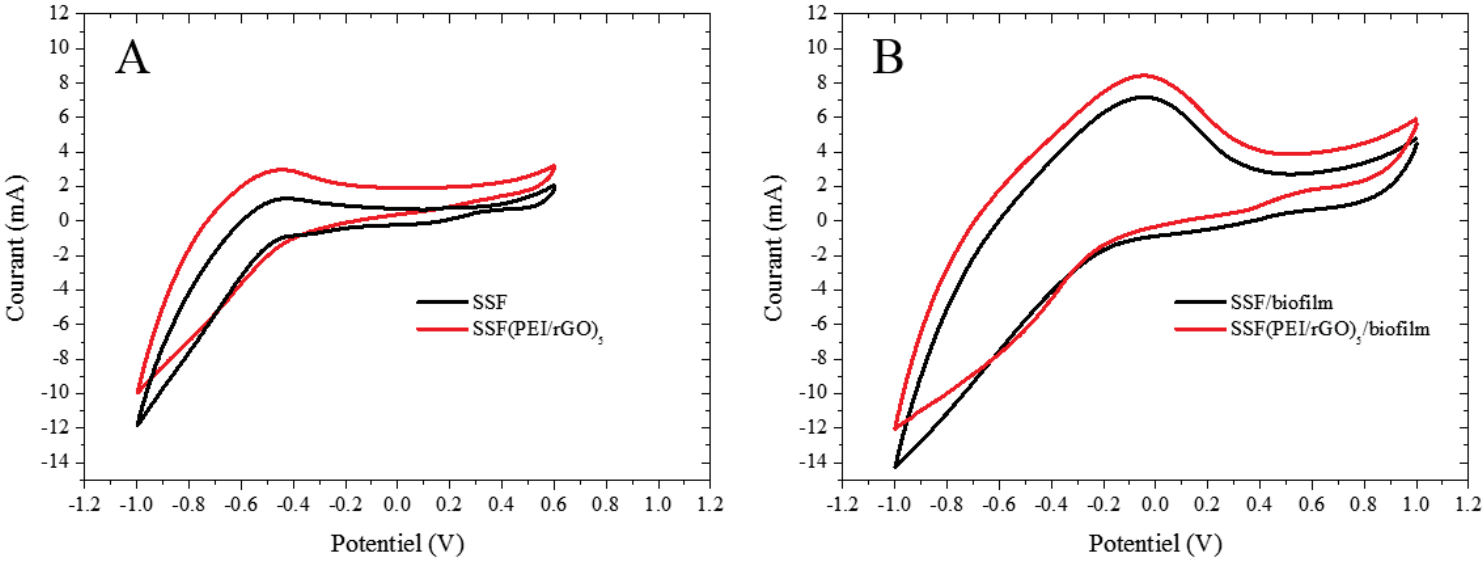


***Figure 39** : Voltammétries cycliques des électrodes sans biofilm (A) et avec biofilm (B) à 20 mV/s vs Ag/AgCl dans une solution d'acétate (20 mM) et de chlorure de potassium KCl (60 mM).*

Un balayage sur l'ensemble des potentiels positifs et négatifs permet de déterminer l'effet catalytique du biofilm. La **Figure 39.A** représente les voltammétries cycliques des électrodes modifiées et non modifiée en absence de biofilm. On peut observer que le comportement est le même pour les deux électrodes avec un seul pic d'oxydation observé à -0,456 V. Néanmoins, la hauteur du pic est plus importante pour l'électrode modifiée avec du graphène puisqu'il est de 1,17 mA contre 0,63 mA lorsque l'électrode n'est pas modifiée. Ceci indique donc une influence du graphène pour la catalyse de l'oxydation.

La **Figure 39.B** correspond aux voltammétries cyclique réalisées en présence d'un biofilm de 11 jours. Les électrodes ont été placées, directement après la fin de la chronoampérométrie, dans un compartiment contenant uniquement une solution de KCl (60 mM) et d'acétate (20 mM). On peut voir que le comportement est similaire au résultat précédent avec la présence d'un seul pic d'oxydation à -0,05 V. Toutefois, le pic d'oxydation est plus important pour les deux électrodes en présence d'un biofilm, vieux de 11 jours, avec des hauteurs de pic de 5,6 mA et 4,4 mA pour les électrodes SSF/$(PEI/rGO)_5$ et SSF respectivement. Comme vu précédemment, le graphène permet également d'augmenter le courant obtenu. Néanmoins, il n'y a que très peu de différence dans les courant obtenus entre l'électrode modifiée et celle non modifiée contrairement aux observations faites précédemment lors de la chronoampérométrie. Ceci peut être expliqué par une étape cinétiquement limitante différente dans le transfert d'électron entre les deux techniques testées [217], [218]. La vitesse de balayage imposée en VC ne permet pas d'obtenir un état quasi-stationnaire [219]. Il est également difficile de conclure sur les espèces impliquées dans la réaction d'oxydation en raison de l'utilisation d'un inoculum complexe, le terreau. En effet, il est possible qu'en plus d'oxyder l'acétate, des espèces redox ont pu être sécrétées par les microorganismes sous forme de médiateur endogènes.

A la fin des expériences, les deux électrodes ont été caractérisées par MEB (**Figure 40**). Pour cela, des morceaux de chaque anode ont été découpés et immergés dans une solution de glutaraldéhyde afin de fixer le biofilm, puis déshydratés par des bains successifs dans des solutions aqueuses d'éthanol à concentrations croissantes comme indiqué dans le chapitre 2 [188].

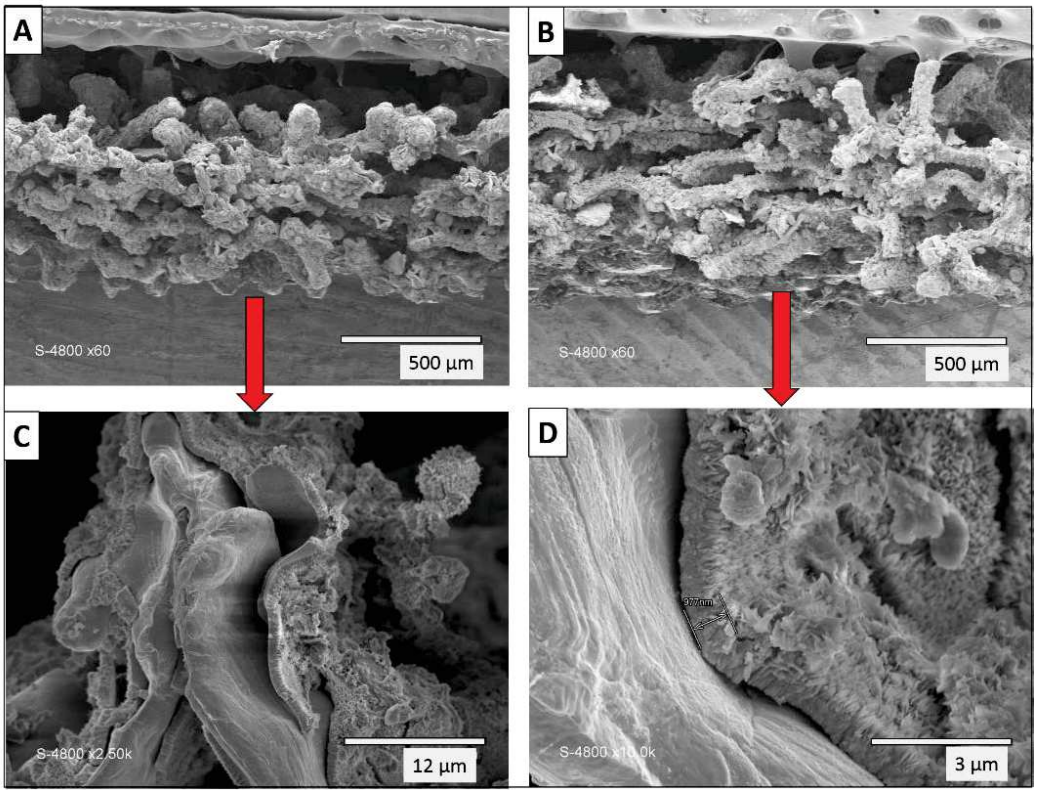


Figure 40 *: Images MEB des électrodes avec biofilm (coupes transversales) : SSF à des grandissements x60 (A) et x2500 (C) et SSF/(PEI/rGO)5) à des grandissements x60 (B) et x10000 (D).*

Pour les deux types d'anode (**Figure 40.A-B**), on peut constater que le biofilm est dense et qu'il recouvre totalement la surface de l'électrode. Des grandissements ont été réalisés sur la coupe transversale des électrodes (**Figure 40.C-D**) afin de voir l'influence potentielle du graphène sur la morphologie du biofilm. Cependant, pour les deux électrodes, l'épaisseur du biofilm est du même ordre de grandeur (985 nm pour l'électrode SSF et 977 nm pour l'électrode SSF/(PEI/rGO)$_5$). Ceci tend à montrer que le graphène n'a pas d'influence sur la croissance du biofilm en termes d'épaisseur et de morphologie générale.

La polarisation a ensuite été arrêtée afin de placer le montage en circuit fermé sur résistance externe en gardant les mêmes conditions expérimentales.

3.4. Circuit fermé sur résistance externe

Afin de déterminer la stabilité des bioanodes ainsi que les densités de puissance surfaciques, une étude de leur fonctionnement sur résistance externe a été réalisée. Après

polarisation à -0,246 V (vs Ag/AgCl), les électrodes (anode et cathode) sont connectées à un circuit électrique comportant une résistance externe de 1 kΩ [220] (**Figure 41**).

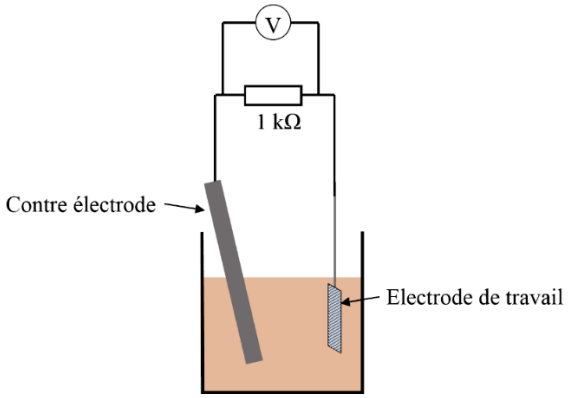


Figure 41 *: Schéma du montage pour étudier la stabilité de l'électrode avec le biofilm.*

La tension a été mesurée pendant une période de 55 jours. L'origine correspond au temps de fin de polarisation des électrodes, à savoir t = 11 jours. Pour des raisons pratiques, nous avons choisi de mesurer la tension aux bornes des électrodes. Connaissant U et R, il est possible de calculer I à partir de la loi d'Ohm (**Équation 25**) :

$$U = R * I \qquad \textbf{Équation 25}$$

Avec

U la tension exprimée en [V],

R la résistance en [Ω],

I le courant en [A].

L'évolution de la densité de courant est reportée en **Figure 42**.

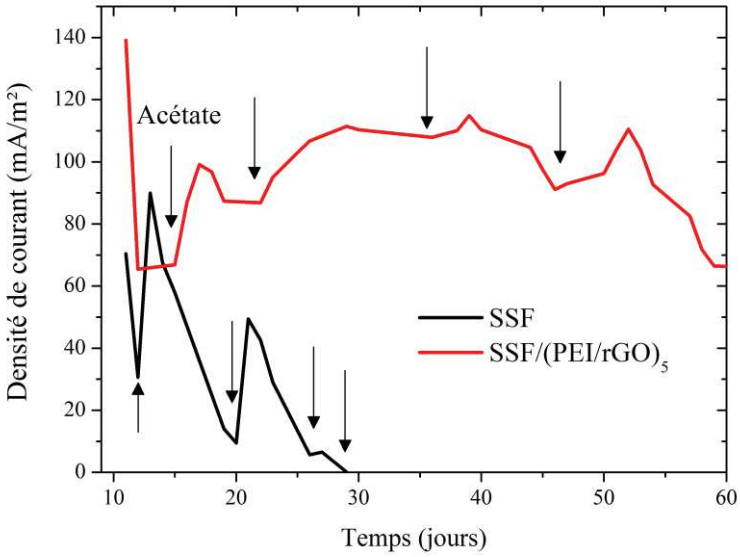


Figure 42 *: Evolution de la densité de courant au cours du temps des bioanodes connectées à une résistance externe de 1 kΩ.*

Lors de la première journée, une forte diminution du courant est observée, aussi bien pour l'électrode SSF que pour l'électrode SSF/(PEI/rGO)5. Afin de palier une limitation en source de carbone et d'énergie, de l'acétate est ajouté dans les deux systèmes. Cet ajout se traduit par une augmentation immédiate de la densité de courant pour l'électrode non modifiée, jusqu'à une valeur de 89,9 mA/m². Cependant cette valeur ne se maintient pas. Les ajouts successifs d'acétate ne permettent même pas de stabiliser la densité de courant qui s'amortit progressivement pour atteindre une valeur nulle après 30 jours de fonctionnement. Le manque d'apport en source de carbone n'est donc pas la seule raison de cette perte d'électroactivité. Une perte de viabilité due à une limitation nutritionnelle ou un phénomène d'inhibition, ou un décrochage du biofilm pourraient expliquer cette absence de courant.

Dans le cas de l'électrode SSF/(PEI/rGO)5, le premier ajout d'acétate permet dans un premier temps de stopper la diminution de densité de courant puis dans un deuxième temps d'atteindre une valeur de 99,1 mA/m². Par la suite, le courant diminue légèrement pour se stabiliser à 86,8 mA/m². Le deuxième ajout d'acétate permet au système de se maintenir à une valeur moyenne de 110 mA/m² durant une quinzaine de jours. L'ajout suivant d'acétate est moins efficace mais le système reste relativement stable avec une densité de courant comprise entre 90 et 100 mA/m². Il faut attendre 55 jours de fonctionnement pour observer une chute de la densité de courant, progressive et indépendante de l'ajout d'acétate.

Le rendement faradique calculé (toujours en considérant une consommation totale de l'acétate) pour l'électrode non modifiée est de 1,8 % contre 13,9 % pour l'électrode modifiée. Ces résultats indiquent donc qu'il y a de fortes pertes d'électrons au cours de la réaction d'oxydation et que tous les électrons ne sont donc pas captés par l'anode.

Comme pour les courbes obtenues par chronoampérométrie, les performances obtenues avec l'électrode modifiée sont supérieures à celles obtenues avec l'électrode non modifiée. On peut constater que la densité de courant moyenne de l'électrode SSF/(PEI/rGO)5 est de l'ordre de 100-110 mA/m² (sur presque 40 jours de fonctionnement) alors que la densité de courant de 90 mA/m², obtenue avec l'électrode SSF, n'est qu'une valeur ponctuelle. Ce résultat indique que l'électroactivité résulte de différents phénomènes cinétiques et que le courant doit être maintenu par le métabolisme cellulaire. De plus, l'électrode SSF ne délivre plus de courant après 20 jours de fonctionnement avec une résistance externe tandis que l'électrode modifiée est capable de délivrer du courant pendant plus de 50 jours.

3.5. Discussion

Ces premiers résultats permettent de montrer l'intérêt réel de modifier la surface d'une anode par le graphène. Cette modification permet d'améliorer le transfert des électrons du biofilm vers l'électrode en termes de densité de courant et de stabilité du moins durant une cinquantaine de jours. Par contre le consortium microbien du lixiviat de terreau ne permet pas de standardiser le type de biofilm formé. Plusieurs espèces électroactives sont présentes dans le milieu, et des facteurs extérieurs, comme la température, peuvent interférer sur la croissance du biofilm. De plus, le fait de travailler dans des conditions non stériles peut favoriser diverses contaminations dont l'impact sur l'activité du biofilm est inconnu. Aussi pour poursuivre l'étude de ce type d'anode et en particulier sa stabilité à long terme, une biopile fonctionnant dans des conditions expérimentales standardisées serait plus appropriée.

La comparaison de nos résultats avec ceux publiés, notamment les travaux de D. Pocaznoi [204] au LGC (Laboratoire de Génie Chimique) de Toulouse, montre que les valeurs de densité de courant obtenues, que ce soit avec l'électrode en mousse d'acier inoxydable non modifiée ou avec l'électrode en mousse d'acier inoxydable modifiée avec du graphène, sont très inférieures aux valeurs attendues. En effet, dans des conditions opératoires similaires (lixiviat de terreau de jardin mélangé avec 60 mM de KCl et 20 mM d'acétate, polarisation à -0,2 V vs ECS), la densité de courant obtenue pour de l'acier inoxydable est de 20,6 A/m² tandis que dans

le cas de l'électrode en mousse d'acier inoxydable, la densité de courant maximale obtenue est de 0,03 A/m², soit une valeur 700 fois plus faible. Cette différence, peut s'expliquer de différentes façons. La première explication vient du terreau lui-même. Il a été démontré que tous les terreaux n'avaient pas la même capacité à former des biofilms électroactifs. En effet, en fonction de leur origine, les terreaux sont constitués d'une flore endogène différente. Durant les travaux de thèse de D. Pocaznoi, 4 terreaux de marques différentes ont été testés (**Tableau 9**).

Composition	Caractéristiques	
Terreau A (marque Tonusol)		
Fumier	Matière organique	25%
	Azote total (N)	1,1%
	Phosphore (P_2O_5)	1,0%
	Potasse (K_2O)	0,9%
	Calcium (CaO)	1,3%
	Magnésium (MgO)	1,0%
	Oligo-élements (fer, cuivre, manganèse, zinc, bore)	
	pH=7	
Terreau B (marque Or-Brun)		
Fumier de volailles Fumier de cheval Algues marines des côtes Vendéennes	Matière sèche en % de masse sur produit brut	47%
	Matière organique en % de masse sur produit brut	28%
	Azote (N) total en % de masse sur produit brut	1,3%
	Azote (N) organique non-uréique sur produit brut	11%
	Anhydride phosphorique (P_2O_5) total	1,3%
	Oxyde de potassium (K_2O) total	1,4%
	Oxyde de magnésium (MgO)	0,5%
Terreau C (marque Eco-Terre)		
Tourbe blonde Ecorces compostées Lombricompost Compost végétal	Matière sèche	55%
	Matière organique sèche	50%
	Eléments azotés	
	Eléments phosphatés	
	Eléments potassiques	
	Eléments magnésiques	
	Oligo-éléments	
	pH=7,5	
	Conductivité 0,9 mS/cm	
	Capacité de rétention d'eau	625 mL de substrat
Terreau D (marque Or-Brun)		
Fumier de bovin	Matière sèche en % de masse sur produit brut	44%
	Matière organique en % de masse sur produit brut	26%
	Azote (N) total en % de masse sur produit brut	0,65%
	Azote (N) organique non-uréique en % sur produit brut	0,6%
	Rapport C/N total	20%

Terreau Universel – Botanic (ce travail)		
Composition	**Caractéristiques**	
Tourbe noire et blonde Ecorces compostées Compost Végétal	Support de culture NFU 44-551	
	Matière sèche	30%
	Matière organique	60%
	Capacité de rétention d'eau	680 mL/L
	Conductivité	0.5 mS/cm
	pH	6.5

Tableau 9 *: Composition et caractéristiques des différents terreaux utilisés dans la thèse de D. Pocaznoi* [82] *et du terreau utilisé pour notre étude.*

On peut constater que chaque terreau possède ses propres caractéristiques en matières sèches et matières organiques. Il est aussi très difficile de comparer la composition de ces terreaux puisque que l'on ne possède pas les mêmes informations en termes d'apport de macroéléments assimilables comme l'azote, le carbone, le phosphore, le potassium… et oligoéléments.

Il a été observé pour l'un des terreaux un courant de réduction. Concernant les trois autres types de terreau, les valeurs de densités de courant maximales sont les suivantes : 1,2 A/m², 6 A/m² et 9 A/m² (**Figure 43**).

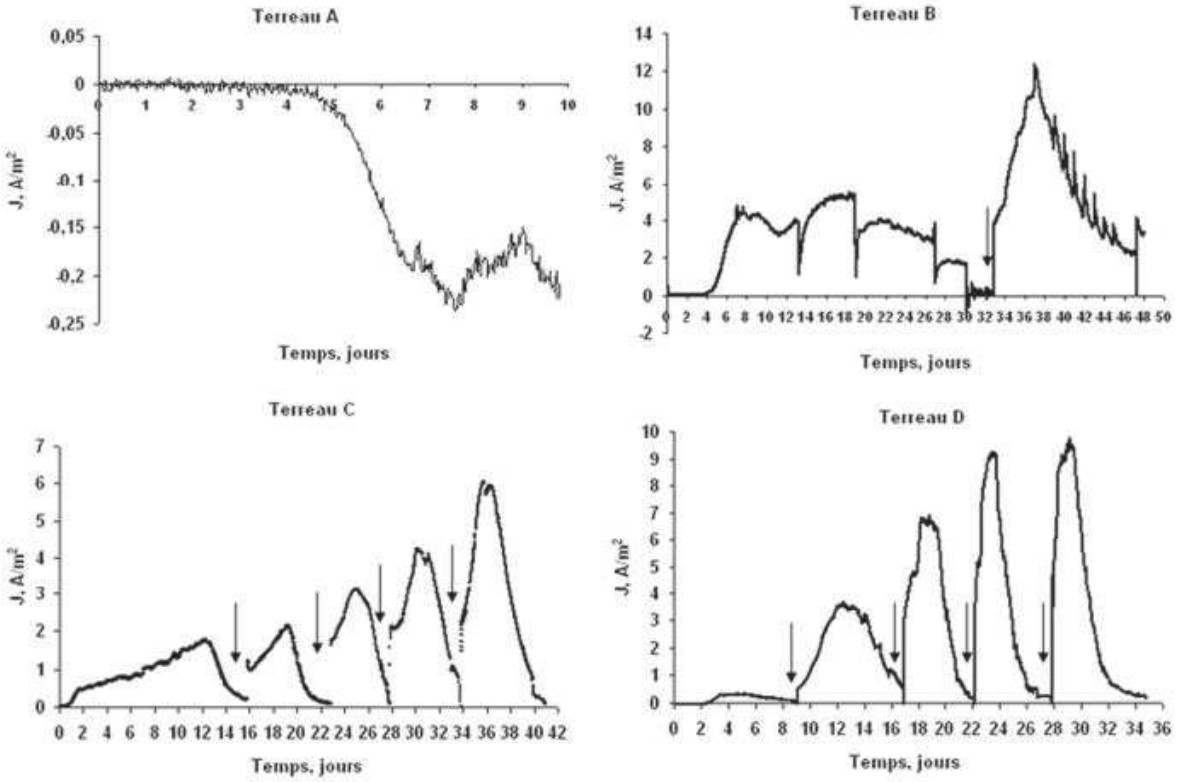


Figure 43 *: Chronoampérométries à -0,2 V vs ECS avec quatre types de terreaux différents issus de la thèse de D. Pocaznoi* [82].

On peut aussi constater que dans les mêmes conditions, le temps de formation du biofilm électroactif n'est pas le même. Il varie de quelques heures (Terreau C) à quelques jours (Terreau D). Ces différences entre les terreaux rendent difficile une comparaison entre le terreau utilisé dans notre cas et le terreau utilisé au LGC de Toulouse.

Il en est de même pour l'utilisation de la cathode. Le système utilisé n'ayant pas de membrane de séparation et fonctionnant sur des temps longs, il y a nécessairement mélange des produits d'oxydation et de réduction qui peuvent alors interférer sur les courants observés. Bien

que l'étude électrochimique d'une électrode ne soit généralement pas influencée par la contre électrode (si celle-ci a une surface plus grande que l'électrode de travail), les conditions de mesure sur des temps longs dans notre cas peuvent entrainer une interférence. Nous avons choisi le graphite comme contre électrode, alors qu'une grille de platine avait été utilisée dans les travaux cités.

Même si la comparaison de nos résultats reste difficile, il apparaît néanmoins clairement l'effet positif de la modification de l'anode par le graphène sur les performances de la biopile.

Le but est désormais d'utiliser cette électrode dans un montage complet de biopile microbienne puisque, comme nous avons pu le constater en comparant nos résultats avec la littérature, l'effet de la nature de l'électrode cathodique est important. Dans l'objectif d'éviter le platine comme matériau d'électrode, nous avons cherché d'autres types de matériaux capables de réduire efficacement l'oxygène. Une collaboration, avec l'Université d'Angers et le laboratoire GEPEA (GEnie des Procédés Environnement-Agroalimentaire), a été initiée pour l'utilisation d'une cathode en carbone modifiée par une phthalocyanine de Nickel (NiTSPc).

4. Elaboration de la cathode

La catalyse par des complexes organométalliques est assurée par le dépôt du complexe sur l'électrode. Dans le cas des phthalocyanines, le dépôt électrochimique s'avère être un moyen rapide et efficace pour fixer le catalyseur.

4.1. Modification du feutre de carbone

Le feutre de carbone a tout d'abord été prétraité électrochimiquement dans les conditions suivantes : 10 cycles de voltammétrie cyclique à une vitesse de balayage de 0,1 V/s entre 0,0 et 1,2 V vs SCE dans une solution de NaOH à 0,1 M. Le prétraitement du feutre de carbone est essentiel afin d'obtenir une bonne reproductibilité du dépôt de NiTSPc à la surface de l'électrode. Il permet d'une part d'éliminer les impuretés présentes sur le feutre de carbone (dues aux résidus de fabrication), et d'autre part, il permet de préparer la surface de carbone au dépôt de poly-NiTSPc (greffage d'oxygène à sa surface), ce qui est primordial pour la réalisation de pont O–Ni–O. Le dépôt électrochimique de poly-NiTSPc a été effectué dans une solution aqueuse de 0,1 M de NaOH et 2 mM de NiTSPc par voltammétrie cyclique. Des

balayages de potentiels ont été répétés entre 20 et 140 fois et dans une gamme de potentiel comprise entre 0,0 et 1,2 V vs SCE (vitesse de balayage de 0,1 V/s) dans le but d'optimiser les propriétés de catalyse du dépôt de poly-NiTSPc.

4.2. Voltammétrie cyclique du poly-NiTSPc : élaboration d'une nouvelle cathode pour la réduction de l'O_2

Le dépôt du film de poly-NiTSPc sur le feutre de carbone prétraité par voltammétrie cyclique est montré en **Figure 44.A**. La voltammétrie cyclique de l'électrode modifiée montre les pics caractéristiques d'oxydoréduction de poly-NiTSPc à 0,2 et 0,75 V vs ECS (**Figure 44.B**), prouvant ainsi la présence du dépôt sur la surface d u feutre de carbone.

Le taux de recouvrement apparent du dépôt à la surface de l'électrode par le NiTSPc (voir **Équation 26**) peut être calculé à partir de la courbe de voltammétrie cyclique du film après le transfert du film et rinçage, dans une solution alcaline ne contenant aucun monomère. Le calcul est basé sur la charge sous le pic d'oxydation observé à 0,75 V vs SCE en utilisant la loi de Faraday (**Équation 26**) :

$$\Gamma = \frac{Q}{nFA} \qquad \textbf{Équation 26}$$

Avec

Γ le taux de recouvrement apparent en [mol/cm²]

Q la quantité de charge en [C] calculée à partir du pic d'oxydation

A la surface de l'électrode en [cm²]

F la constate de Faraday ≈ 96 500 C/mol

n le nombre d'électrons échangés.

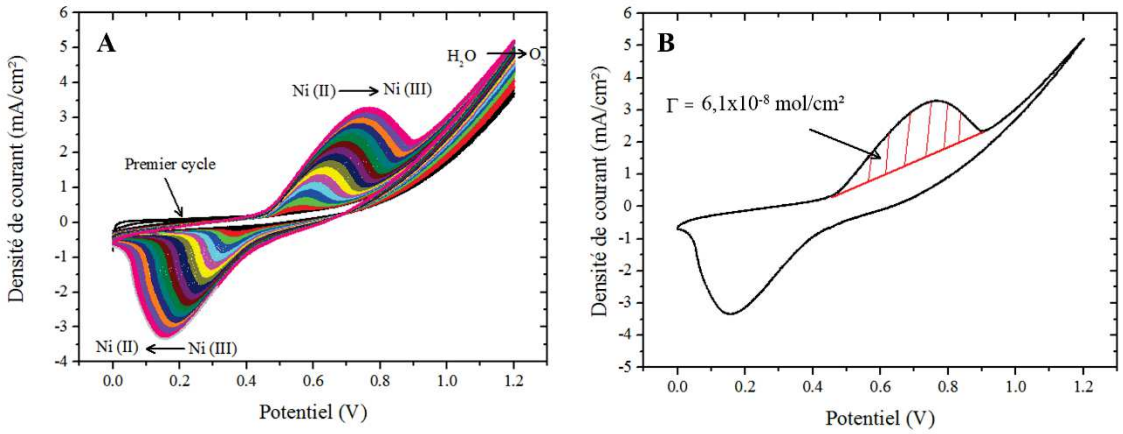


Figure 44 : *Voltammétrie cyclique (0,1 V/s) du (A) feutre de carbone dans 0,1 M NaOH et 2 mM de NiTSPc (70 cycles) et (B) du feutre de carbone/poly-NiTSPc dans 0,1 M de NaOH (1 cycle).*

La réaction de réduction de l'oxygène a ensuite été caractérisée par voltammétrie linéaire dans une solution saturée en oxygène (0,1 M en nitrate de potassium KNO_3) afin de valider le gain en performance de l'électrode modifée par rapport à l'électrode non modifiée (**Figure 45**).

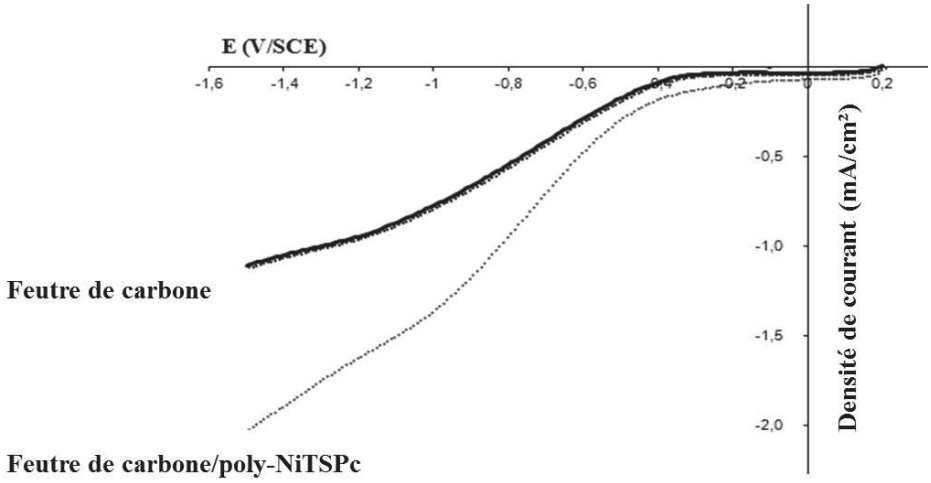


Figure 45 *: Courbe courant-potentiel (à 0,1 V/s) des deux électrodes en feutre de carbone dans 0,1 M de KNO_3 en solution saturée en O_2 (bullage d'O_2).*

La **Figure 45** montre l'évolution de l'intensité en fonction du potentiel de réduction imposé dans une solution saturée en O_2.

On peut observer, après électrodéposition du poly-NiTSPc, une amélioration de la réaction de réduction de l'oxygène à -0,8 V vs ECS puisque la densité de courant est d'environ -0,5 mA/cm² pour l'électrode non modifiée et d'environ -1 mA/cm² pour l'électrode modifiée.

Ce résultat peut être soit lié à une amélioration de la réaction de réduction de l'oxygène par le poly-NiTSPc comme rapporté précédemment [147] soit être lié à un effet de surface dû à une augmentation de la surface spécifique du matériau.

L'épaisseur du dépôt de poly-NiTSPc peut avoir une influence sur la réaction de réduction de l'oxygène. L'effet du nombre de cycles, pour l'électrodéposition de poly-NiTSPc, a donc été étudié afin d'optimiser cette catalyse à la cathode. Il est attendu qu'en modifiant la surface du feutre de carbone, le courant de réduction de l'oxygène augmente, permettant ainsi une augmentation des performances des biopiles. Ainsi, la **Figure 46** illustre l'évolution de la densité de courant obtenue à -0,8 V vs SCE (correspondant à la réduction de l'O_2) en fonction du nombre de cycle d'électrodéposition de poly-NiTSPc.

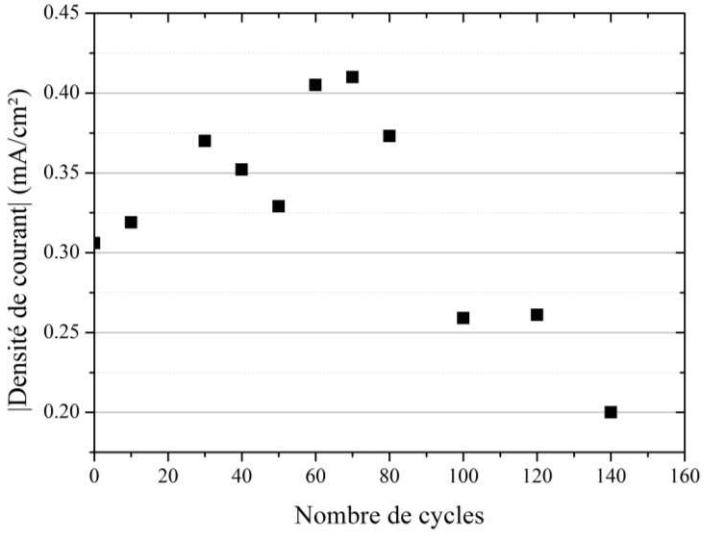


***Figure 46** : Evolution de la densité de courant à -0,8 V vs ECS en valeur absolue en fonction du nombre de cycle d'électrodépôt de poly-NiTSPc dans 0,1 M de KNO_3 en solution saturée de O_2.*

La densité de courant maximale est obtenue pour 70 cycles de dépôt électrochimique comme illustré en **Figure 46**. On peut observer qu'au-delà, la densité de courant diminue avec un minimum obtenu pour 140 cycles. Cette évolution suggère une amélioration de la cinétique avec une augmentation de l'épaisseur du polymère déposé et du nombre de catalyseur déposé. Néanmoins, la porosité du dépôt devient par la suite plus faible en raison de l'augmentation de l'épaisseur du dépôt, et elle limite donc la diffusion de l'oxygène au-delà de 100 cycles [221], [222]. Dans ce cas, c'est la structure du polymère formé qui limite la diffusion des espèces et en particulier l'O_2.

L'épaisseur du film de complexe à base de nickel peut être estimée par calcul du recouvrement de la surface de l'électrode, en se basant sur la charge sous le pic d'oxydation observé d'après l'équation suivante (**Équation *27***) [223] :

$$e = \frac{\Gamma\, M}{\rho} \qquad \textbf{Équation 27}$$

Avec

e l'épaisseur en cm

Γ le taux de recouvrement apparent en [mol/cm²]

M la masse molaire du monomère de Ni-TSPc en [g/mol]

ρ la masse volumique du monomère de Ni-TSPc en [g/mL]

Dans notre cas, le nombre optimal de cycles pour l'électrodéposition du film de NiTSPc sur le feutre de carbone est de 70 cycles. Sachant que ce dépôt correspond à un recouvrement de $6{,}1 \times 10^{-8}$ mol/cm², cela correspond approximativement à un film d'épaisseur 880 nm, valeur équivalente à la littérature [147], [221], [222], [224].

Le dépôt de poly-NiTSPc a par la suite été observé par MEB.

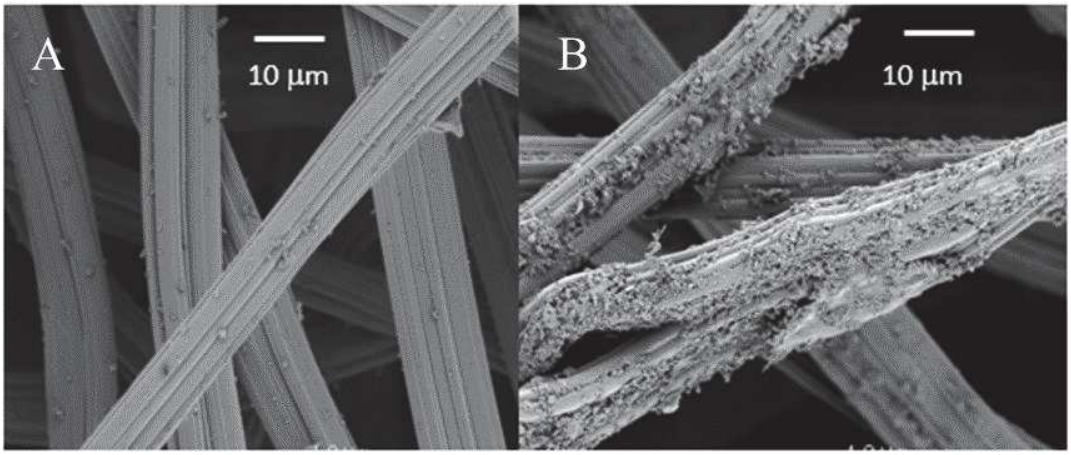


Figure 47 *: Images MEB du (A) feutre de carbone et (B) du feutre de carbone/poly-NiTSPc.*

Comme montré en **Figure 47**, le recouvrement des fibres de feutre de carbone par le poly-NiTSPc augmente la surface spécifique de l'électrode ce qui peut expliquer l'amélioration du courant de réduction de l'oxygène.

Le processus d'électrodépôt doit être homogène sur l'ensemble de la surface, et la méthode cyclique est une bonne façon d'arriver à ce but. Ainsi, la structure du film est imposée par l'empilement de couches de complexe et par interconnexion de ponts oxo. Les travaux de

Ureta-Zanatu et al [224] ont révélé que le film de poly-NiTSPc électrodéposé et caractérisé par voltammétrie cyclique dans du NaOH est de la forme β-$Ni(OH)_2$, et est donc très similaire à l'hydroxyde de nickel. Une grande partie des fibres de carbone montre un dépôt d'agrégats (**Figure 47.B**), qui est supposé être du β-$Ni(OH)_2$ comme démontré par des travaux récents.

Cette cathode a par la suite été couplée avec l'électrode SSF/$(PEI/rGO)_5$ dans une biopile afin d'en évaluer les performances sur la production d'électricité.

5. La biopile microbienne

Le dispositif utilisé afin de construire la biopile microbienne est constitué de deux compartiments séparés par une membrane. Le montage est détaillé dans le paragraphe suivant.

5.1. Montage de la biopile

Le premier compartiment est dédié à l'anode tandis que le deuxième est dédié à la cathode. L'électrode utilisée à l'anode est l'électrode SSF/$(PEI/rGO)_5$, réalisée précédemment, et l'électrode de feutre de carbone modifiée avec de la phthalocyanine constitue la cathode. Un biofilm électroactif a été formé à la surface de l'anode à partir de terreau de jardin et par polarisation à un potentiel de -0,246 V vs Ag/AgCl. La densité de courant obtenue à la fin de la polarisation est de 1,5 A/m². Cette anode, nommée SSF/$(PEI/rGO)_5$/biofilm, a ensuite été placé dans le dispositif électrochimique. Les deux compartiments sont séparés par une membrane de Nafion 117® qui permet le transport des protons du compartiment anodique vers le compartiment cathodique. D'un côté, l'anode est immergée dans un mélange de lixiviat de terreau de jardin, d'acétate de sodium (20 mM) et de chlorure de potassium KCl (60 mM). De l'autre côté, la cathode est immergée dans une solution de nitrate de potassium KNO_3 (0,1 M) dans laquelle l'oxygène est apporté par bullage continu d'air ou d'oxygène pur. Une résistance externe de 1 kΩ est connectée aux bornes des deux électrodes [225] afin de permettre le transport des électrons de l'anode à la cathode. Un voltmètre, avec une grande impédance d'entrée (10 MΩ), est connecté en parallèle afin d'observer l'évolution de la tension de la biopile (**Figure 48**).

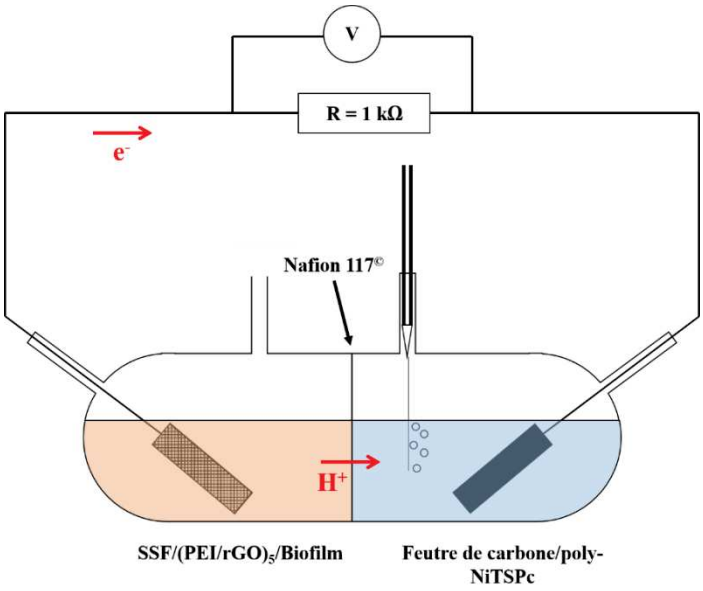


Figure 48 *: Schéma de montage de la biopile à deux compartiments séparés par une membrane.*

Les évolutions de la densité de courant et de la puissance de la biopile ont été évaluées au cours du temps.

5.2. <u>Densité de courant et puissance de la biopile</u>

L'évolution de la densité de courant avec un bullage d'air est reportée en **Figure 49** pendant une période de 40 jours.

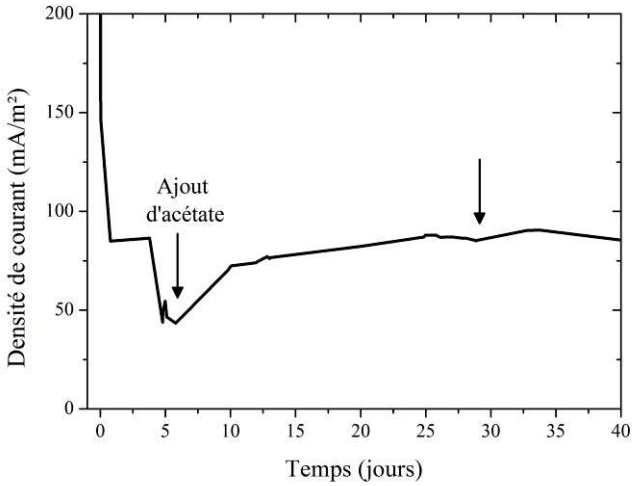


Figure 49 *: Evolution de la densité de courant avec apport d'oxygène par bullage d'air en fonction du temps de fonctionnement de la biopile.*

On peut constater une forte diminution de la densité de courant produite durant les premiers jours de fonctionnement de la biopile jusqu'à atteindre une densité de courant de 43,4 mA/m² et une densité de puissance de 1,88 mW/m² au sixième jour (avant addition de l'acétate). Cela correspond à l'équilibrage du biofilm dans la nouvelle configuration de mesure puisque dans ce cas, il n'y a plus de polarisation. Après ajout d'acétate, le courant augmente jusqu'à un maximum de 88 mA/m et correspond à un rendement faradique de 11,9 %. Le deuxième ajout d'acétate est réalisé après 30 jours lorsqu'une légère diminution de courant est observée. Il permet ainsi d'atteindre une valeur d'environ 90 mA/m².

Durant l'expérience précédente, la cathode de feutre de carbone/poly-NiTSPc a été remplacée deux fois (au jour 5 et au jour 21) par une électrode de platine qui est généralement utilisée pour la réduction de l'oxygène. Cet échange a permis de montrer (**Tableau 10**) que la densité de puissance obtenue avec l'électrode de phthalocyanine est 7,5 fois supérieure à la puissance obtenue avec l'électrode de platine, et ceci dans chaque cas.

Electrode	**Puissance (mW/m²)**	
	T = 5 Jours	T = 21 Jours
Platine	0,93	0,93
Feutre de carbone/poly-Ni-TSPc	7,5	7,57

Tableau 10 *: Comparaison des puissances de la biopile en fonction de la nature de la cathode avec bullage d'air.*

L'influence de l'apport en O_2 pur par rapport à l'apport en O_2 contenu dans l'air a aussi été étudié (**Tableau 11**).

Temps (jours)	**Puissance (mW/m²)**		**Rapport $P_{O2}/P_{AIR\ ambiant}$**
	Air	O_2	
1	24,8	58,6	2,36
5	7,5	22,6	3,01
10	4,9	25,9	5,22
21	7,57	24,8	3,27

Tableau 11 *: Comparaison des puissances en fonction de la présence en O_2 pur ou contenu dans l'air avec la cathode de phthalocyanine.*

En présence d'O_2 pur, la densité de puissance débitée par la pile est en moyenne 3,5 fois supérieure à la puissance obtenue lorsque le compartiment anodique est laissé à l'air libre. Dans

les deux cas, que ce soit avec la cathode en platine ou en feutre de carbone-poly-NiTSPc, la stabilité de l'électrode est conservée pendant 21 jours.

6. Conclusions

L'utilisation du graphène, afin de modifier une électrode, dans le but de réaliser une bioanode permet donc de réduire le temps de formation du biofilm électroactif, et d'augmenter la capacité de transfert des électrons entre le biofilm et l'électrode. De plus, le développement d'une cathode abiotique à base de feutre de carbone et de phthalocyanine de nickel permet d'obtenir des puissances supérieures à une cathode classique en platine.

Les premiers travaux sur les biopiles microbiennes ont mobilisé un mélange complexe comme inoculum (le terreau de jardin). Cela a permis de valider notre approche sur la modification d'électrode pour l'amélioration des performances électriques. Toutefois, des limites sont apparues quant à l'utilisation de lixiviat de terreau de jardin pour la compréhension des mécanismes mis en jeu pour la production d'électricité. En effet, il est impossible de contrôler la composition microbienne du biofilm formé. En effet, à partir de la même suspension de terreau, une perte d'électroactivité du biofilm a été observée dans le cas de l'électrode en mousse d'acier inoxydable contrairement au biofilm formé à la surface de l'électrode modifiée. Cette perte d'électroactivité du biofilm peut résulter de nombreux facteurs difficilement contrôlables à partir de lixiviat de terreau et notamment avec les conditions expérimentales utilisées. Il est également apparu que le fait de travailler en batch limitait la production d'électricité à un certain temps en raison de la limitation en apport de substrat réalisé manuellement. Enfin, le substrat est consommé par l'ensemble des microorganismes présents dans la biopile, à savoir les microorganismes en suspensions, sous formes planctoniques et sous formes de biofilms. C'est-à-dire qu'il y a des pertes de production d'électricité puisque la source carbonée n'est pas uniquement oxydée par le biofilm.

C'est pourquoi, dans l'objectif de poursuivre l'optimisation d'une biopile microbienne, nous avons choisi de développer un design de biopile permettant de travailler en alimentation continue. Pour cela, il est important d'utiliser des biofilms formés à partir de souches pures dont l'inoculum et les conditions de culture seront standardisées.

Ce sera l'objet du chapitre suivant.

CHAPITRE 4 :

Conception et validation du bioréacteur

Chapitre 4 : Conception et validation du bioréacteur

L'objectif de ce chapitre est de présenter la conception d'un réacteur de culture biologique pouvant accueillir différentes souches microbiennes du côté anodique tout en permettant de mieux maitriser la formation de biofilm et donc la production l'électricité. Pour éviter les ajouts séquentiels de substrats, qui induisent des changements importants de l'environnement et qui peuvent affecter l'activité du biofilm, un renouvellement continu du milieu nutritif a été choisi. L'avantage d'un apport continu en milieu est d'éviter les phénomènes de carence nutritionnelle et d'adapter la vitesse d'apport des substrats à l'activité métabolique des microorganismes. Ce mode d'alimentation continu devrait aussi permettre de limiter les phénomènes d'inhibition dus à l'accumulation de métabolites et, selon les débits appliqués, de s'affranchir de l'activité des cellules planctoniques (cellules libres en suspension dans la solution) contrairement au système utilisé précédemment réalisé en milieu non renouvelé (batch). Afin de mieux maîtriser la formation du biofilm sur l'anode, un inoculum d'une culture pure est également choisi. Ce genre de biofilm monoculture n'est pas forcément le plus adapté pour produire de l'électricité mais il devrait permettre de standardiser la formation et l'activité du biofilm dans des conditions expérimentales contrôlées. Parmi les souches modèles capables de former rapidement un biofilm et de transférer les électrons libérés au cours des réactions d'oxydation, à l'anode, *Pseudomonas aeruginosa* a été retenu pour tester les performances du réacteur. Cette souche, dont le métabolisme est strictement oxydatif, est décrite comme un bon candidat pour la formation de biofilms électroactifs notamment à partir de l'oxydation d'un substrat classique : le glucose [84], [87], [132], [226].

Ce chapitre comprend deux parties. La première est consacrée à la conception d'un bioréacteur et la deuxième à la validation de ce prototype.

1. Conception du bioréacteur

Le fonctionnement du bioréacteur envisagé repose sur le principe du chémostat et est donc présenté dans le paragraphe suivant.

1.1. Principe de fonctionnement du chémostat

La culture de microorganismes en chémostat consiste à alimenter de façon continue le réacteur, avec un milieu nutritif stérile, tout en soutirant du réacteur un volume équivalent de « milieu plus microorganismes » en continu, afin de maintenir le volume constant. Après un certain temps de fonctionnement, la concentration des microorganismes s'ajuste d'elle-même à une valeur constante. On dit que la culture est parvenue à un état stationnaire. Il s'agit ici d'un équilibre dynamique où tout ce qui se consomme est remplacé par une quantité équivalente, ce qui fait que tous les paramètres restent constants au cours du temps (concentrations, pH, vitesses de consommation et de production etc.).

Une représentation schématique d'un chémostat est présentée en **Figure 50**.

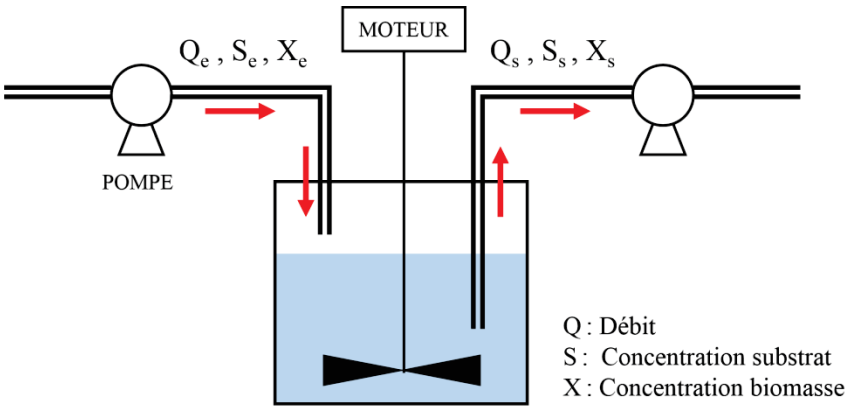


Figure 50 *: Représentation schématique d'un chemostat.*

Le bilan de matière associé à ce système dépend de l'**Équation 28** :

$$V\frac{dX}{dt} = Q_eX_e - Q_sX_s + V\mu X - Vk_dX \qquad \textbf{Équation 28}$$

Avec :

V le volume du milieu de culture en [L],

X la concentration cellulaire en [g/L],

Q le débit d'alimentation en [L/h],

μ le taux de croissance en [h^{-1}],

k_d le taux de mortalité en [h^{-1}]

On obtient alors (**Équation 29**) :

$$\frac{dX}{dt} = \frac{Q_e}{V} X_e - \frac{Q_s}{V} X_s + \mu X - k_d X \qquad \textbf{Équation 29}$$

Si le débit d'alimentation en entrée est égal au débit d'alimentation en sortie, alors $Q_e = Q_s = Q$. De plus, s'il n'y a aucune rétention au niveau de la sortie, alors la concentration cellulaire en sortie, X_s, est la même que la concentration cellulaire dans le compartiment : $X_s = X$. On obtient donc l'**Équation 30** :

$$\frac{dX}{dt} = \frac{Q}{V} (X_e - X) + X (\mu - k_d) \qquad \textbf{Équation 30}$$

Soit D le taux de dilution, exprimé en h^{-1}, dont l'équation est (**Équation 31**) :

$$D = \frac{Q}{V} \qquad \textbf{Équation 31}$$

Etant donné que le milieu d'alimentation est stérile, la concentration cellulaire en entrée, X_e, est nulle. Le taux de mortalité quant à lui est négligeable par rapport au taux de croissance, $k_d \ll \mu$.

On obtient alors l'équation finale suivante (**Équation 32**) :

$$\frac{dX}{dt} = \mu X - DX = X(\mu - D) \qquad \textbf{Équation 32}$$

En régime permanent, la concentration en biomasse est constante, donc (**Équation 33**) :

$$\mu X = DX$$

$$\mu = D \qquad \textbf{Équation 33}$$

$$\frac{dX}{dt} = 0$$

Les évolutions des concentrations en biomasse et en substrats sont représentées en **Figure 51** :

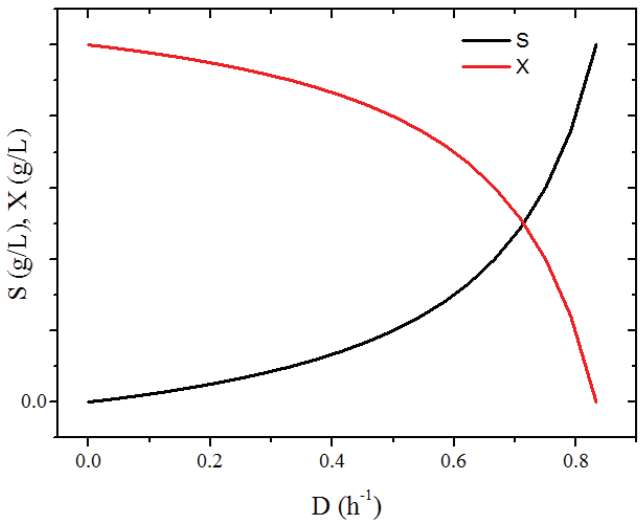


Figure 51 *: Evolution de la concentration en biomasse (rouge) et en substrats (noir) dans le bioréacteur en fonction du taux de dilution.*

D'après la **Figure 51**, il existe plusieurs configurations :

- Si D → 0, alors X → X_{max} et S → 0
- Si D → 0,83, alors X → 0 et S → S_0

  Ici le taux de dilution est supérieur à la capacité maximale du microorganisme à se développer (taux de croissance critique, μ_c), ce qui entraîne un lessivage progressif de la culture c'est à dire que la concentration de la biomasse diminue pour tendre vers zéro.

- Lors d'un changement du taux d'alimentation (**Équation 32**) :
  - Tel que D > μ alors $\frac{dX}{dt} < 0$ d'où S augmente et X diminue jusqu'à une valeur résiduelle. On retrouve alors un équilibre μ = D.
  - Tel que D < μ, alors $\frac{dX}{dt} > 0$ d'où X augmente et S diminue jusqu'à ce que S devienne limitant. On retrouve alors un équilibre μ =D.

Dans notre cas, ce mode de culture serait non seulement intéressant pour maintenir les microorganismes dans un même environnement mais surtout pour éliminer les microorganismes non fixés à l'anode. Ceci implique, une fois le biofilm formé, d'imposer un taux de dilution supérieur ou égal au taux de croissance critique du microorganisme utilisé, pour obtenir un lessivage des formes planctoniques. Ainsi dans l'idéal, un seul type de biomasse

serait présent dans le bioréacteur, le biofilm, et l'assimilation de la source de carbone et d'énergie nécessaire à la production d'électricité ne pourrait être attribuée qu'au biofilm.

Un cahier des charges a donc été établi afin de répondre au mieux aux contraintes liées à la conception de ce type de bioréacteur.

1.2. Cahier des charges

1.2.1. Objectifs

Le bioréacteur doit permettre le suivi de différentes variables telles que :

- L'évolution de la biomasse par lecture de la densité optique (DO) en sortie du bioréacteur.
- L'évolution du pH entre l'entrée et la sortie du bioréacteur, témoignant d'une activité métabolique.

Il est aussi important de pouvoir contrôler les paramètres physico-chimiques comme :

- L'environnement de culture de *P. aeruginosa* par l'utilisation d'un milieu défini : un milieu complexe (Bouillon Trypcase Soja : TSA-B) favorisant la formation d'un biofilm. Ce milieu riche sera remplacé par un milieu synthétique permettant le maintien du biofilm (Bouillon Biofilm Modifié : BBM).
- Le débit d'alimentation en substrats à l'aide d'une pompe pilotée par ordinateur.
- La température de fonctionnement en plaçant le dispositif dans une enceinte thermostatée permettant ainsi d'avoir une croissance optimum de *P. aeruginosa*.

1.2.2. Géométrie

Dans l'optique d'une utilisation en biopile, le choix a été fait de réaliser un bioréacteur comportant deux compartiments distincts, un anodique et un cathodique, et tous deux séparés par une membrane permettant l'échange de protons. En effet, ce design permet d'éviter des réactions parasites comme la réduction de l'oxygène par le biofilm constitué à l'anode.

Dans la volonté de travailler avec un système d'apport continu en substrats, il est nécessaire d'avoir la présence d'une entrée et d'une sortie au niveau du compartiment anodique où sera placée une culture de *P. aeruginosa*. Il en est de même pour le compartiment cathodique

afin de pouvoir changer facilement et régulièrement l'électrolyte consommé. Ainsi, deux tétines doivent être opposées de part et d'autre des deux compartiments. Afin de travailler à volume constant, l'entrée du milieu se fait en dessous du compartiment tandis que la sortie, permettant de soutirer le milieu, se situe au-dessus. Dans cette configuration, le volume de milieu apporté chasse par trop plein le volume de culture (**Figure 52**).

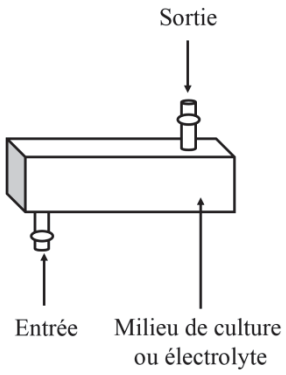


Figure 52 *: Schéma d'un compartiment avec l'entrée et la sortie du milieu de culture.*

La géométrie générale du compartiment anodique doit aussi être prise en compte afin d'avoir un écoulement dans l'ensemble du compartiment et de limiter la sédimentation de *P. aeruginosa*. Deux géométries sont donc possibles : une rectangulaire et une cylindrique (**Figure 53**).

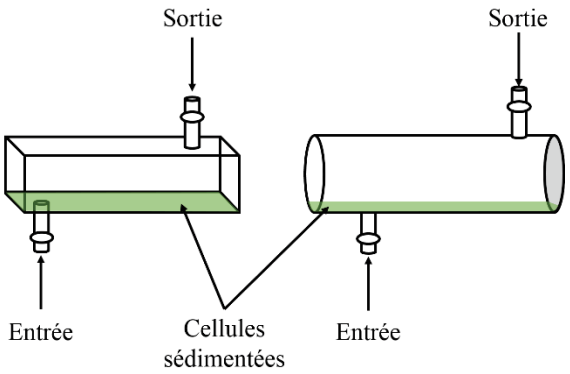


Figure 53 *: Schéma du compartiment anodique de forme rectangulaire (gauche) et cylindrique (droite) avec les cellules sédimentées représentées en vert.*

Comme on peut le voir sur la **Figure 53**, la surface propice à une sédimentation des microorganismes (représentée en vert) est plus importante dans un réacteur avec une géométrie rectangulaire qu'avec une géométrie cylindrique. De plus, la forme cylindrique permet d'avoir un écoulement le plus uniforme possible comme indiqué en **Figure 54**.

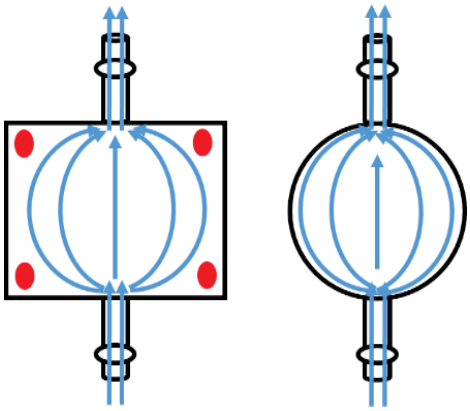


Figure 54 *: Vue de face de la circulation du milieu nutritif dans le compartiment anodique (gauche) de forme rectangulaire, les zones rouges indiquent les zones stagnantes; (droite) de forme cylindrique.*

On constate sur la **Figure 54** que la forme rectangulaire présente des zones stagnantes où le fluide ne circule pratiquement pas et empêche ainsi un écoulement uniforme dans l'ensemble du compartiment. De plus, dans le but de ne pas endommager le biofilm ainsi que les microorganismes au cours de leur croissance, il est important que le flux appliqué soit laminaire. En effet, un écoulement turbulent endommagerait la culture en affectant la viabilité des microorganismes et le maintien du biofilm sur l'anode. Pour ces raisons, c'est donc la géométrie cylindrique qui est retenue.

Dans le but de limiter la consommation de trop grands volumes de milieux de croissance, le volume du compartiment anodique doit être le plus petit possible. Si on considère un taux de croissance de 1 h^{-1} [227], il faut compter plus de 40 min pour doubler la biomasse d'après l'**Équation 34** :

$$G = \frac{\ln(2)}{\mu} \qquad \textbf{Équation 34}$$

Avec :

G le temps de génération (temps nécessaire pour que la population double) en [h]

μ le taux de croissance en [h^{-1}]

Pour limiter la présence de cellules en suspension dans le compartiment anodique, il faut donc que le taux d'alimentation soit supérieur ou égal à 1 h^{-1} afin que la biomasse planctonique soit éliminée du compartiment. A partir du volume utile du bidon d'alimentation qui est de 10 L, nous avons fixé un renouvellement de ce volume une fois par semaine au maximum pour des raisons pratiques. En effet, chaque changement de milieu nécessite un arrêt de l'alimentation

ce qui implique une discontinuité de la réaction biologique avec un fonctionnement de la biopile en mode batch. Cet arrêt, d'environ huit heures, est imposé par les cycles de décontamination du bidon et de stérilisation du nouveau milieu. En ramenant le volume de milieu consommé à une unité de temps, on obtient 1,43 L par jour ce qui équivaut à 59,5 mL par heure. Comme le taux d'alimentation est d'au moins 1 h^{-1}, le volume maximal du compartiment anodique doit être de 59 mL. Pour faciliter les calculs de débit d'alimentation et se laisser une marge, le volume retenu est de 50 mL ce qui correspond à un compartiment de 5 cm de long et 3,6 cm de diamètre.

Le paragraphe suivant s'intéresse à l'armature du bioréacteur.

1.2.3. L'armature

Chaque compartiment est supporté par deux blocs de forme circulaire. Une rainure circulaire accueille chaque extrémité du compartiment. Cette rainure est plus large de 1 mm que l'épaisseur du compartiment et possède un joint assurant l'étanchéité entre le bloc et le compartiment. Les deux blocs extérieurs sont pleins, tandis que les blocs centraux sont percés au centre pour permettre la fixation de la membrane échangeuse de protons entre les deux compartiments comme indiqué en **Figure 55**.

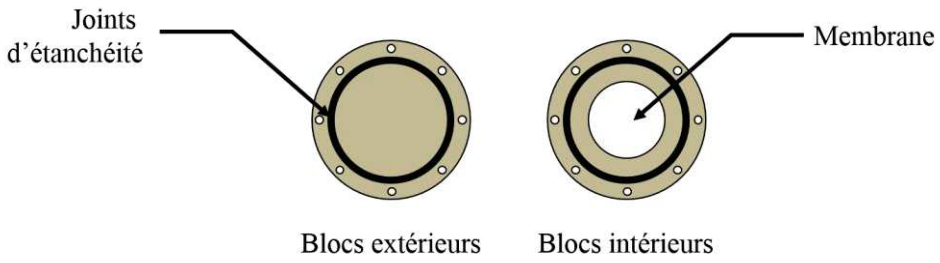


Figure 55 *: Schéma des deux sortes de blocs constituant l'armature du bioréacteur.*

La membrane est placée entre les deux blocs intérieurs. La surface d'échange entre les deux compartiments est inférieure à la section du compartiment. Ainsi, le diamètre de la surface d'échange est de 3,2 cm, contre 3,6 cm pour la section du compartiment. Pour assurer l'étanchéité du système, deux joints sont placés de part et d'autre de la membrane (**Figure 56**). Les deux blocs, les deux joints d'étanchéité et la membrane sont maintenus entre eux à l'aide de quatre boulons écrous. Les trous d'un des deux blocs ont été filetés pour visser les boulons écrous directement dans ce bloc.

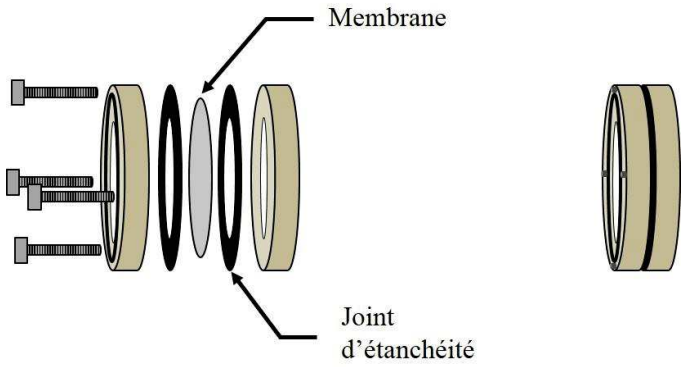


Figure 56 *: Schémas d'assemblage des blocs du milieu (gauche) vue éclatée et (droite) vue assemblée.*

L'ensemble du prototype est quant à lui maintenu par huit boulons placés aux extrémités de quatre tiges filetées (**Figure 57**).

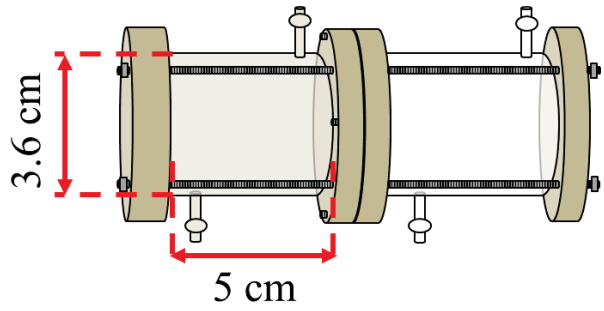


Figure 57 *: Schéma de montage du prototype.*

Les compartiments anodique et cathodique ont les mêmes dimensions.

Les caractéristiques de la membrane sont présentées dans la partie suivante.

1.2.4. La membrane

La membrane choisie est une membrane échangeuse de protons de type Nafion 117®. La membrane de Nafion 117® est la membrane la plus utilisée dans les piles à combustibles à membrane échangeuse de protons ainsi que pour les biopiles en raison de sa grande conductivité ionique (0,1 S/cm) [228]. Du fait de la géométrie cylindrique des compartiments, la plus grande surface disponible pour échanger les protons est circulaire.

Deux caractéristiques du système peuvent être déterminées : la conductivité ionique et la résistance interne.

La conductivité ionique dépend de la charge des ions présents en solution (milieu de culture à l'anode et l'électrolyte à la cathode), de la conductivité molaire ionique des ions et de la concentration molaire des ions selon la relation suivante (**Équation 35**) :

$$\sigma = \sum z_i * \lambda_i * [X_i] \qquad \textbf{Équation 35}$$

Où :

σ est la conductivité exprimée en [S/m],

z_i est le nombre de charge portée par l'ion (indépendamment de leur signe),

λ_i la conductivité molaire ionique des ions en [S.L/(m.mol)],

$[X_i]$ la concentration molaire des ions en [mol/L].

A titre d'exemple, l'équation de conductivité est la suivante pour un milieu synthétique comme le bouillon biofilm modifié (BBM) [194] qui contient cinq sels (chapitre 2) (**Équation 36**) :

$$\sigma_{BBM} = \sigma_{MgSO_4} + \sigma_{FeSO_4} + \sigma_{NaHPO_4} + \sigma_{KH_2PO_4} + \sigma_{(NH_4)_2SO_4} \qquad \textbf{Équation 36}$$

Avec :

- $\sigma_{MgSO_4} = 2 * \lambda_{Mg^{2+}} * [Mg^{2+}] + 2 * \lambda_{SO_4^{2-}} * [SO_4^{2-}]$
- $\sigma_{FeSO_4} = 2 * \lambda_{Fe^{2+}} * [Fe^{2+}] + 2 * \lambda_{SO_4^{2-}} * [SO_4^{2-}]$
- $\sigma_{Na_2HPO_4} = 2 * \lambda_{Na^{2+}} * [Na^{2+}] + 2 * \lambda_{HPO_4^{2-}} * [HPO_4^{2-}]$
- $\sigma_{KH_2PO_4} = 1 * \lambda_{K^+} * [K^+] + 1 * \lambda_{H_2PO_4^-} * [H_2PO_4^-]$
- $\sigma_{(NH_4)_2SO_4} = 1 * \lambda_{NH_4^+} * [NH_4^+] + 2 * \lambda_{SO_4^{2-}} * [SO_4^{2-}]$

La conductivité du milieu BBM est de 0,159 S/m, soit $1{,}59 \times 10^{-3}$ S/cm, ce qui est 100 fois inférieur à la conductivité de la membrane de Nafion 117® (0,1 S/cm). A la cathode, une solution de ferricyanure et de chlorure de potassium est utilisée comme catholyte afin de ne pas être limitant. La conductivité de ce mélange est de 3,775 S/m, soit $3{,}775 \times 10^{-2}$ S/cm, c'est-à-dire trois fois inférieure à celle de la membrane. La conductivité de la membrane n'est donc pas un facteur limitant dans ce système.

La deuxième caractéristique du système est sa résistance interne. Elle est assimilée à une résistance en série liée aux résistances des électrolytes et de la membrane selon la relation suivante (**Équation 37**) :

$$R_{int} = \sum R_{série} = R_{membrane} + R_{BBM} + R_{électrolyte}$$ **Équation 37**

Chacune des résistances en série dépend de la distance entre les deux électrodes, de sa conductivité molaire et de la surface d'échange (correspondant à la surface de la membrane) (**Équation 38**) :

$$R = \frac{L_e}{\sigma_s * A}$$ **Équation 38**

Avec :

R la résistance exprimée en [Ω],

L_e la distance séparant les deux électrodes en [m],

σ_s la conductivité de la solution en [S/m],

A l'aire de la surface d'échange en [m²].

Dans le cas de notre prototype, le rayon de la membrane est de 1,6 cm et la distance entre les deux électrodes est de 2 cm. La résistance théorique calculée est de 165,5 Ω. Cette valeur reste relativement faible et ne devrait donc pas être limitante dans un processus de génération d'électricité par la biopile.

La partie suivante concerne les matériaux utilisés pour la conception du bioréacteur.

1.2.5. Matériaux pour la réalisation du bioréacteur

Le fait de travailler avec une souche pure nécessite de pouvoir stériliser entièrement le bioréacteur afin d'éviter toute contamination. Tous les matériaux utilisés doivent donc pouvoir être stérilisés et résister à un barème de 121 °C durant 15 minutes. Les matériaux composants le bioréacteur sont de trois types et correspondent aux deux compartiments (anodique et cathodique), aux joints d'étanchéité et à l'armature maintenant l'ensemble.

Les compartiments doivent non seulement résister à des stérilisations répétées mais aussi être transparents afin de visualiser les différents phénomènes ayant lieu au sein du compartiment comme le développement du biofilm, la présence de microorganismes en suspensions ou la sédimentation des microorganismes. Le verre a donc été sélectionné pour constituer les parois des compartiments.

Le caoutchouc a tout d'abord été sélectionné comme matériau pour les joints d'étanchéité. Cependant, ce choix a été abandonné puisqu'après trois stérilisations successives, le caoutchouc

devenait dur et cassant. Le choix s'est donc porté sur un autre matériau souple plus résistant : l'Ethylène-Propylène-Diène Monomère (EPDM). Il résiste à de hautes températures de +150°C en service limité et de +120°C en service continu. L'expérience a montré qu'effectivement ces joints ont résisté à plus de 30 stérilisations avec un barème de 121°C pendant 15 minutes.

Le matériau utilisé pour l'armature du bioréacteur doit être aussi stérilisable et résistant aux contraintes mécaniques liées au maintien hermétique du bioréacteur. Le choix de ce matériau s'est donc porté sur le PolyEtherEtherKetone (PEEK) possédant une température de transition vitreuse de 143°C, une température de fusion de 343°C et est donc résistant aux barèmes de stérilisation utilisés au cours de cette étude.

Enfin, les tiges filetées et les boulons sont en acier inoxydable du fait de leur stabilité à de hautes températures.

1.2.6. Electrodes

Un fil de platine est utilisé à la cathode afin de catalyser la réaction de réduction du ferricyanure (III) en ferrocyanure (II). Pour assurer une connexion entre l'intérieur du compartiment cathodique et l'extérieur, le fil de platine est introduit par un joint torique se situant au centre du bloc extérieur de l'armature. Le joint est serré par un boulon plat en PEEK.

L'anode est quant à elle constituée de feutre de carbone (6,35 mm d'épaisseur, porosité de 99,0 %, diamètre des fibres de 6 µm, Alfa Aesar) afin de tester et de valider la géométrie du bioréacteur. En effet, le feutre de carbone est un bon candidat pour la formation de biofilm de *P. aeruginosa* [132]. Les fibres de carbone constituant le feutre ne sont pas tissées, ce qui augmente la surface spécifique de ce matériau et augmente donc la surface accessible pour l'adhésion des bactéries.

L'électrode doit pouvoir être connectée avec l'extérieur du bioréacteur. Cette connexion ne doit pas engendrer de demi-pile annexe, c'est-à-dire que le matériau utilisé ne doit pas favoriser de réaction d'oxydation ni de réduction en plus de celles liées au biofilm. De plus, ce matériau doit être un très bon conducteur. Ainsi, le matériau retenu pour assurer cette connexion est du titane. Le fil de titane est alors introduit dans le feutre de carbone. La connexion avec l'extérieur du compartiment est assurée par un joint torique se situant au centre du bloc extérieur de l'armature comme pour le compartiment cathodique.

Les deux électrodes doivent se faire face afin d'homogénéiser les lignes de champs électriques et la conductivité entre les deux électrodes.

La connexion entre l'électrode et le fil de titane est cruciale dans le transport des électrons. La résistance entre le fil et l'électrode doit être la plus faible possible afin de ne pas limiter le transport des électrons (0,9 Ω dans le cas présent).

1.2.7. Design du bioréacteur

En tenant compte de tous les éléments présentés, le design final du bioréacteur est le suivant (**Figure 58)**.

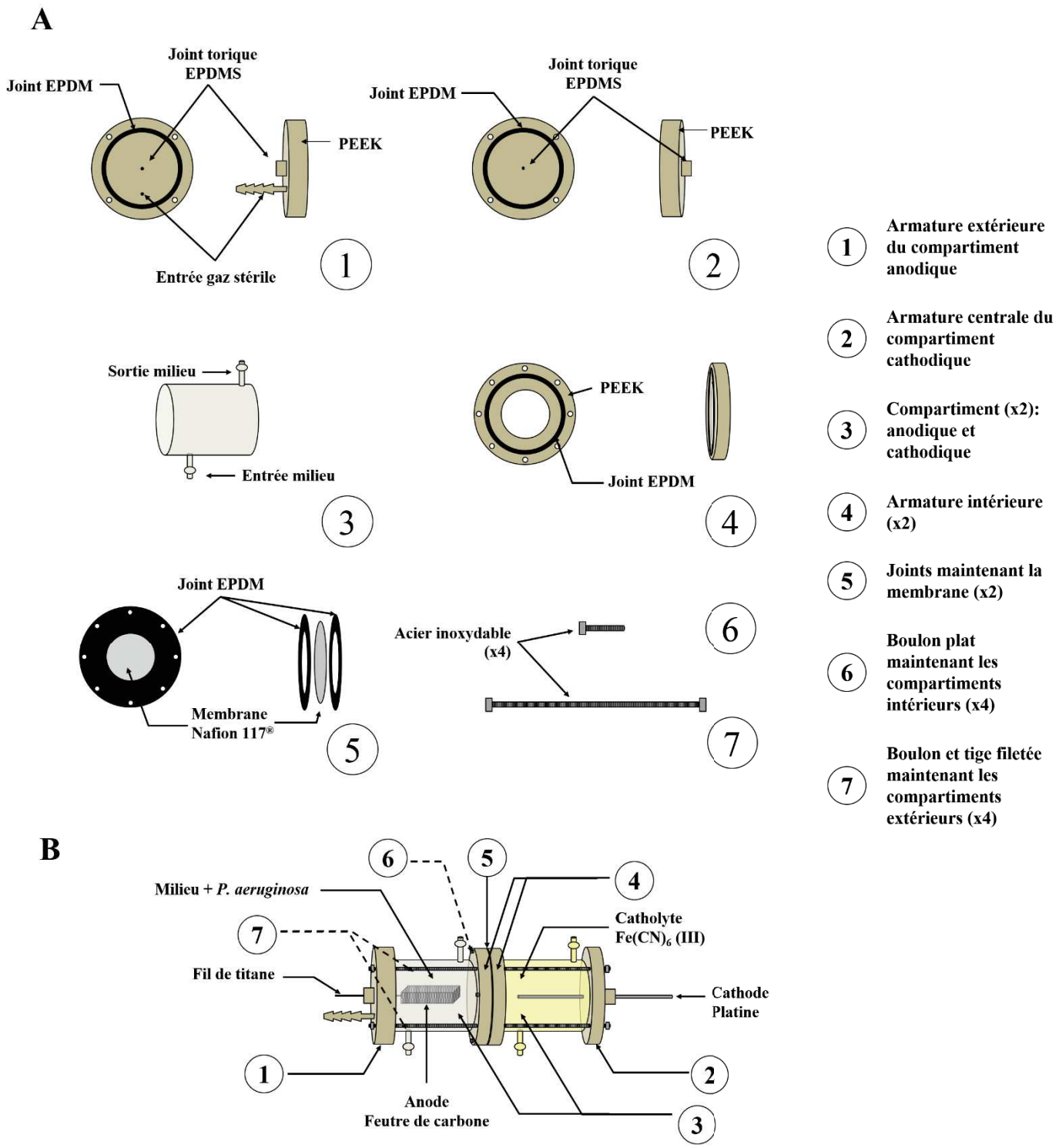


Figure 58 *: Schéma général (A) des pièces d'assemblage et (B) du bioréacteur.*

Ce prototype est donc composé de quatre parties en PEEK correspondant à l'armature. Les deux parties centrales du bioréacteur permettent de maintenir la membrane tandis que les deux parties extérieures permettent de maintenir l'ensemble du prototype. L'armature centrale est maintenue par quatre boulons plats et l'armature extérieure est maintenue par quatre tiges

filetées et serrées par des boulons. Sur les deux parties extérieures, on retrouve un joint torique qui permet de connecter l'anode et la cathode avec l'extérieur. La tige de titane maintenant l'anode et le fil de platine utilisé comme cathode doivent dépasser de la cellule afin de pouvoir effectuer les connexions soit avec le potentiostat soit avec une résistance externe. Idéalement, elles doivent dépasser de 3 cm afin d'avoir assez d'espace pour effectuer les branchements. Du côté anodique, une entrée pour du gaz stérile a été placée en dessous du joint torique afin d'assurer l'homogénéité dans le compartiment et permettre un apport en oxygène. Deux tétines, de part et d'autre du compartiment anodique, permettent l'apport et le soutirage du milieu. L'entrée du milieu se situe en bas du compartiment et la sortie se situe en haut afin de travailler à volume constant.

Il est aussi important de pouvoir travailler à température constante et contrôlée.

1.3. Maintien de la température

La température de fonctionnement de l'ensemble du dispositif doit être constante. Une solution aurait pu être de concevoir des compartiments à double enveloppe. Un flux d'eau, à température contrôlée, enveloppant les compartiments aurait permis de réguler la température à l'intérieur du compartiment. Cependant, ce système aurait d'une part fragilisé le prototype et d'autre part été difficile à concevoir. La solution la plus simple est de placer tout le système dans une enceinte thermostatée (étuve), ce qui offre en plus la possibilité de placer le bidon d'alimentation à l'intérieur et donc d'avoir un contrôle complet sur la température de l'ensemble du dispositif. La température de croissance optimale de *P. aeruginosa* est de 37°C [194].

1.4. Choix de la pompe

Pour un fonctionnement en mode continu, une pompe doit être placée entre le bidon d'alimentation et le bioréacteur. Etant donné que c'est une surverse à la sortie, c'est-à-dire qu'il y a une évacuation du milieu par débordement en raison de l'apport en continu, il n'y a pas besoin de pompe en sortie. Une pompe péristaltique a été utilisée dans un premier temps. Néanmoins, il est apparu que lors d'une utilisation en continu et sur des temps de fonctionnement longs (au moins 10 jours), le tuyau comprimé au niveau de la pompe se détériorait, entraînant des fuites de milieu, des contaminations et un arrêt de l'alimentation.

Le choix a donc été fait d'utiliser une pompe à membrane pilotée par ordinateur. Le débit assuré par la pompe est contrôlé par perte de masse du milieu d'alimentation grâce à une balance connectée à un ordinateur. La perte de masse peut être calculée en fonction du temps, ce qui permet de déterminer précisément le débit appliqué. Il est possible, à partir de cette pompe, de faire varier l'amplitude et la fréquence de fonctionnement ce qui permet d'avoir une plage de débit plus élevée que celle de la pompe péristaltique (4 – 2 600 mL/h). La pompe à membrane (ProMinent GAMMA/4-W) est stérilisée par passages successifs d'eau de Javel, d'éthanol (96%) et de milieu stérile.

1.5. Montage final

Comme montré en **Figure 59**, le montage final du bioréacteur est composé d'un bidon d'alimentation contenant le milieu nutritif posé sur une balance reliée à un ordinateur. Ce bidon est équipé de deux sorties au niveau de son bouchon. Une première qui correspond à la sortie d'air terminée par un filtre stérile afin d'éviter tout problème de pression à l'intérieur de celui-ci tout en préservant la stérilité du milieu d'alimentation. La deuxième sortie est en contact avec le milieu et est connectée par un tuyau en silicone à une pompe à membrane dont les tuyaux ont été préalablement stérilisés. Le milieu au sein du bidon d'alimentation est sous agitation magnétique. La pompe est quant à elle reliée à l'entrée du bioréacteur et le débit d'alimentation est piloté par ordinateur. La sortie du bioréacteur est reliée à un bidon « poubelle » dans lequel se trouve de la Javel.

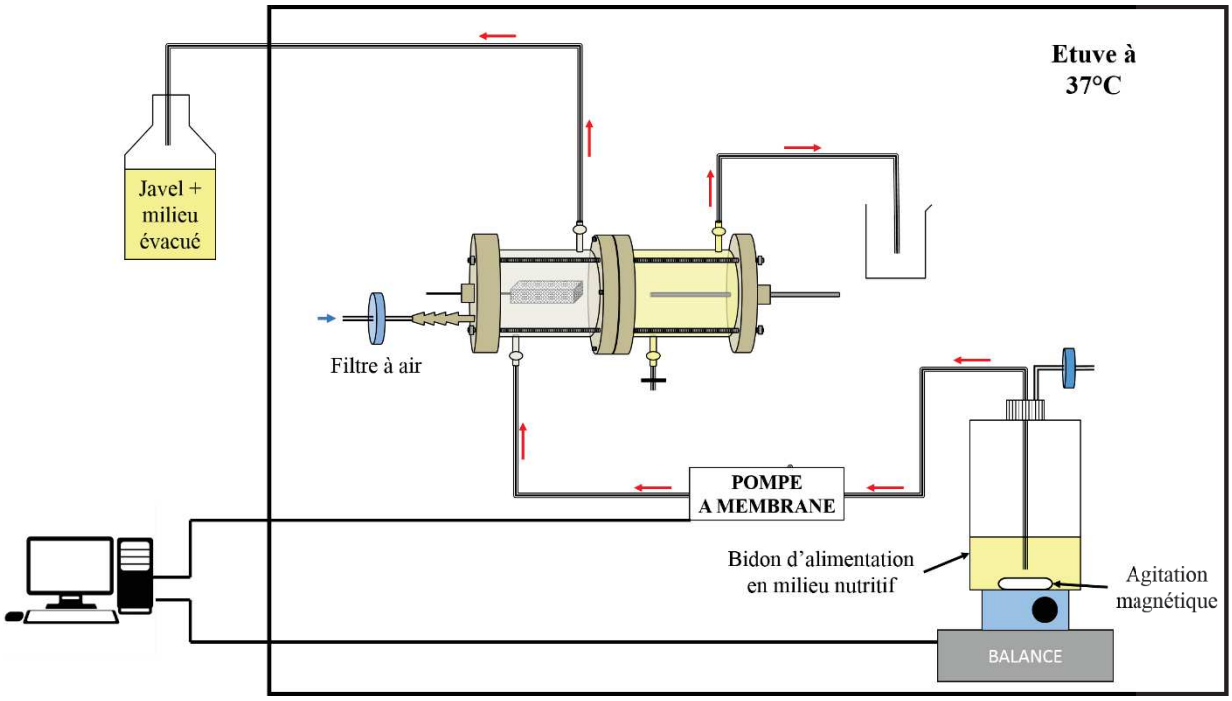


Figure 59 *: Schéma général du montage expérimental du bioréacteur.*

Au niveau du compartiment cathodique, un tuyau d'évacuation est placé au niveau de la tétine supérieure tandis que l'entrée sous le compartiment est fermée. En effet, la concentration en sels étant plus faible dans le compartiment anodique que dans le compartiment cathodique, un phénomène d'osmose est observé. L'osmose correspond à un passage d'eau à travers la membrane du compartiment le moins concentré en sels au compartiment le plus concentré. Il y a donc une augmentation du volume dans le compartiment cathodique. Si ce surplus n'est pas évacué, il y a une augmentation de la pression dans le compartiment et donc une déformation de la membrane qui peut alors se coller à l'anode et se percer.

Le prototype ainsi réalisé a été testé et validé. Ces résultats sont présentés dans la deuxième partie de ce chapitre.

2. Validation du bioréacteur en fonctionnement biopile

La validation du bioréacteur en configuration biopile a été réalisée en présence d'une souche modèle *P. aeruginosa* et d'une anode en feutre de carbone. Afin d'estimer la gamme de débits d'alimentation pouvant être appliquée, nous avons déterminé au préalable le taux de croissance maximal (μ_{max}) de *P. aeruginosa* par culture en batch.

2.1. Taux de croissance

Comme nous l'avons vu au début de ce chapitre, il est possible en mode continu d'éliminer les formes planctoniques en appliquant un taux de dilution supérieur ou égal au taux de croissance maximal de la souche. Pour approcher ces valeurs, le taux de croissance maximal de *P. aeruginosa* a été estimé après croissance dans deux milieux de culture contenant la même concentration de glucose : le milieu TSA-B qui est un milieu complexe et le milieu BBM qui est un milieu synthétique minimum. Le milieu complexe est décrit comme favorisant la croissance alors que le milieu synthétique est décrit comme adapté à la formation et au maintien d'un biofilm [194]. Des triplicats de croissance ont été réalisés en erlens à 37 °C, en condition aérobie pour les deux milieux de culture. Le suivi des croissances, par méthode hors ligne, a été réalisé par mesures de densité optique à 620 nm au cours du temps (**Figure 60**).

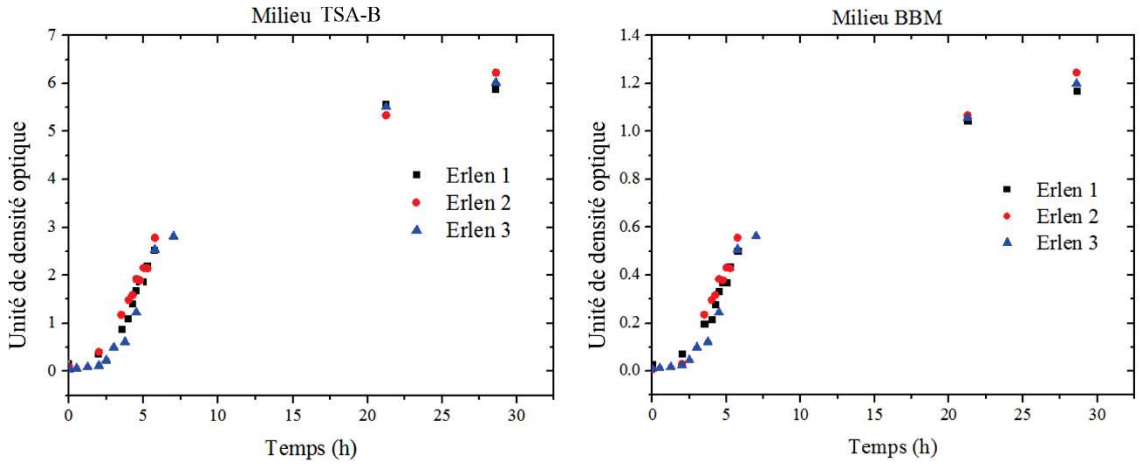


Figure 60 *: Evolution de la densité optique DO_{620} en fonction du temps pour les milieux TSA-B (gauche) et BBM (droite).*

La comparaison des profils de croissance montre que la production de biomasse est 5 fois plus importante lorsque *P. aeruginosa* est cultivé dans le milieu TSA-B. Ceci n'est pas vraiment surprenant puisque le milieu TSA-B est un milieu riche notamment en protéines (source d'azote et de carbone). Le taux de croissance maximal de *P. aeruginosa* a été déterminé à partir des représentations logarithmiques des courbes précédentes (**Figure 61**).

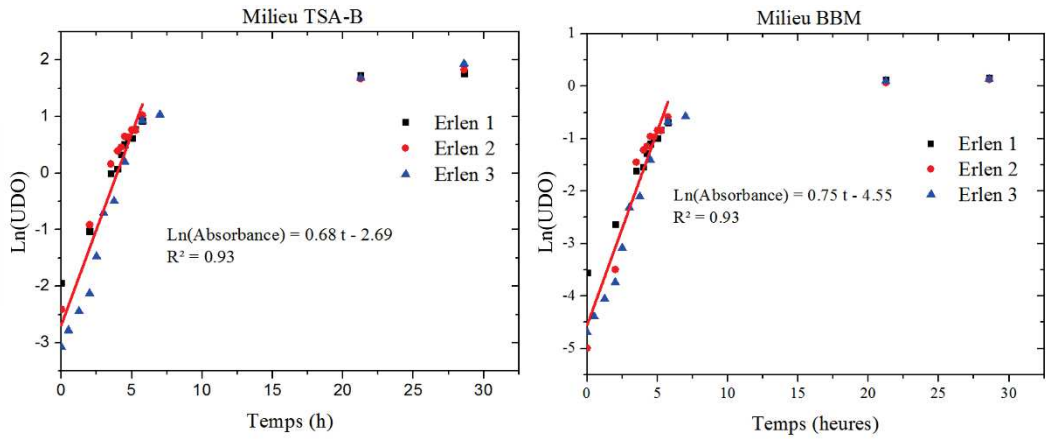


Figure 61 *: Représentation logarithmique de la DO_{620} pour les milieux (gauche) TSA-B et (droite) BBM.*

Quel que soit le milieu de culture utilisé, aucune phase de latence n'est observée indiquant que les deux milieux sont bien adaptés au développement de *P. aeruginosa*. La croissance démarre directement en phase exponentielle et la durée est égale à environ 5 h.

Pendant cette phase exponentielle, le taux de croissance (μ) est maximal et constant. Sa valeur correspond au coefficient directeur de la pente de la tangente à la courbe, représentée ici par une droite de couleur rouge (**Figure 61**) :

- Taux de croissance maximal moyen en milieu TSA-B : $\mu_{max} = 0{,}68\ h^{-1} \pm 0{,}04$
- Taux de croissance maximal moyen en milieu BBM : $\mu_{max} = 0{,}75\ h^{-1} \pm 0{,}04$

On peut constater que les taux de croissance ne sont pas significativement différents et qu'ils sont inférieurs à la valeur maximale utilisée pour dimensionner le compartiment anodique, 1 h^{-1}.

Connaissant le volume du compartiment et le taux de croissance, il est donc possible d'estimer le débit d'alimentation à appliquer pour éliminer les formes planctoniques (**Équation 39**) :

$$Q_v = V * \mu_{max}$$ **Équation 39**

Où

Q_v est le débit [mL/h],

V le volume du compartiment (50 mL)

μ_{max} le taux de croissance [h^{-1}].

Les valeurs de ces débits, 34 mL/h pour le milieu TSA-B et 37,5 mL/h pour le milieu BBM, ne sont qu'indicatives puisque la valeur du taux de croissance dépend des conditions de culture, notamment de la disponibilité de l'oxygène moléculaire comme dernier accepteur d'électrons.

Afin de valider le design de ce prototype, l'évolution de la formation d'un biofilm électroactif a, par la suite, été évaluée par suivi chronoampérométrique (évolution de la densité de courant en fonction du temps pour un potentiel imposé).

2.2. Formation d'un biofilm électroactif sur feutre de carbone

2.2.1. Montage

Comme vu dans le chapitre 2, l'électrode de travail est l'anode et la contre électrode est la cathode. Les électrodes ont été connectées à un potentiostat permettant le suivi chronoampérométrique. Du fait du montage, une électrode de référence était impossible à insérer. Un fil en argent chloruré a été utilisé comme pseudo-électrode de référence et a été introduit par la tétine supérieure du côté cathodique [229] (**Figure 62**). Au niveau du compartiment cathodique se trouve une solution de ferricyanure (III) et de KCl. La présence des ions chlorures dans la solution permettent donc de réaliser une pseudo-électrode de référence avec le fil d'argent. La cathode utilisée pour catalyser la réaction de réduction du ferricyanure (III) en ferrocyanure (II) est un fil de platine dont la surface géométrique est de 2.55 cm². A l'anode, du feutre de carbone d'une surface géométrique de 10 cm² a été utilisé afin de valider le fonctionnement du bioréacteur pour la production d'électricité avec un débit d'alimentation en continu. Le compartiment anodique est rempli avec le milieu TSA-B, milieu qui, comme décrit précédemment, permet d'obtenir une quantité importante de biomasse

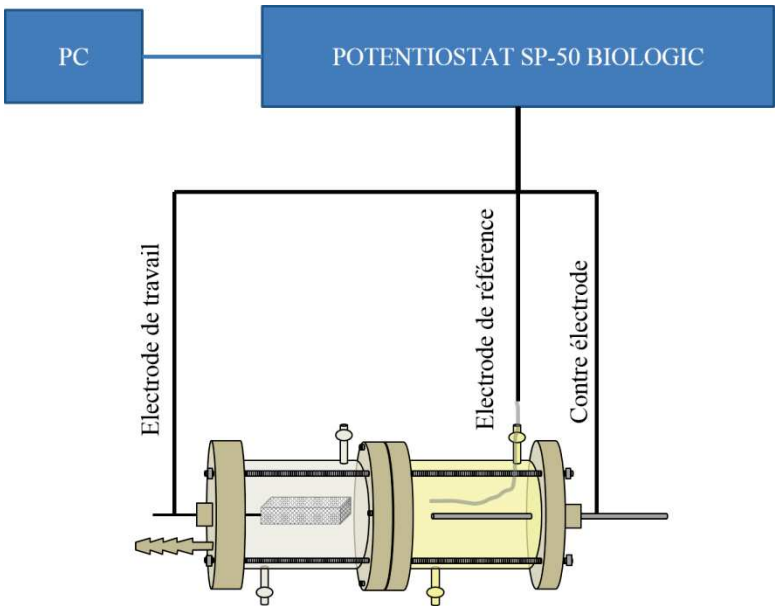


Figure 62 : *Schéma de montage du bioréacteur pour le suivi de formation d'un biofilm électroactif par chronoampérométrie.*

Pseudomonas aeruginosa dégrade le glucose par respiration aérobie, c'est-à-dire que le dernier accepteur d'électrons est l'oxygène. Il est donc important d'avoir un apport en oxygène. Cet apport s'effectue par une arrivée d'air stérile sur la côté du compartiment. Cependant, en présence d'un substrat solide accepteur d'électron, le biofilm peut utiliser le matériau d'électrode comme dernier accepteur d'électrons. L'oxygène présent peut alors être réduit et créer une réaction parasite qui ferait diminuer les performances de la biopile. C'est pourquoi, l'influence de la présence d'oxygène dans le compartiment anodique est étudiée en réalisant des tests avec une arrivée d'air stérile et sans cette arrivée.

2.2.2. Génération de courant en présence d'air

Après stérilisation de l'ensemble du système, le potentiel utilisé pour la formation du biofilm à partir de lixiviat de terreau de jardin, soit -0,246 V vs pseudo Ag/AgCl, est appliqué à l'électrode de travail et sera conservé tout au long de cet essai. Le milieu TSA-B présent dans le compartiment anodique est ensemencé avec *P. aeruginosa*. Les conditions aérobies sont assurées par une arrivée d'air stérile placée du côté anodique. Pendant les 36 premières heures, *P. aeruginosa* est cultivé en mode batch, l'objectif étant de former de la biomasse et un biofilm. Suite à cette phase en batch, une alimentation continue avec du milieu BBM est mise en place. Le suivi chronoampérométrique permettant d'observer l'évolution du courant lors de l'oxydation du glucose et donc la formation d'un biofilm électroactif est reporté en **Figure 63**.

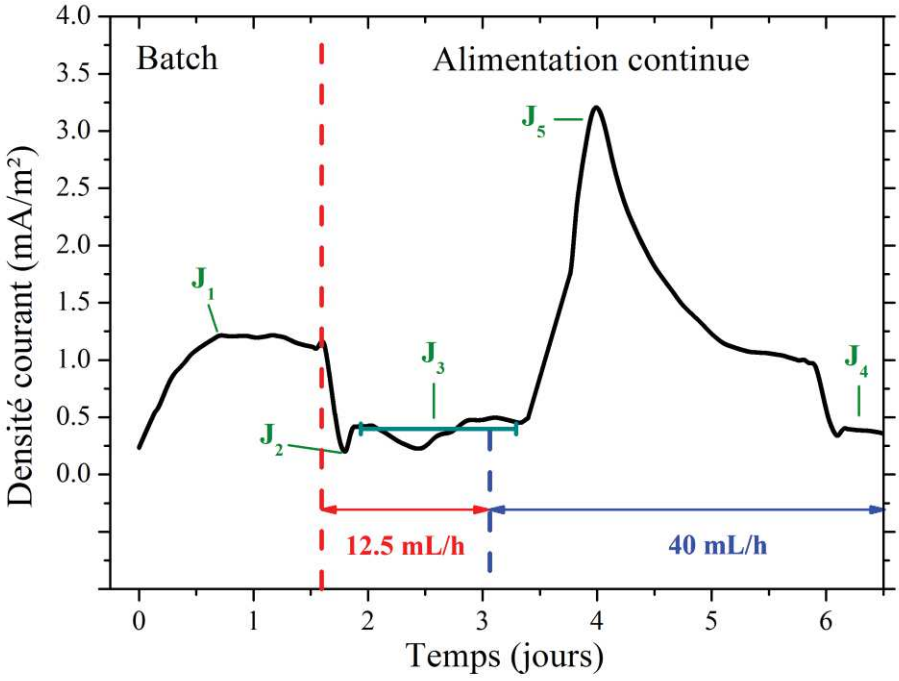


Figure 63 *: Evolution du courant en fonction du temps en présence d'air pour une polarisation à -0,246 V vs pseudo Ag/AgCl.*

Au cours de la culture en mode batch, une augmentation progressive de la densité de courant est observée pour atteindre au temps 14 h une valeur maximale de 1,25 mA/m² (J_1 pour densité de courant n°1) qui reste relativement constante durant 22 h c'est à dire jusqu'au changement de culture en mode continu. L'évolution du courant durant la phase batch est similaire à une courbe de croissance où l'augmentation de la concentration cellulaire, visible par l'apparition d'un trouble dans le compartiment anodique, atteint une phase stationnaire. Durant cette phase batch, il est difficile d'attribuer l'activité électrique uniquement à la mise en place d'un biofilm à la surface de l'anode. En effet, *P. aeruginosa* est capable de synthétiser et de sécréter des médiateurs redox comme les phénazines. Le transfert d'électrons peut donc être assuré par les cellules planctoniques et les cellules fixées à l'anode.

Au temps 36 h, un apport continu du milieu BBM dans la chambre anodique est appliqué avec un débit de 12,5 mL/h, ce qui correspond à taux d'alimentation de 0,25 h^{-1}. Ce changement de conduite et de composition de milieu génère une forte diminution de la densité de courant, qui atteint une valeur minimale de 0,23 mA/m² (J_2) après 4 h 45 de fonctionnement en alimentation continue. Cette diminution pourrait être en partie attribuée à l'élimination d'une partie des médiateurs redox, une diminution de la concentration des cellules planctoniques et/ou

une déstabilisation du biofilm. Par la suite le courant se stabilise à une densité de courant de l'ordre de 0,4 mA/m² environ (J_3). L'augmentation du taux d'alimentation d'un facteur 3,2 permet, après quatre temps de passage (un temps de passage correspond au temps théorique nécessaire pour renouveler le volume du réacteur et il correspond à l'inverse du taux d'alimentation, donc 1,25 h pour un taux d'alimentation de 0,8 h^{-1}), d'obtenir une nette augmentation de la densité de courant qui atteint une valeur maximale de 3,20 mA/m² (J_4). Cependant cette valeur reste faible par rapport à ce que l'on peut trouver dans la littérature qui est de 158 mA/m² [132]. Ce maximum atteint, le courant n'est pas maintenu, il diminue jusqu'à 0,95 mA/m² et se stabilise doucement à 0,4 mA/m² (J_5), valeur de base déjà enregistrée avec un débit de 12,5 mL/h.

Malgré l'instabilité de production d'électricité, il apparaît clairement qu'il est possible de former un biofilm électroactif avec le prototype développé. Néanmoins, la faible densité de courant maximale obtenue peut être attribuée à la conduite de l'expérience qui n'est pas optimisée.

Les performances liées à la génération d'électricité peuvent en effet être influencées par la présence d'oxygène dans le compartiment anodique puisque *P. aeruginosa* utilise l'oxygène comme dernier accepteur d'électrons au cours de l'oxydation du glucose. Il était donc important de connaître l'influence de l'apport en oxygène au sein du compartiment anodique c'est-à-dire d'évaluer l'effet de la compétition entre l'oxygène et l'anode sur les performances de la biopile.

2.2.3. Génération de courant en absence d'apport en oxygène

La réaction précédente est donc poursuivie en absence d'aération avec un milieu d'alimentation changé au jour 6,5. La polarisation à -0,246 V vs pseudo Ag/AgCl et le taux d'alimentation de 0,8 h^{-1} restent inchangés. La sécrétion de médiateurs est favorisée par la présence d'oxygène, cette configuration ne devrait donc pas favoriser la formation de médiateurs endogènes [230]. Le suivi chronoampérométrique commence au septième jour, ce qui correspond à la mise en circulation du milieu neuf (**Figure 64**).

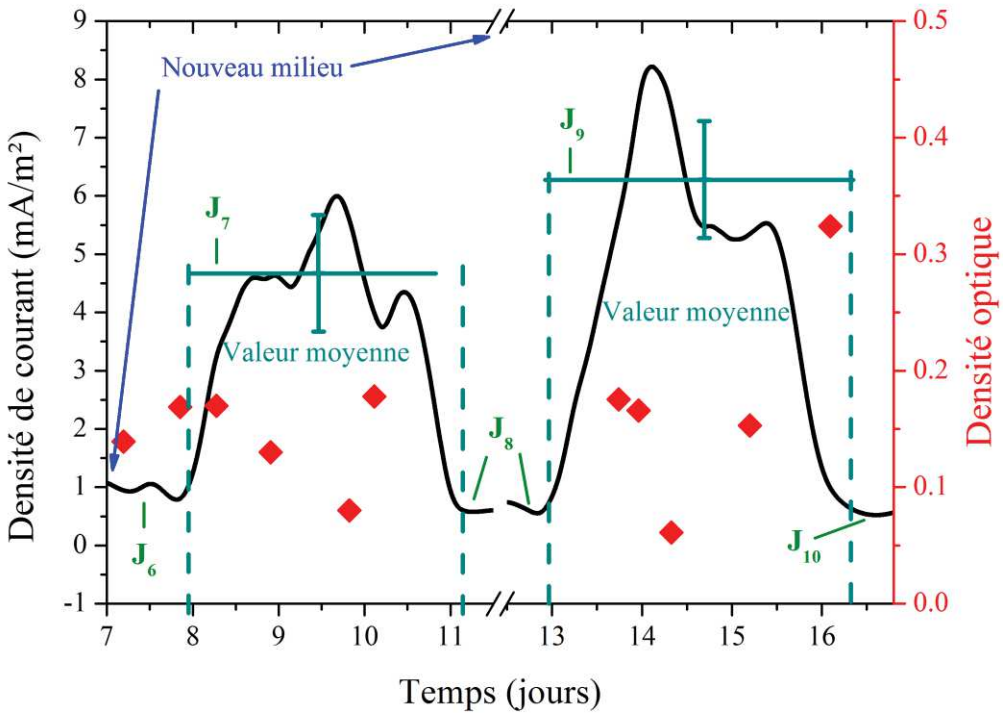


Figure 64 *: Evolution de la densité optique (rouge) et de la densité de courant (noir) produit par la biopile en absence d'apport en air, polarisée à -0,246 V vs pseudo Ag/AgCl et un débit de 40 mL/h.*

La densité de courant est tout d'abord stable à une valeur de 0,9 mA/m² (J_6) pendant 17,5 h ce qui correspond à quatorze temps de passage. Une augmentation de la densité de courant est par la suite observée jusqu'à une valeur moyenne de 4,6 mA/m² (J_7) avec une amplitude de ± 1,0 mA/m². Cette valeur, même avec l'écart type, est supérieure à la valeur obtenue précédemment lorsque de l'air était injecté dans le compartiment anodique. Après trois jours, on observe une diminution de la densité de courant jusqu'à une valeur de base de 0,6 mA/m² (J_8). Cette chute d'électroactivité est attribuée à une instabilité du biofilm puisqu'il y a toujours un apport en substrats. Le milieu d'alimentation a été remplacé à t = 11,5 jours. La période de remplacement, correspondant à un fonctionnement en batch, n'est pas représentée sur la courbe de la **Figure 64**. Lors de la reprise en alimentation continue, on observe un temps de latence de 8 temps de passage, avec une densité de courant de l'ordre de 0,6 mA/m² (J_8) correspondant à la densité de courant observée avant le changement de milieu d'alimentation. Après ces 8 temps de passage, la densité de courant augmente jusqu'à atteindre une valeur moyenne de 6,3 mA/m² (J_9) avec une amplitude de ± 1,0 mA/m². On constate une augmentation de cette valeur moyenne par rapport à la phase précédente. Après trois jours, une diminution de la densité de courant est

à nouveau observée jusqu'à atteindre la valeur de base de 0,6 mA/m² (J_{10}) mesurée précédemment. Dans les deux cas, on peut constater qu'après trois jours de fonctionnement il y a une instabilité du système. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées afin d'expliquer ces phénomènes. L'instabilité peut être liée à l'absence d'O_2 provoquant une instabilité dans le maintien de la viabilité du biofilm. En effet, la présence d'O_2 est nécessaire pour le fonctionnement de certaines réactions enzymatiques du cycle de Krebs. Néanmoins, le milieu d'alimentation étant sous agitation, il devrait assurer un apport minimum d'O_2 dissous. La deuxième hypothèse est liée à une différence de cinétique entre l'oxydation du glucose et la vitesse de diffusion du glucose au sein du biofilm. Le courant délivré, exprimé en ampère, peut être assimilé à une vitesse d'après la relation suivante (**Équation *40***) :

$$Q = \frac{I}{t}$$ **Équation 40**

Où :

Q est la charge exprimée en coulombs [C],
I l'intensité de courant en [A],
t le temps en [s].

Les pics de densité de courant observés sur la **Figure 64** sont représentatifs d'une augmentation de la cinétique de transfert des électrons. Les pentes liées à ces augmentations correspondent à la fonction dérivée de la vitesse, c'est-à-dire à l'accélération du processus. Le coefficient de diffusion du glucose dans un biofilm de *P. aeruginosa* est de l'ordre de $2{,}69 \times 10^{-6}$ cm²/s [231]. Si la cinétique de transfert d'électrons est plus rapide que la vitesse de diffusion du glucose, alors il y a un manque d'apport en glucose et donc une diminution du courant. De plus, le biofilm qui se forme à la surface de l'électrode au cours du temps devient de plus en plus épais. Cela pourrait donc expliquer ces variations de courant en raison d'une diffusion plus difficile du glucose dans le biofilm.

La mesure de densité optique en sortie de réacteur révèle la présence constante de cellules avec un niveau de base de l'ordre de 0,07 UDO. Une tendance peut cependant être dégagée. L'augmentation de la densité de courant s'accompagne d'une diminution de la densité optique dans l'effluent et inversement pour la perte d'électroactivité avec une valeur de densité optique plus importante. Ces résultats tendent à montrer que les fluctuations de densité de courant seraient liées en partie à une déstabilisation du biofilm.

Ces expériences ont été répétées trois fois, et les mêmes résultats ont été obtenus. Il apparaît donc clairement que la présence d'O_2 influe sur la production d'électricité puisque la densité de courant maximale obtenue en présence d'O_2 est de 3,20 mA/m², tandis qu'une densité de courant maximale de 6,3 mA/m² est mesurée en absence d'apport d'oxygène. Il est donc nécessaire, pour produire du courant électrique, de travailler en conditions anaérobies.

Afin de caractériser la morphologie du biofilm présent sur l'anode, une analyse par Microscopie Electronique à Balayage (MEB) a été réalisée.

2.2.4. Microscopie électronique à balayage

En fin d'expérience, l'anode est récupérée et le biofilm est immédiatement fixé suivant le protocole décrit dans le chapitre 2. Les images obtenues par MEB sont rassemblées en **Figure 65**.

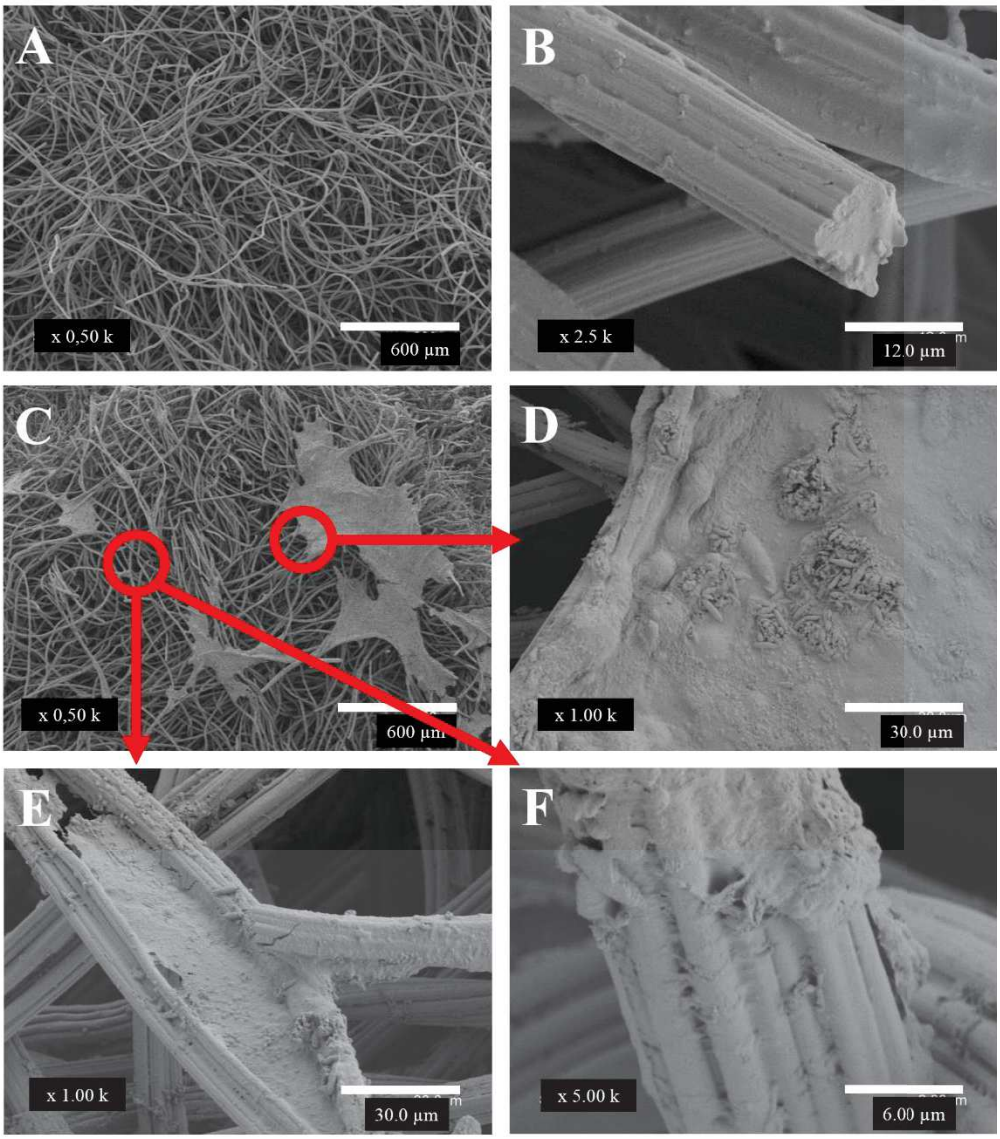


Figure 65 : *Images MEB de l'électrode de feutre de carbone sans biofilm à un grandissement x500 (A) et x2500 (B) et du feutre de carbone avec le biofilm a des grandissements de x500 (C), x1000 (D), x1000 (E) et x5000 (F).*

Une électrode en feutre de carbone sans biofilm est utilisée comme référence (photos A et B) et permet d'observer des fibres de carbone non alignées dont le diamètre est de l'ordre de 6 µm. Le feutre de carbone présente une microporosité, laissant ainsi la possibilité aux bactéries de coloniser les espaces interstitiels des fibres.

L'analyse de l'électrode utilisée dans la biopile révèle une formation non homogène du biofilm à sa surface (photo C). Des grandissements ont été réalisés à la fois sur une zone couverte d'un voile d'exopolymère (photo D) et sur une zone dépourvue de biofilm apparent (photos E et F). La photo D permet de montrer l'existence d'un voile d'exopolymère uniforme à la surface des fibres de carbone avec la présence de bactéries sous forme d'amas plus ou moins

engluées dans l'exopolymère. La taille apparente des bacilles observés correspond aux dimensions moyennes relevées pour *P. aeruginosa*, 2 à 5 µm de long sur 0,5 à 1 µm de large.

La deuxième zone analysée, sans voile apparent, a été observée avec un grandissement de x1000 (photo E). Ce grandissement met en évidence la présence d'exopolymères entre les fibres de carbone et la présence de bactéries réparties de façon éparse sur le voile d'exopolymères qui recouvre les fibres de carbone. Le grandissement à x5000, permet de mieux apprécier la colonisation des bactéries à la surface d'une fibre de carbone (photo F).

Si la zone analysée par MEB (photo C) reflète l'ensemble de la surface de l'anode, la matrice d'exopolymères sous forme de voile ne recouvrirait que 25 % de la surface de l'électrode. Cette matrice, peu dense en bactéries, est toutefois présente à la surface des fibres de carbone. Une occupation plus importante de l'espace par le biofilm permettrait d'augmenter les performances de la biopile. Il serait donc intéresser de laisser le biofilm se former sur des temps plus longs.

2.3. Résultats et discussion

Il a été montré, à partir des résultats précédents, que ce bioréacteur permet le développement d'un biofilm électroactif à la surface d'une anode. Il a également été démontré que le système permet d'avoir un flux continu dans le compartiment anodique ce qui permet d'avoir un apport en substrats constant au cours du temps et de s'affranchir des ajouts répétés et irréguliers en substrat comme dans le cas du chapitre précédent. Quand de l'air stérile est apporté au niveau de l'anode, les performances électriques de la biopile sont diminuées d'un facteur deux. Pour la suite des expériences, la réaction se fera donc sans apport d'air.

Néanmoins, les densités de courant obtenues restent très faibles lorsqu'elles sont comparées à celles relevées dans la littérature [132]. Ceci peut s'expliquer par des conditions de culture de *P. aeruginosa* différentes. Par exemple, dans les travaux de Liu et al. [132], la biopile fonctionne en batch avec une souche pure, *P. aeruginosa*, et avec un milieu de culture complexe contenant de l'extrait de levure. De plus, le biofilm utilisé pour leurs expériences est déjà adapté puisqu'il correspond à un biofilm électroactif provenant d'une biopile en fonctionnement.

3. Conclusions

Ce chapitre s'est focalisé sur la conception et le développement d'un bioréacteur capable d'héberger un biofilm électroactif avec un mode d'alimentation continue. Ce bioréacteur permet notamment une alimentation continue en milieu nutritif permettant ainsi de s'affranchir d'ajout ponctuel de substrat. De plus, de par sa conception, il permet de travailler en conditions stériles dans le but de former un biofilm uniquement constitué d'un seul type de microorganismes.

Il est désormais nécessaire de tester les performances de l'électrode SSF/(PEI/rGO)5 développée précédemment sur la formation du biofilm et son électroactivité en déterminant, notamment, la valeur de polarisation optimale et le débit d'alimentation à appliquer. Ainsi, la puissance et la résistance interne du système seront également étudiées à différents stades de l'expérimentation afin d'évaluer l'influence de ces paramètres.

Indépendamment de sa géométrie, le bioréacteur doit également permettre le suivi de l'évolution de la biomasse planctonique par lecture de la densité optique (DO) en sortie du bioréacteur et la variation du pH entre l'entrée et la sortie du bioréacteur, témoignant d'une activité métabolique. L'ensemble de ces paramètres sera analysé en fonction de la production de courant.

CHAPITRE 5 :

FORMATION ET OPTIMISATION D'UN BIOFILM ELECTROACTIF DANS LE BIOREACTEUR

Chapitre 5 : Formation et optimisation d'un biofilm électroactif dans le bioréacteur

Dans cette partie du travail, l'électrode d'acier inoxydable, modifiée avec de l'oxyde de graphène réduit (SSF/(PEI/rGO)$_5$), présentée dans le chapitre 3, est utilisée dans le bioréacteur développé précédemment. L'objectif est d'optimiser les conditions de formation du biofilm électroactif. La fixation de l'électrode dans le compartiment sera dans un premier temps présentée. Dans un second temps, les conditions de formation du biofilm électroactif seront évaluées. Différentes configurations seront testées comme la polarisation au niveau de l'anode ainsi que la configuration en circuit fermé sur résistance externe. Dans une troisième partie, la vitesse d'alimentation en milieu nutritif sera étudiée. Pour cela, différentes grandeurs comme la densité de courant mesurée *in situ*, la concentration de la biomasse sous forme planctonique, la concentration du glucose en sortie du compartiment anodique et la variation du pH entre l'entrée et la sortie du bioréacteur seront analysés en fonction du débit d'alimentation.

1. Fixation électrode

L'anode utilisée est constituée d'une mousse d'acier inoxydable, de 1 mm d'épaisseur et de surface géométrique de 10 cm², dont la surface a été modifiée avec du graphène : SSF/(PEI/rGO)$_5$. Cette électrode doit ensuite être fixée dans le compartiment anodique.

La fixation de l'électrode dans le bioréacteur joue un rôle essentiel dans les performances de la biopile. Il faut que la connexion entre le fil de titane et l'électrode résiste à la stérilisation. Deux colles conductrices et résistantes à de hautes températures ont été sélectionnées dans un premier temps. Les deux types de colles sélectionnées sont : une colle d'argent (Duralco™ 120, Cotronics) résistante à 260 °C et dont la résistivité est de 8×10^{-5} Ω.cm et une colle à base de graphite (Duralco™ 127, Cotronics) résistante à 200 °C et dont la résistivité est de 2×10^{-2} Ω.cm.

Ces deux colles ont été testées sur deux électrodes avec un fil de titane. Les deux électrodes sont séchées pendant 48 h une fois le fil de titane collé à l'extrémité de l'anode. La résistance entre l'extrémité du fil de titane et l'électrode SSF/(PEI/rGO)$_5$ doit être la plus petite

possible afin de ne pas créer un comportement résistif. La résistance des électrodes a été évaluée comme présenté en **Figure 66**.

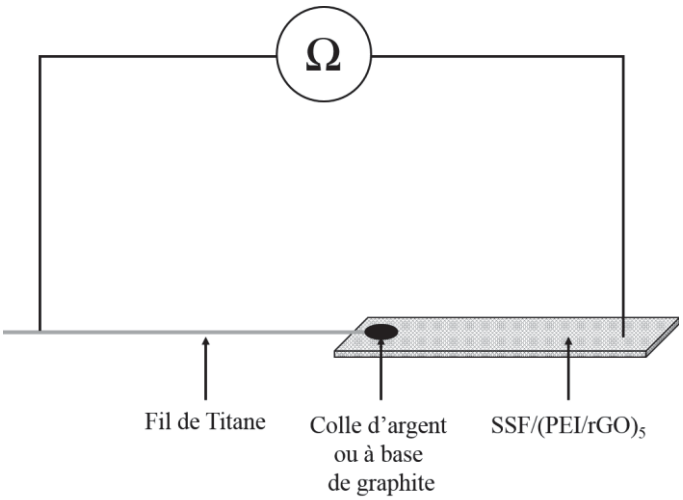


Figure 66 *: Schéma de montage pour déterminer la résistance entre l'électrode et le fil en titane.*

La résistance de l'électrode est de 0,9 Ω. Lorsque le fil de titane est collé à l'électrode, les résistances du système {fil de titane + colle + électrode) sont de 1,5 Ω avec la colle d'argent et de 1 Ω avec la colle à base de graphite. Les colles utilisées permettent donc un bon transport électronique. Ces deux électrodes ont par la suite été stérilisées dans du milieu TSA-B dans des conditions similaires à celles du bioréacteur. Les milieux ont ensuite été inoculés avec *P. aeruginosa* afin de vérifier l'absence d'effet antibactérien de ces matériaux. Après 96 h, un trouble est observé dans tous les erlens validant ainsi la biocompatibilité des matériaux choisis. Les électrodes sont ensuite décontaminées par stérilisation à 120 °C pendant 15 min. Les résistances liées aux électrodes ont de nouveau été évaluées. Il apparaît alors que la colle d'argent s'est effritée et que le fil ne tient plus à l'électrode. L'opération a été répétée trois fois, et dans chaque cas le résultat était le même. La colle d'argent, sensible aux barèmes de stérilisation ou à l'activité microbienne, a par conséquent été abandonnée. Pour la colle à base de graphite, le fil de titane est toujours resté collé à l'électrode. La résistance entre le fil et le côté opposé de l'électrode après décontamination est de 1,8 MΩ. Cette valeur, très élevée, peut être liée à différents paramètres tels que la présence d'un biofilm non conducteur à la surface de l'électrode ou aux conditions de stérilisation en autoclave. Dans le but de vérifier cette hypothèse, deux électrodes avec de la colle à base de graphite ont été autoclavées. La première dans de l'eau stérile et la deuxième dans du papier aluminium ce qui permet de limiter l'humidité, afin de tester l'influence de la stérilisation par autoclave sur le comportement résistif

de la colle. La résistance obtenue dans le cas de la stérilisation dans de l'eau distillée est de 1,9 MΩ et dans le cas du papier aluminium est de 1,8 MΩ. L'importante résistivité est donc due à la stérilisation par autoclavage. La stérilisation en condition humide fait perdre à la colle à base de graphite sa conductivité.

La fixation de l'électrode avec de la colle a donc été abandonnée, et doit se faire par simple contact. Une solution possible est de placer une tige conductrice directement dans la mousse d'acier inoxydable. Pour cela, une mousse d'acier inoxydable plus épaisse doit être utilisée. Les dimensions de l'électrode choisies sont donc de 0,6 cm d'épaisseur, 1,2 cm de largeur et 3,1 cm de longueur, ce qui correspond à une surface géométrique de 12,98 cm². Un trou d'un diamètre de 0,3 cm a été fait dans la largeur de l'électrode afin de placer une tige de 0,4 cm de diamètre. Le trou est légèrement inférieur au diamètre de la tige afin que celle-ci ne puisse pas bouger et avoir un meilleur contact avec l'électrode. La tige est en acier inoxydable, permettant ainsi de ne pas créer de demi-pile supplémentaire dans le montage et d'éviter la corrosion. La résistance de l'électrode est de 0,9 Ω et la résistance de l'électrode avec la tige reste de 0,9 Ω. C'est donc ce système qui a été choisi pour la suite des expériences.

Afin d'optimiser les conditions de formation d'un biofilm électroactif à la surface de l'anode, différentes configurations ont été testées : la polarisation et le circuit fermé sur une résistance externe.

2. Détermination des conditions de formation d'un biofilm électroactif par polarisation

2.1. Evaluation de la configuration sur la densité de courant

Il a été vu dans le chapitre 3 que pour former un biofilm électroactif à partir de lixiviat de terreau, un potentiel négatif devait être imposé à l'électrode de travail. Il est néanmoins nécessaire de déterminer la valeur de potentiel optimale dans le cas d'une souche pure. Dans l'étude réalisée par J. Liu et al [132], un biofilm électroactif a pu être formé en fermant le circuit de la biopile avec une résistance externe de 1,96 kΩ entre les électrodes. Lors de cette même étude, deux électrodes à base de feutre de carbone ont été comparées : la première est constituée de feutre de carbone et la deuxième est composée de feutre de carbone dont la surface a été

modifiée avec du graphène. Les densités de courants maximales respectivement obtenues sont de 15,8 µA/cm² (158 mA/m²) et de 24,5 µA/cm² (245 mA/m²).

Il serait donc intéressant de comparer les performances obtenues lorsque l'électrode de travail est polarisée et lorsque la biopile est branchée sur une résistance externe. Ainsi, différentes valeurs de potentiel ont été imposées ainsi qu'une configuration en circuit fermé avec une résistance externe de 1 kΩ.

A l'anode, un fil d'argent, permettant de réaliser une pseudo-électrode de référence, a été placé en parallèle de l'anode SSF/(PEI/rGO)$_5$ (par l'entrée de gaz désormais condamnée). Dans le compartiment cathodique, un fil de platine est introduit et est immergé dans une solution de ferricyanure et de KCl. Le blanc est réalisé pour une polarisation à -0,246 V vs pseudo Ag/AgCl avant inoculation de *P. aeruginosa*.

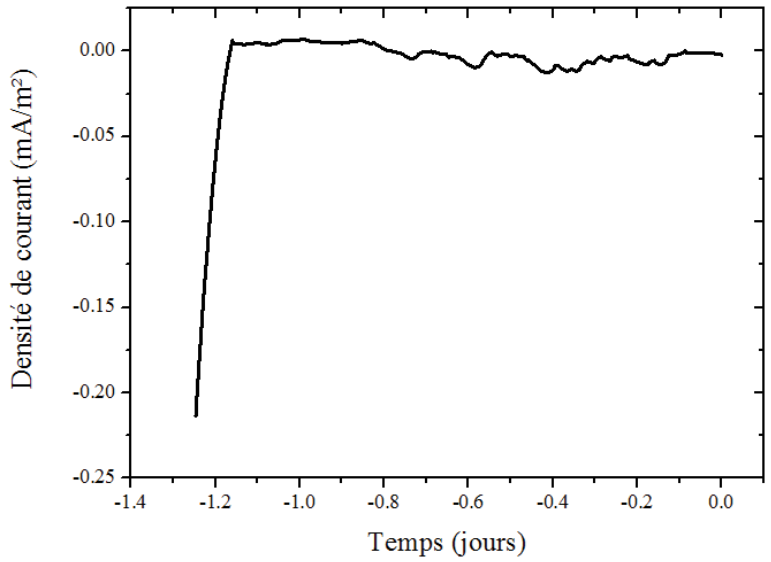


***Figure 67** : Chronoampérométrie de la biopile à -0,246 V vs pseudo Ag/AgCl en absence de microorganismes.*

Sur la **Figure 67**, on peut observer l'évolution de la densité de courant en fonction du temps avant inoculation. L'échelle de temps est négative indiquant que la polarisation a eu lieu avant inoculation de *P. aeruginosa*, qui est réalisée à t = 0 jour. On peut constater un courant nul pendant une demi-journée suivi d'un courant légèrement négatif de l'ordre de -10 µA/m². Ce courant négatif peut être attribué à des réactions de réduction liées à la composition du milieu et au potentiel appliqué.

Un fonctionnement en mode batch est dans un premier temps choisi afin de favoriser la croissance de *P. aeruginosa* et la formation du biofilm. L'anode et la cathode sont reliées par

une résistance externe de 1 kΩ. Après 24 h, le compartiment anodique est alimenté en milieu BBM à un débit de 20 mL/h. Le taux d'alimentation associé à ce débit est de 0,4 h^{-1}, ce qui est inférieur au taux de croissance maximal de *P. aeruginosa* permettant ainsi l'adaptation de *P. aeruginosa* au nouveau milieu. Au bout de 20 h, le débit est augmenté à 40 mL/h (correspondant à un taux d'alimentation de 0,8 h^{-1}, et donc équivalent au taux de croissance maximal de *P. aeruginosa* dans des conditions aérobies). L'évolution de la densité de courant lorsque la biopile est connectée à une résistance externe est représentée en **Figure 68**.

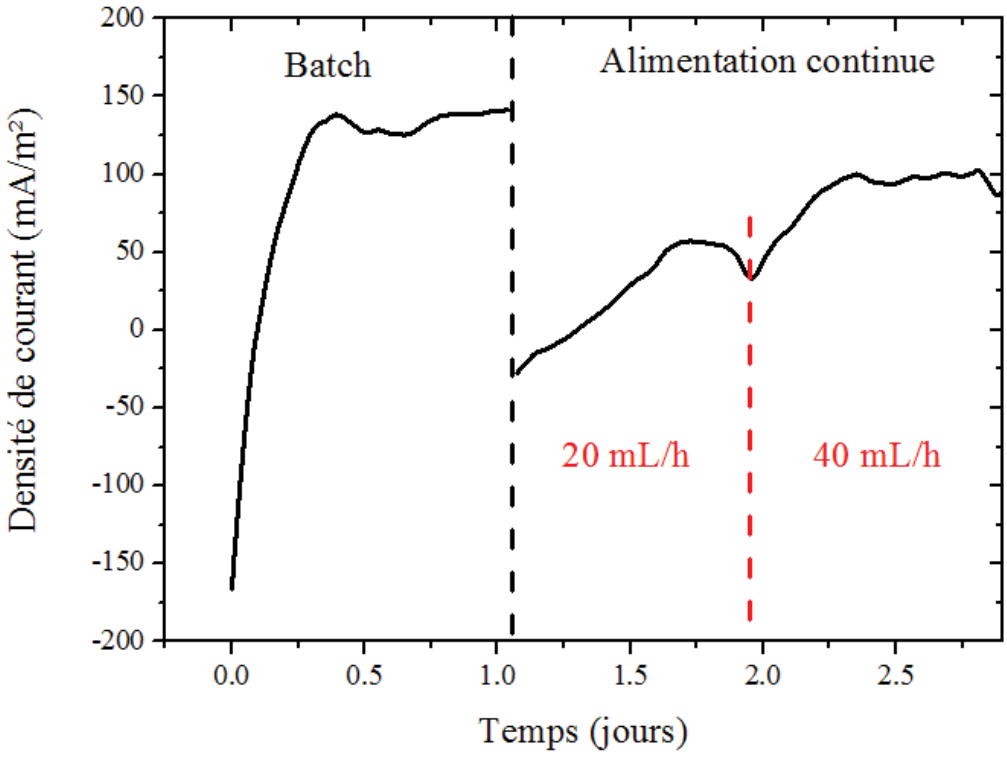


Figure 68 *: Evolution de la densité de courant en batch et en alimentation continue lorsque la biopile est branchée sur une résistance externe de 1 kΩ.*

Durant les six premières heures, la densité de courant augmente de façon rapide et linéaire jusqu'à un maximum de 137 mA/m². A la suite de cette augmentation, la densité de courant atteint un plateau dont la valeur moyenne est de 140 mA/m² jusqu'à la fin du batch (24 h). Ce comportement, déjà observé avec le feutre de carbone, serait lié à l'activité catalytique des cellules en suspensions, par l'intermédiaire de médiateurs redox, et adhérées à la surface de l'électrode. Suite à cette croissance en milieu riche, un taux de dilution de 0,4 h^{-1} a été imposé afin de remplacer ce milieu par un milieu minimum de BBM. On constate, lorsque l'alimentation est mise en place, une chute immédiate et brutale du courant à -27 mA/m². Cette forte différence peut s'expliquer par l'introduction d'un nouveau milieu, et donc d'une

perturbation du système, ce qui semble montrer que le courant enregistré est dépendant d'une molécule présente dans le milieu de culture. Ce comportement est typique d'un courant médié, ce qui n'est pas étonnant puisque *P. aeruginosa* sécrète des phénazines qui sont des médiateurs redox [84], [86]. La densité de courant augmente de façon linéaire durant les 17 h suivant la mise en circulation du milieu BBM jusqu'à un maximum de 57 mA/m². Cette valeur est conservée pendant 3 h avant de diminuer. Ce taux d'alimentation est inférieur au taux de croissance maximal de *P. aeruginosa,* il y a donc la présence de microorganismes en suspensions qui consomment du glucose sans pour autant transférer ses électrons à l'anode, ce qui peut expliquer cette diminution de courant. Le débit d'alimentation est donc augmenté d'un facteur deux (taux d'alimentation de 0,8 h^{-1}) afin de stabiliser la croissance des bactéries sous formes libres en se plaçant au taux de croissance de *P. aeruginosa*.

On observe une augmentation du courant jusqu'à 100 mA/m² à t = 2,3 jours, soit une densité de courant pratiquement deux fois plus importante. Cette valeur est maintenue pendant 14 h jusqu'à t = 2,9 jours. On peut donc constater que le système se stabilise lorsque le taux d'alimentation correspond au taux de croissance.

Il apparait clairement que la vitesse d'apport des substrats a une influence directe sur la production de courant issue de l'oxydation du glucose par *P. aeruginosa*. On a également pu constater une réponse rapide du système lors de la mise en place de l'alimentation, ce qui corrobore la participation de médiateur au transfert d'électrons. Il en est de même pour le changement de vitesse d'alimentation puisque le courant a immédiatement augmenté.

A la suite de la configuration sur résistance externe, différentes valeurs de polarisation ont été testées, aussi bien positives que négatives. Les valeurs positives testées (+0,446 V, +0,346 V, +0,246 V et +0,146 V vs pseudo Ag/AgCl) ont révélé une densité de courant nulle. Des valeurs négatives de polarisation ont ensuite été testées. Les valeurs maximales de densité de courant ont été reportées pour un taux d'alimentation de 0,8 h^{-1} sur le graphe suivant (**Figure 69**) et ont été comparées avec la valeur obtenue dans les mêmes conditions mais avec la résistance externe. La cathode utilisée n'est pas limitante par rapport à la cathode.

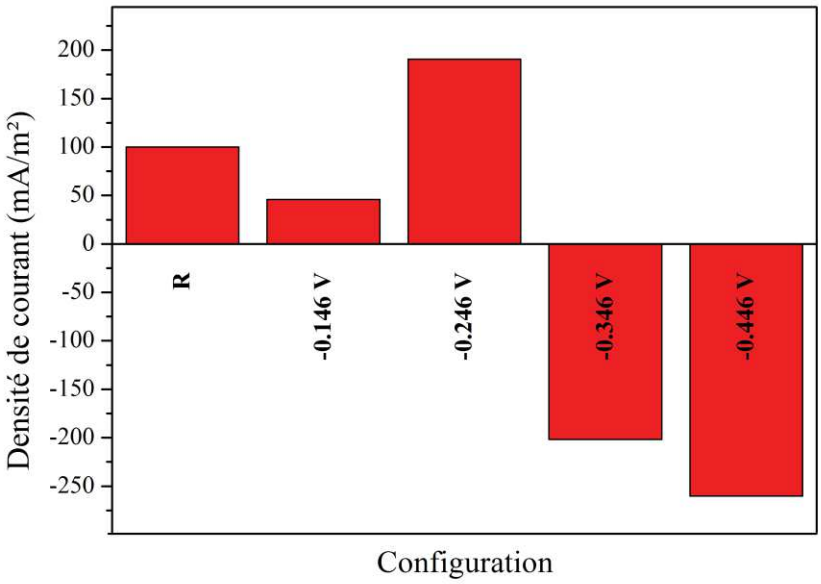


Figure 69 *: Evolution de la densité de courant en fonction de la configuration de la biopile et pour un taux d'alimentation de 0,8 h^{-1}.*

D'après la **Figure 69**, la valeur du potentiel appliqué à l'anode a une influence réelle sur les densités de courant obtenues. Lorsqu'un potentiel de -0,146 V (vs pseudo Ag/AgCl) est appliqué, une densité de courant de 46 mA/m² est générée. Cette valeur est inférieure à la densité de courant lorsque la biopile est en circuit fermé avec une résistance. Une polarisation à -0,246 V (vs pseudo Ag/AgCl) implique une augmentation de la densité de courant jusqu'à 191 mA/m². Cependant, lorsque le potentiel est imposé à des valeurs plus négatives, les densités de courant se révèlent être négatives : -202 mA/m² pour un potentiel de -0,346 V et -260 mA/m² pour un potentiel de -0,446 V. Ces valeurs négatives montrent un courant de réduction qui peut être lié à la réduction d'espèces en solution comme l'oxygène dissous, un médiateur produit par *P. aeruginosa* ou un changement de la nature du biofilm inhibant le transfert d'électrons du biofilm à la surface de l'électrode.

Dans le but de déterminer si cet état est définitif, à la suite de la polarisation à -0,446 V vs pseudo Ag/AgCl, l'anode a de nouveau été polarisée à -0,246 V vs Ag/AgCl puis a ensuite été branchée sur résistance externe (**Figure 70**). Les essais lors de la première configuration sont nommés « *essai 1* » et lors de la seconde fois « *essai 2* ».

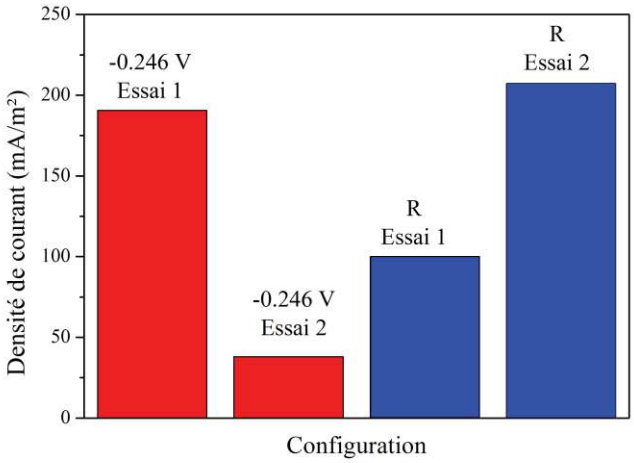


***Figure 70**: Comparaison de la densité de courant entre le premier et le deuxième essai de polarisation à -0,246 V vs pseudo Ag/AgCl et sur résistance externe et pour un taux d'alimentation de 0,8 h^{-1}.*

Il est intéressant de noter que lorsque le potentiel appliqué est de nouveau de -0,246 V (vs pseudo Ag/AgCl), la densité de courant redevient positive avec une intensité surfacique de 38 mA/m². Il en est de même lorsque la biopile est branchée sur résistance externe (1 kΩ) où la densité de courant est de 207 mA/m². Ainsi, le courant de réduction observé lors des polarisations à -0.346 V et -0.446 V ne constituent pas un état définitif du biofilm puisqu'il est possible de rétablir le courant d'oxydation en remettant un potentiel de polarisation de -0.246 V (vs pseudo Ag/AgCl). Toutefois, on peut noter que pour un potentiel de -0,246 V vs pseudo Ag/AgCl, la densité de courant est cinq fois inférieure à la valeur obtenue la première fois. Le comportement inverse est néanmoins observé lorsque la biopile est à nouveau branchée sur la résistance puisque la densité de courant est cette fois-ci deux fois supérieure à la première valeur pour la même configuration. La polarisation au niveau de l'anode permet de favoriser les échanges d'électrons entre le biofilm et l'anode et donc d'augmenter la production d'électricité.

L'électroactivité du biofilm a aussi été caractérisée par voltammétrie cyclique (VC) afin d'explorer ces hypothèses.

2.2. Voltammétrie cyclique

La voltammétrie cyclique permet de déterminer l'activité catalytique d'oxydo-réduction du biofilm. En conséquence, des VC sont réalisées à la fin de chaque configuration du système

et sont comparées entre elles (**Figure 71**). Pour chaque courbe de voltammétrie, l'alimentation en substrat a été arrêtée (afin de ne pas avoir d'interférences liées au flux à proximité de la surface de l'électrode) et la polarisation a été également stoppée.

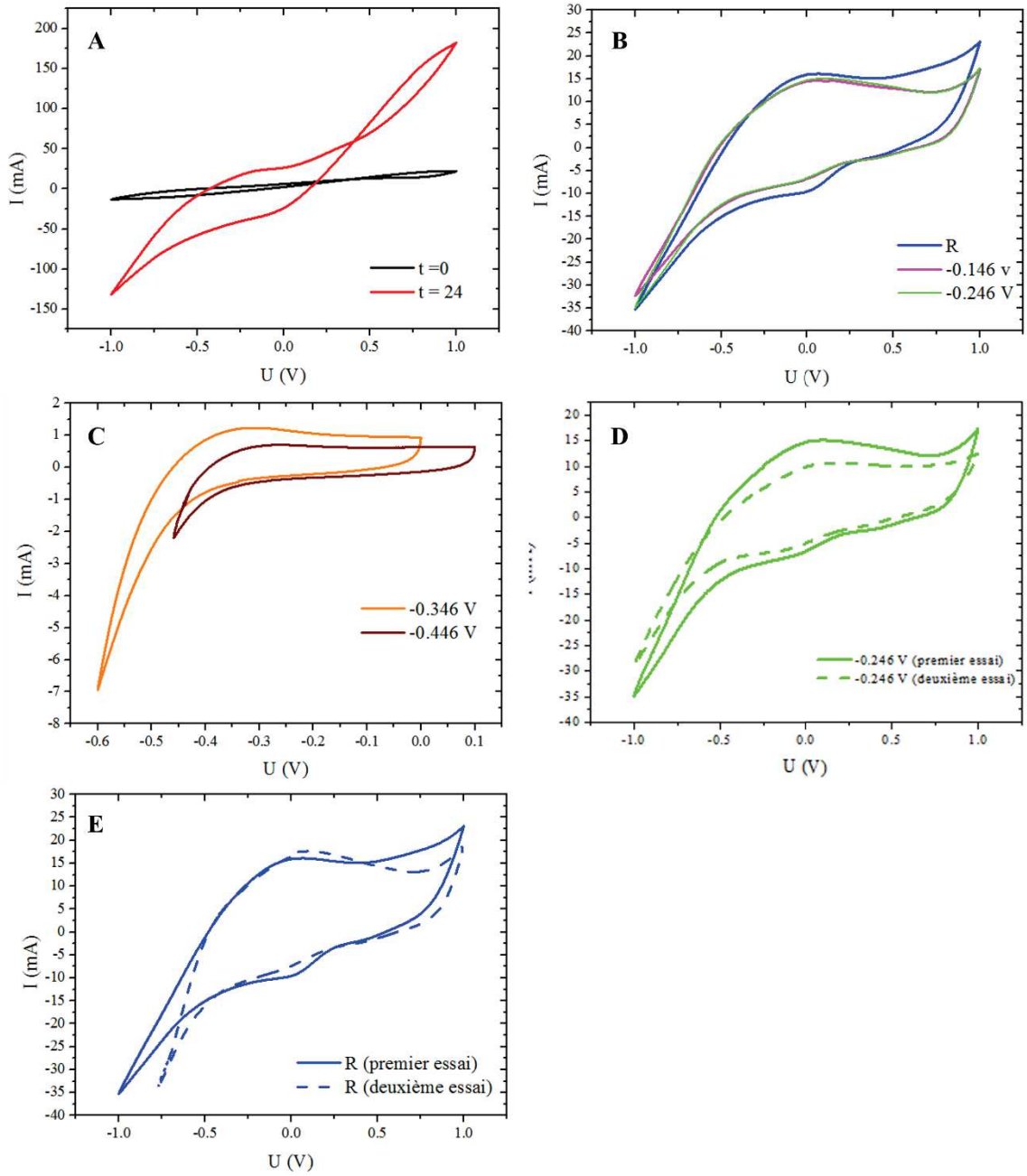


Figure 71 *: Voltammétries cycliques à 20 mV/s vs pseudo Ag/AgCl (A) avant ensemencement et 24 h après sur résistance externe (1 kΩ), (B) comparaison entre le montage sur résistance externe et les polarisations à -0,146 V et -0,246 V, (C) comparaison des polarisations à -0,346 V et -0,446 V, (D) comparaison des polarisations à -0,246 V entre la première et la deuxième fois, (E) comparaison en montage sur résistance entre la première et la deuxième fois.*

Les voltammogrammes de la **Figure 71.A** caractérisent l'électrode avant ensemencement (t = 0 h) et 24 h après ensemencement en milieu TSA-B (t = 24h). En absence de microorganismes, aucun pic d'oxydation et de réduction n'est observable. Ceci indique que l'électrode sans biofilm ne peut pas catalyser l'oxydation du glucose présent en solution. Après 24 h de croissance, un pic d'oxydation se forme à un potentiel de -0,146 V vs pseudo Ag/AgCl. Il indique une activité métabolique de *P. aeruginosa* sur l'oxydation du glucose. Cependant, la réponse électrochimique obtenue n'est pas clairement définie (effet catalytique en raison de la vitesse de balayage) et il est impossible de conclure sur la présence d'un biofilm à la surface de l'électrode. Cette oxydation peut résulter de l'électroactivité des bactéries en suspension dans le milieu. En effet, des bactéries en suspension à proximité de l'électrode peuvent oxyder le glucose du milieu nutritif et échanger les électrons avec l'électrode soit par l'intermédiaire de médiateurs soit par contact sans pour autant qu'un biofilm soit formé.

La **Figure 71.B** compare les différentes configurations testées précédemment : en circuit fermé sur résistance externe (1 kΩ) et polarisations à -0,146 V et -0,246 V. Les trois voltammogrammes présentent des comportements similaires, à savoir un pic d'oxydation défini à un potentiel de 0 V et un pic de réduction moins important situé également à un potentiel de 0 V. La différence dans les hauteurs de pic traduit une différence de quantité de matière oxydée et réduite. On peut noter que le pic de réduction, lorsque la biopile est branchée sur résistance, est légèrement plus important que lorsqu'un potentiel est appliqué.

Les voltammogrammes de la **Figure 71.C** correspondent aux polarisations à -0,346 V et -0,446 V. Les gammes de balayage de potentiels pour ces valeurs de polarisation ont dû être réduites en raison d'une instabilité du signal pour de hautes valeurs de potentiels positifs et trop négatifs. Les gammes sélectionnées sont comprises entre -0,6 V et 0 V pour la polarisation à -0,346 V et entre -0,45 V et +0,1 V pour la polarisation à -0,446 V. Néanmoins, on peut observer que les pics d'oxydation sont nettement inférieurs aux systèmes précédents avec des hauteurs de pic de 0,2 mA (polarisation -0,346 V) et 0,13 mA (polarisation -0,446 V).

Enfin des voltammétries cycliques ont été réalisées lorsque les configurations à -0,246 V et sur résistance externe ont de nouveau été appliquées. Ces VC ont été comparées avec les résultats obtenus lors du premier essai. Dans le cas de la polarisation à -0,246 V, on peut voir sur la **Figure 71.D** que la capacitance est différente de celle obtenue la première fois. De même, les pics d'oxydations sont moins importants : 1 mA contre 2,91 mA lors de la première polarisation. Cette diminution corrobore la diminution de densité de courant observée sur la **Figure 69**. Il y a une perte d'électroactivité du biofilm. Concernant les voltammogrammes pour

le branchement sur la résistance externe lors du premier et du deuxième essai, on observe le comportement inverse (**Figure 71.E**). Le pic lié à l'oxydation du glucose est plus important lorsque le système est replacé en circuit fermé avec une résistance (après les différents essais de polarisation) qu'avant les différents essais de polarisation. Le courant d'oxydation est désormais de 5,13 mA contre 1,26 mA avant. De surcroît, le courant de réduction est inférieur ce qui pourrait expliquer la densité de courant plus importante obtenue dans le deuxième cas.

Pour toutes les VC réalisées en présence d'un biofilm, on note la présence récurrente de deux pics de réduction : le premier à un potentiel de 0 V et le deuxième, plus faible, à +0,44 V. Ces pics sont attribués à l'oxydo-réduction de la pyocyanine et de la phenazine-1-carboxamide [55], [85], [86] démontrant ainsi la sécrétion de médiateurs par *P. aeruginosa*.

L'évolution de la puissance délivrée suite aux différentes configurations a été évaluée.

2.3. Puissance délivrée en fonction de la configuration choisie

Pour réaliser les courbes de puissances, l'alimentation en substrat a été arrêtée afin d'obtenir une stabilisation électrochimique plus rapide du système. Les courbes de puissances ainsi que les courbes intensité-potentiel ont été tracées pour les essais des différentes configurations mais seules les courbes correspondant à la configuration à -0.146 V sont représentées en **Figure 72**, les autres se trouvent en **Annexe (Figure 79)**.

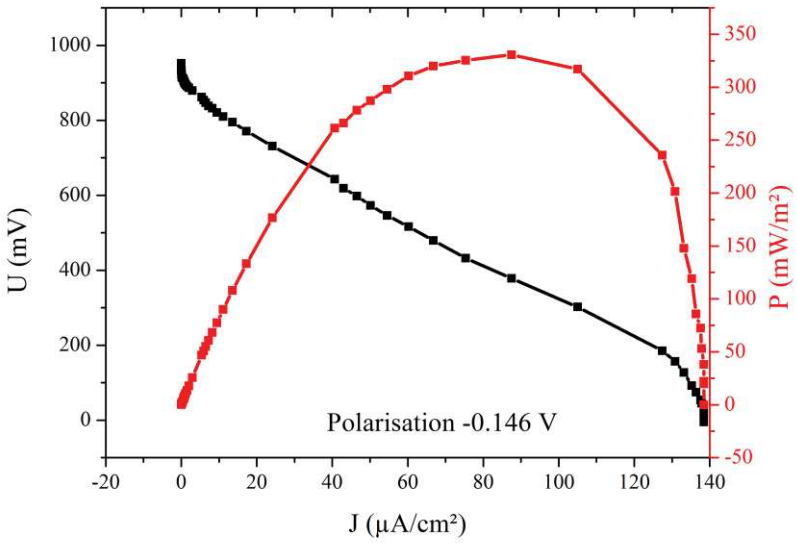


***Figure 72** : Courbes caractéristiques de puissance et de polarisation pour la polarisation à -0,146 V et à débit nul.*

Les courbes de puissance et de polarisation (f(J) = U) présentent une allure similaire (de type gaussienne) quelle que soit la configuration, à savoir une augmentation de la puissance surfacique délivrée jusqu'à un maximum dans un premier temps suivie d'une diminution jusqu'à une puissance nulle. Il en est de même pour les courbes intensité-potentiel avec le potentiel qui diminue avec l'augmentation de la densité de courant. A partir de ces courbes, différentes grandeurs caractéristiques de la biopile sont extraites (comme expliqué dans le chapitre 2) : le potentiel à circuit ouvert (OCV), la densité de courant en court-circuit (I_{cc}) correspondant à une configuration du système où l'anode et la cathode sont connectées sans résistance, la puissance maximale (P_{max}) délivrée par la biopile et la résistance interne du système. La résistance interne peut être calculée à partir de la courbe de puissance en fonction de la densité de courant selon l'équation (**Équation 41**) du chapitre 2 :

$$R_{int} = \frac{P_{max}}{I^2} \qquad \textbf{Équation 41}$$

Où :

R_{int} est la résistance interne du système en [Ω],

P_{max} est la puissance maximale exprimée en [W],

I le courant associé à la puissance maximale en [A].

Les valeurs d'OCV et de résistance interne en fonction de la configuration de la biopile et du temps sont reportées dans le **Tableau 12.**

Configuration		**Temps**	**OCV**	**R_{INT}**
		Heures	**mV**	**Ω**
T = 0 h (R)	***Batch***	0	150,3	43333,3
T = 24 h (R)	***Batch***	24	155,4	168,91
Résistance	***Alimentation***	72	307	4574,4
-0,146 V	***Alimentation***	278,4	374	600
-0,246 V	***Alimentation***	396	482	1133,1
-0,346 V	***Alimentation***	477,6	520	1598,3
-0,446 V	***Alimentation***	547,2	712	2325,3
-0,246 V essai 2	***Alimentation***	568,8	490	1789,6
Résistance essai2	***Alimentation***	616.8	312,2	3411,9

Tableau 12 *: Grandeurs caractéristiques issues des courbes de puissances et de polarisation pour les différentes configurations.*

D'après le **Tableau 12**, le potentiel à circuit ouvert (OCV) avant l'inoculation de *P. aeruginosa* est de 150,3 mV. Après 24 h de croissance, l'OCV augmente légèrement à 155,4 mV. Au troisième jour de l'expérience, à la fin de la mesure sous résistance, l'OCV augmente jusqu'à 307 mV. Cette augmentation confirme la présence d'une activité catalytique liée aux microorganismes. Après qu'un potentiel de -0,146 V a été appliqué, l'OCV passe à 374 mV. Il en est de même après l'application d'un potentiel de -0,246 V, la valeur de l'OCV continue d'augmenter jusqu'à 482 mV. L'OCV continue son augmentation après application des potentiels -0,346 V et -0,446 V avec des valeurs respectives de 520 mV et 712 mV. Le potentiel a ensuite été de nouveau imposé à -0,246 V, et la valeur de l'OCV retombe à 490 mV, valeur concordante avec celle obtenue précédemment. Le même phénomène est observé lorsque la biopile est de nouveau placée sur résistance avec une valeur de 312,2 mV (similaire à la première valeur obtenue sur résistance de 307 mV). L'OCV est directement liée au potentiel appliqué. L'OCV est régit par la loi de Nernst (**Équation 42**) qui définit le potentiel en fonction du rapport entre les espèces oxydées et réduites du couple redox considéré :

$$E = E° + \frac{RT}{nF} \ln(\frac{[Oxydant]}{[Réducteur]})$$ **Équation 42**

Avec :

E le potentiel de l'électrode en [V]

E^0 le potentiel standard du couple redox mis en jeu en [V],

R la constante des gaz parfaits égale à 8,31 J/(mol.K)

n le nombre d'électrons transférés lors de la demi-réaction d'oxydo-réduction

F la constante de Faraday égale à 9,6485x104 C/mol

[Oxydant] et [Réducteur] les concentrations en espèces oxydées et réduites en [mol/L]

Lorsque le potentiel E augmente, le rapport [Oxydant]/[Réducteur] augmente. Cela traduit donc une accumulation d'espèces oxydées ou une diminution d'espèces réduites. Ainsi, on constate que plus le potentiel appliqué est négatif, plus la valeur de l'OCV augmente. Ce résultat reste surprenant, car plus le potentiel appliqué est négatif, plus les réactions de réduction sont favorisées. Cela traduit donc un système complexe où le potentiel imposé et l'OCV ne sont pas couplés aux mêmes mécanismes. Une hypothèse sera de considérer le potentiel imposé comme une activation du métabolisme cellulaire favorisant la voie oxydative.

Le comportement de la résistance interne de la biopile a également été évalué en fonction de la configuration ainsi que du temps de fonctionnement (**Tableau 12**). On peut constater qu'à

t = 0 h, la résistance interne de la biopile est très élevée puisqu'elle est de 43,3 kΩ. Ce résultat, étant calculé à partir de la courbe de puissance, est attendu puisqu'il n'y pratiquement pas de courant généré. Après 24 h, la résistance interne est de 168,9 Ω, valeur similaire à la valeur théorique calculée dans le chapitre 4 (165,5 Ω). Il n'y a donc pas encore de biofilm formé à la surface de l'électrode. Après fonctionnement sur résistance externe, au bout de trois jours, la résistance interne augmente fortement puisqu'elle est de 4 574,4 Ω. Cette valeur élevée de résistance interne laisse supposer qu'un biofilm peu électroactif s'est formé à la surface de l'anode. Un potentiel de -0,146 V (vs Ag/AgCl) a ensuite été imposé à l'anode. A la suite de cette expérience, la résistance interne du système est de 600 Ω. Il y a donc eu une diminution de la valeur de la résistance interne même si cette valeur reste supérieure à la valeur théorique calculée. Ceci indique donc que le biofilm formé à la surface de l'électrode SSF/$(PEI/rGO)_5$ est devenu plus électroactif que lors de la configuration précédente. Le potentiel appliqué a ensuite été diminué progressivement à des valeurs plus négatives jusqu'à -0,446 V. La résistance interne quant à elle a augmenté jusqu'à 2 325,3 Ω. Cette augmentation peut être liée à un biofilm plus dense à la surface de l'électrode. Enfin, la valeur de polarisation -0,246 V a de nouveau été appliquée, engendrant une diminution de la résistance interne à une valeur de 1789,6 Ω, supérieure à la valeur obtenue lors du premier essai qui était de 1133,1 Ω. La configuration de la biopile a donc une influence sur la résistance interne du système. Finalement, la biopile a été reconnectée sur résistance externe. On peut constater que la valeur de la résistance a été multipliée par un facteur deux, avec une valeur de 3 411,9 Ω. La résistance interne augmente donc avec le temps, indiquant ainsi que le biofilm formé à la surface de l'anode devient moins électroactif, et dépend aussi de la configuration du système.

La puissance surfacique a été calculée selon l'équation suivante (**Équation 43**) :

$$P = U * J \qquad \textbf{Équation 43}$$

Où

P est la puissance en [W/m²],
U la tension en [V],
J la densité de courant en [A/m²].

La puissance maximale a ainsi été évaluée pour chaque configuration (**Figure 73**).

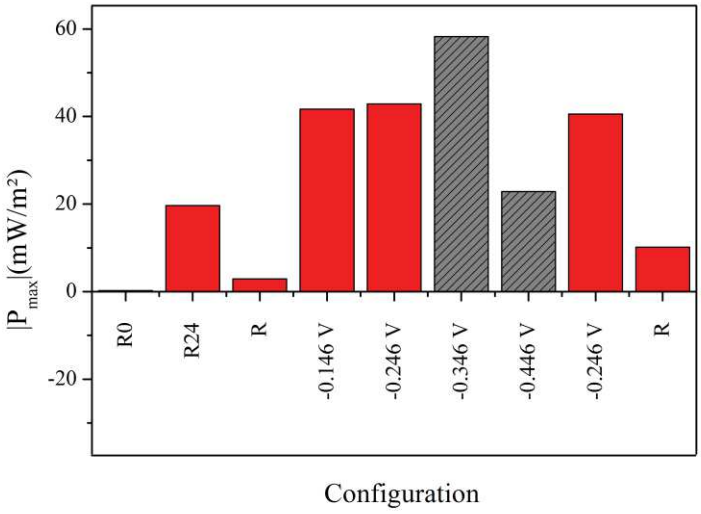


Figure 73 *: Histogramme de l'évolution de la densité de puissance maximale électrique (en valeur absolue) délivrée par la biopile en fonction de la configuration adoptée ; les zones grisées correspondent aux courant négatifs enregistrés.*

Avant ensemencement, la puissance est de 0,26 mW/m² tandis qu'après 24 h de croissance de *P. aeruginosa* en milieu TSA-B et sur résistance externe fixe, la puissance s'élève à 19,56 mW/m². L'électroactivité de *P. aeruginosa* au sein du compartiment anodique est donc bien observée. A la fin de cette croissance, le milieu TSA-B est remplacé par du milieu BBM avec la mise en place de l'alimentation continue. Alors que l'anode et la cathode sont toujours connectées par une résistance externe de 1 kΩ, on peut noter qu'il y a forte chute de la puissance délivrée puisqu'elle est de 2,94 mW/m². L'anode est ensuite polarisée à un potentiel de -0.146 V vs pseudo Ag/AgCl. Ce changement de configuration permet de faire augmenter la puissance à 41,68 mW/m². La valeur de polarisation est ensuite imposée à -0.246 V vs pseudo Ag/AgCl, ce qui fait légèrement augmenter la puissance délivrée à une valeur de 42,88 mW/m² en fin d'essai. La valeur de polarisation est par la suite établie à -0.346 V vs pseudo Ag/AgCl, ce qui permet d'augmenter la puissance délivrée à une valeur de 58,24 mW/m² en valeur absolue. Enfin, lorsqu'une polarisation à -0,446 V vs Ag/AgCl est testée, on peut constater que la puissance diminue jusqu'à atteindre 22,85 mW/m². Il est toutefois important de noter que pour ces deux dernières valeurs de polarisation, les densités de courant obtenues étaient négatives. A la suite des essais de ces différentes configurations, la polarisation à -0,246 V vs pseudo Ag/AgCl et sur résistance externe ont de nouveau été testées. On peut constater que dans le cas de la polarisation, la valeur de puissance délivrée est la même que lors du premier essai.

Néanmoins, dans le cas de la résistance externe, une augmentation de la puissance est observée puisqu'elle passe de 2,94 mW/m², lors du premier essai, à 10,14 mW/m².

2.4. Discussion

D'après les résultats présentés, il apparaît nettement que la composition du milieu de culture de *P. aeruginosa* affecte les performances liées à la biopile. On peut noter que les performances délivrées par la biopile sont meilleures avec le milieu TSA-B qu'avec le milieu BBM lors des premiers jours de croissance du biofilm. En effet, on a pu voir que la biomasse développée était 6 fois plus importante avec le milieu TSA-B qu'avec le milieu BBM, ce qui peut expliquer le fait que les performances soient meilleures en milieu TSA-B puisque la population microbienne est plus importante. L'augmentation rapide observée de la densité de courant peut être attribuée à un transfert d'électrons indirect *via* des médiateurs sécrétés par *P. aeruginosa*. En effet, le temps est trop court pour qu'un biofilm soit formé à la surface de l'électrode puisqu'il faut plusieurs heures voir quelques jours pour qu'il se forme. Cette observation est en accord avec le comportement observé avec le terreau de jardin dans le chapitre 3 mais aussi le chapitre 4 puisqu'une augmentation de courant avait été également observée lors de la première journée.

De plus, il a été démontré que la configuration même du système a un impact direct sur les résultats obtenus. D'après l'ensemble des résultats, travailler en circuit fermé avec une résistance externe permet de former un biofilm électroactif permettant l'oxydation du glucose. Cependant, l'imposition d'un potentiel au niveau de l'anode permet d'améliorer la densité de courant ainsi que la puissance générée. En effet, d'après les résultats obtenus par chronoampérométrie (**Figure 69**) ainsi que les courbes de puissance (**Figure 72**) et de voltammétrie cyclique (**Figure 71**), une polarisation à un potentiel de -0,246 V (vs Ag/AgCl) permet d'obtenir les meilleures valeurs de puissance et de densité de courant. Cependant, lorsque ce potentiel est de nouveau appliqué après avoir testé d'autres valeurs, ces valeurs peuvent diminuer, notamment pour la densité de courant. A l'inverse, les résultats obtenus avec la résistance au deuxième test se sont révélés meilleurs que ceux obtenus lors du premier essai et que lors de la polarisation à -0,246 V. Ces résultats peuvent laisser suggérer que l'application d'un potentiel permet de favoriser l'électroactivité du biofilm de *P. aeruginosa* mais que cette configuration peut s'avérer néfaste sur une longue durée. Un effet du temps est aussi observé avec notamment l'augmentation de la résistance interne. Enfin, il est suspecté la présence de

médiateurs sécrétés par *P. aeruginosa* permettant ainsi le transfert d'électron entre le biofilm et l'anode : la pyocyanine et la phenazine-1-carboxamide.

Il reste très difficile de comparer les résultats obtenus avec la littérature en raison de la géométrie de la biopile développée et des conditions d'alimentation continue en milieu nutritif avec cette souche.

Un facteur pouvant affecter les performances de la biopile est la vitesse du débit d'alimentation. En effet, sur la **Figure 68**, on peut constater une augmentation de la production d'électricité lorsque le débit est doublé. C'est pourquoi, l'influence de la vitesse d'alimentation sur les différents paramètres de la biopile est ensuite évaluée.

3. Influence du débit d'alimentation

3.1. Introduction

L'évolution de différentes grandeurs a été étudiée en fonction du débit : la consommation de glucose, la densité de courant, la densité optique, le pH et la vitesse de consommation du substrat. Cette dernière, appelée r_s, peut être déterminée en sortie de compartiment anodique à partir de l'équation bilan suivante (**Équation 44**) :

$$\frac{d(S.V)}{dt} = r_S V + Q(S_E - S_S)$$ **Équation 44**

Où

S est la concentration en glucose [g/L],
V le volume du compartiment en [L],
t le temps en [h],
r_s la vitesse de consommation en glucose exprimé en [g/L/h],
Q le débit en [L/h].

L'équation peut être réécrite de la manière suivante (**Équation 45**) :

$$V\frac{dS}{dt} + S\frac{dV}{dt} = r_S V + Q(S_E - S_S)$$ **Équation 45**

Or le volume est constant au court du temps, donc : $\frac{dV}{dt} = 0$. De plus, sachant que le taux de dilution s'exprime : $D = \frac{Q}{S}$ et que sur une phase de consommation en glucose constante : $\frac{dS}{dt} = 0$, l'équation finale s'écrit (**Équation 46**) :

$$r_S = D(S_S - S_E)$$ **Équation 46**

Il est important dans un premier temps de déterminer l'état de la biomasse en fin de batch.

3.2. Etat de la biomasse en fin de batch

Le suivi chronoampérométrique pendant les premières 24 h permet de déterminer si la croissance en batch est reproductible d'une expérience à l'autre. Ainsi, la croissance en batch de *P. aeruginosa* a été testée trois fois pendant 24 h. Cette croissance est réalisée en milieu TSA-B et la biopile est placée en circuit fermé avec une résistance externe de 1 kΩ. L'évolution de la densité de courant en fonction du temps est représentée en **Figure 74**.

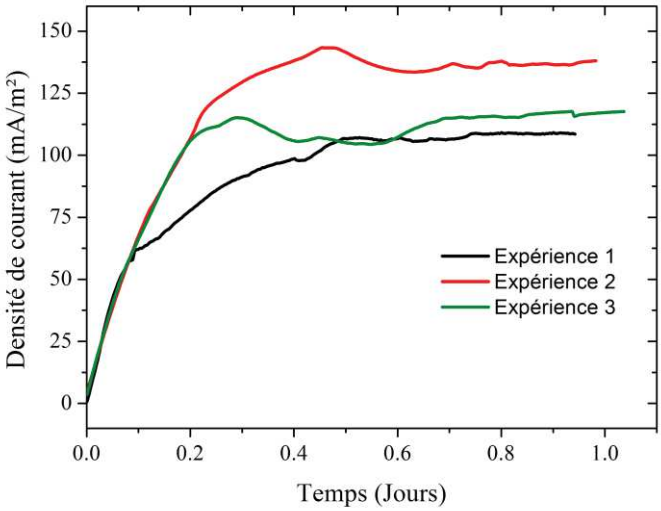


***Figure 74** : Evolution de la densité de courant pendant le batch en milieu TSA-B lorsque la biopile est connectée à une résistance externe de 1 kΩ.*

On peut observer que les profils de densité de courant lors des deux premières heures sont superposables pour les trois expériences. Par la suite, la production de courant de l'expérience 1 diminue jusqu'à finalement atteindre un palier après 12 h de fonctionnement à une valeur de 110 mA/m². La production observée avec l'expérience 2 est constante pendant les cinq premières heures puis diminue jusqu'à la douzième heure d'expérience. La valeur de densité de

courant se stabilise à 135 mA/m² lors des dernières heures du batch. Enfin la densité de courant de l'expérience 3 atteint une valeur maximale de 115 mA/m² après 7 heures de fonctionnement. Cette valeur reste relativement stable tout le temps restant du batch.

On peut donc constater que la cinétique de transfert d'électron lors des premières heures du batch est la même quelle que soit l'expérience. Néanmoins, après 2 h de fonctionnement, l'évolution des valeurs de densité de courant diffère d'une expérience à l'autre même si en fin de batch, la valeur finale pour les expériences 1 et 3 est sensiblement la même et même si les profils des expériences 2 et 3 sont proches durant 5 heures. En effet, la densité finale de courant de l'expérience 2 est 1,2 fois plus élevée que celles enregistrées pour les expériences 1 et 3.

Ceci signifie que la biomasse en fin de batch, ou au début de l'alimentation en milieu BBM, n'est pas dans le même état physiologique malgré une préparation d'inoculum et une réaction batch réalisées toujours dans les mêmes conditions.

Une nouvelle expérience a été reproduite suivant l'optimisation de polarisation réalisée précédemment.

3.3. Evaluation de la formation d'un biofilm électroactif sur résistance externe et sous polarisation à-0,246 V vs pseudo Ag/AgCl

Comme pour les expériences précédentes, la croissance de *P. aeruginosa* a été réalisée en batch en milieu TSA-B pendant 24 h. Une configuration sur résistance externe (1 kΩ) a été adoptée pendant les quatre premiers jours de fonctionnement. L'anode a ensuite été polarisée à un potentiel optimal de -0,246 V pendant 455 h. Enfin, la biopile a de nouveau été connectée à une résistance externe. Des courbes de polarisation et de puissance ont été enregistrées tout au long de cette expérience et les valeurs caractéristiques sont reportées dans le **Tableau 13**.

Configuration		Temps Heures	OCV mV	P_{MAX} mW/m²	R_{INT} Ω
R	*Batch*	0	104	0,8	2073,9
R	*Batch*	24	339	80,3	299,8
R	*Alimentation*	97,2	845	1,0	386,5
-0,246 V	*Alimentation*	165,2	374	41,7	601,1
-0,246 V	*Alimentation*	434,5	432	39,5	500,1
-0,246 V	*Alimentation*	552,3	470	77,7	499,9
R	*Alimentation*	697,5	434	47,0	605,9

Tableau 13 *: Evolution des grandeurs caractéristiques liées aux courbes de puissance et de polarisation au cours du temps et en fonction de la configuration adoptée pour le fonctionnement de la biopile.*

Au début de l'expérience, la tension en circuit ouvert (OCV) est de 104 mV. A la fin de la croissance en batch pendant 24 h, la valeur de l'OCV a augmenté jusqu'à 339 mV. Le compartiment anodique est ensuite alimenté en milieu BBM tout en laissant la biopile connectée à la résistance. A la fin de cette configuration, l'OCV a augmenté jusqu'à une valeur de 845 mV. Il y a donc eu la formation d'un biofilm électroactif à la surface de l'anode. Un potentiel de -0,246 V (vs Ag/AgCl) est ensuite appliqué pendant 455 h. Au bout de 70 h, on peut constater que l'OCV a diminué par rapport à la valeur obtenue en fin de configuration sur résistance puisqu'elle est de 374 mV. Durant les heures suivantes, l'OCV augmente jusqu'à finalement atteindre une tension de 470 mV à la fin de la polarisation. La biopile est ensuite connectée sur résistance externe pendant 145 h. On peut constater que durant cette période, l'OCV a diminué à 434 mV. Les valeurs d'OCV obtenues lors de la polarisation sont similaires à celles obtenues précédemment (**Tableau 12**) puisqu'une OCV de 490 mV avait été obtenue. Toutefois, dans le cas de la configuration sur résistance externe, les valeurs enregistrées sont supérieures. En effet, au terme de la croissance microbienne en batch, une OCV de 155,4 mV avait été obtenue, tandis que lors de cette essai, une valeur de 339 mV est obtenue, ce qui est 2,2 fois plus élevé. Il en est de même pour l'alimentation continue. Au bout de 72 h lors de l'expérience précédente, l'OCV était de 307 mV, tandis que pour celle-ci, l'OCV est de 845 mV au bout de 97,2 h, ce qui 2,7 fois plus élevé. Enfin, au terme de l'expérience, l'OCV était de 312,2 mV alors qu'ici elle est de 434 mV, donc 1,4 fois plus élevé.

L'évolution de la densité de puissance maximale a également été étudiée en fonction du dispositif et du temps. Avant inoculation, la puissance maximale fournie par la biopile est de 0,8 mW/m². Cette puissance augmente à 80,3 mW/m² à la fin du batch. A la fin de l'essai sur résistance, la puissance maximale diminue à une valeur de 1 mW/m². Ainsi, on peut que même si dans le même temps une augmentation de l'OCV a été observé, la puissance a diminué. La polarisation permet par la suite d'augmenter la puissance délivrée par le dispositif à 41,7 mW/m² (valeur similaire à celle observé dans le **Tableau 12**). Cette valeur augmente avec le temps pour finalement atteindre 77,7 mW/m² à la fin de la polarisation. Cette valeur est presque deux fois supérieure aux valeurs observées lors des essais de polarisation de la **section 2.3**. Lorsque le système est de nouveau placé sur résistance, la puissance diminue à 47 mW/m². Cette valeur est inférieure à celle obtenue lors de la polarisation, mais elle reste deux fois plus élevée à la valeur obtenue lors des essais précédents (**Tableau 12**). L'évolution des valeurs d'OCV ne semble pas corrélée aux valeurs de puissance, ce qui traduit l'influence des mécanismes cinétiques sur les valeurs thermodynamiques des réactions mises en jeu. Dans la suite, nous nous concentrerons sur les valeurs de densité de courant.

Enfin, l'évolution de la résistance interne du bioréacteur au cours du temps a été évaluée. On peut constater qu'elle est de 299,8 Ω à la fin du batch. Cette valeur est 1,8 fois supérieure à la valeur obtenue dans le **Tableau 12**. Ce résultat paraît étonnant puisque les valeurs d'OCV et de puissance dans ce cas-ci. A la fin de la configuration sur résistance externe et en alimentation continue, la valeur augmente à 386,5 Ω. La valeur de la résistance est dans ce cas très inférieure (facteur 12) à la valeur obtenue au même stade lors des essais précédents. Le biofilm formé dans ce cas est plus électroactif que lors du premier essai. Par la suite, la valeur de la résistance interne varie entre 500 et 600 Ω, valeurs très inférieures à celles observées dans la partie précédente.

Il apparait clairement que le biofilm formé présente une meilleure électroactivité par rapport à celui formé dans la section précédente puisque l'ensemble des caractéristiques électriques sont supérieures dans ce cas. On peut aussi noter que les variations de polarisation lors de l'expérience précédente ont pu interférer et inhiber la formation d'un biofilm électroactif stable.

Au cours de cette expérience, différentes valeurs de taux d'alimentation ont été testées. Les évolutions des différents paramètres en fonction du taux d'alimentation ont été comparées en fonction de la configuration du système. Les résultats obtenus au cours de cette expérience sont également comparés avec les résultats obtenus lors de l'expérience de la section 2 de ce

chapitre et pour une configuration équivalente. Pour plus de clarté, l'expérience de la section 2 sera nommée « *Expérience 1* » (durant laquelle différentes polarisations ont été testées) et celle de cette section sera nommée « *Expérience 2* » (expérience optimisée par rapport au potentiel de polarisation) dans la suite de ces travaux.

Un biofilm électroactif devant être formé à la surface de l'anode, les résultats pris en comptes pour l'*Expérience 2* commencent à partir de t = 270 h et pour une configuration sous polarisation à -0,246 V vs pseudo Ag/AgCl.

3.4. Influence du débit d'alimentation lors de la polarisation à -0,246 V vs pseudo Ag/AgCl

Différents paramètres tels que le taux de dilution, la densité de courant, la concentration en glucose résiduel, la densité optique et le pH sont reportés en fonction du temps sur la **Figure 75.**

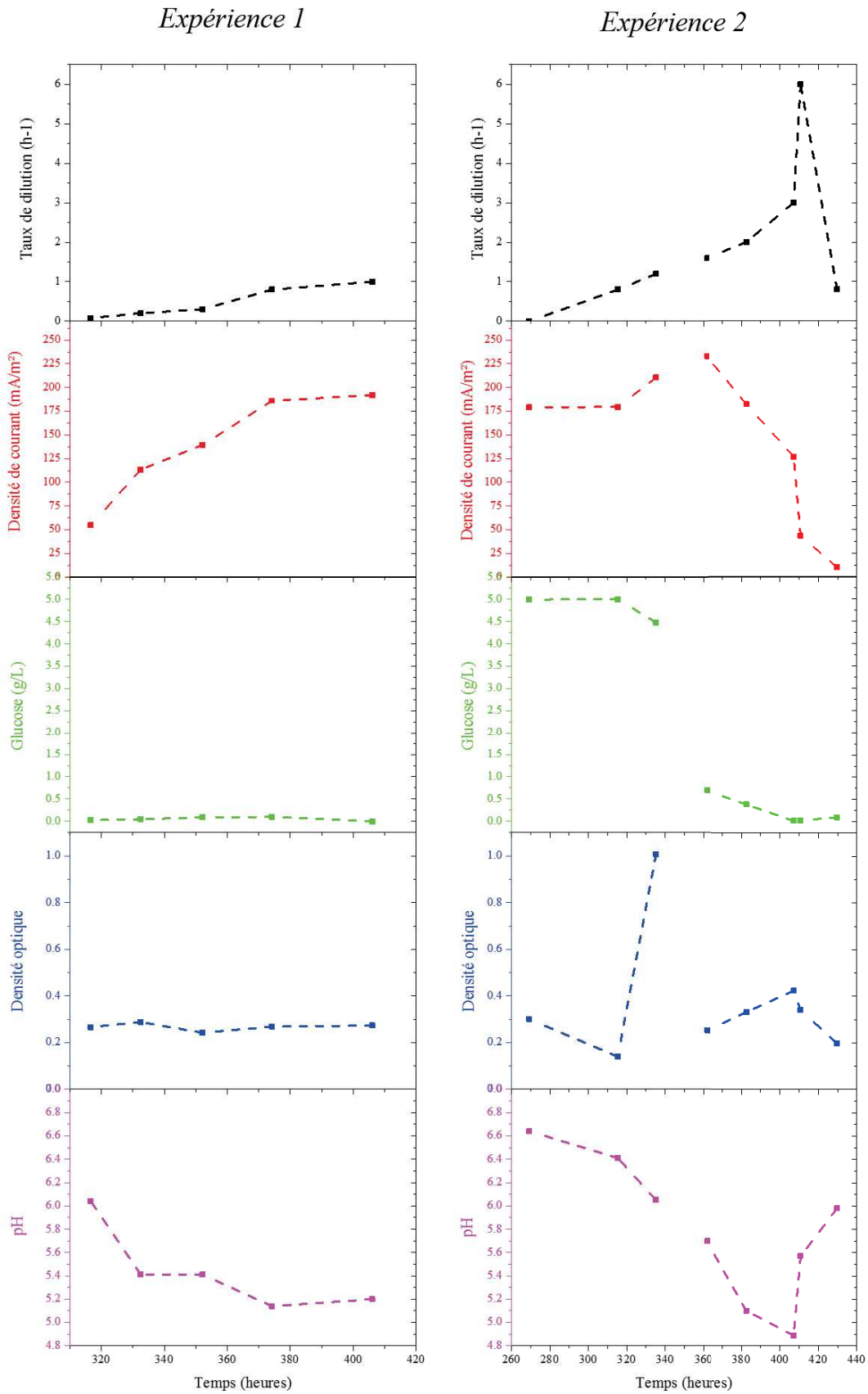


Figure 75 *: Evolution des différents paramètres au cours du temps lors d'une polarisation à -0,246 V vs pseudo Ag/AgCl*

Lors de l'*Expérience 1*, l'augmentation du taux de dilution jusqu'à 1 h^{-1} se traduit par une augmentation de la densité de courant jusqu'à 191,94 mA/m². La concentration en glucose résiduel est quant à elle proche de 0 g/L indiquant que le glucose apporté est entièrement consommé. La DO en sortie de bioréacteur, témoin de la présence de bactéries en suspension, est caractérisée par une valeur constante et égale à 0,270 UDO (Unité de Densité Optique) quel que soit le taux d'alimentation appliqué. Le pH du milieu, prélevé en sortie de réacteur, diminue lorsque le taux de dilution est augmenté ce qui est attendu étant donné que l'oxydation du glucose libère des protons selon l'**Équation 47** suivante :

$$C_6H_{12}O_6 + 6\,H_2O \xrightarrow{microorganismes} 6\,CO_2 + 24H^+ + 24\,e^- \qquad \textbf{\textit{Équation 47}}$$

Dans le cas de l'*Expérience 2*, la densité de courant augmente également avec l'augmentation du taux d'alimentation. Elle atteint une valeur maximale de 233 mA/m² pour un taux d'alimentation de 1,6 h^{-1}. Au-delà de cette valeur, une nette diminution de la densité de courant est observée avec une valeur de 43,4 mA/m² pour un taux d'alimentation de 6 h^{-1}. La diminution du taux d'alimentation à 0,8 h^{-1} ne permet pas de rétablir la densité de courant qui continue à diminuer (10 mA/m²). Cette diminution engendrée par un débit d'alimentation trop élevé peut s'expliquer par une perturbation du biofilm telle que la desquamation. La concentration en glucose résiduel se divise en deux situations : une situation où la consommation en glucose est pratiquement nulle et une où le glucose est entièrement consommé. On observe la première situation pour des taux d'alimentation allant jusqu'à 1,2 h^{-1}, tandis que la seconde situation est observée pour des taux d'alimentation allant de 1,6 à 6 h^{-1}. On peut voir que la densité de courant maximale est obtenue lorsque la consommation de glucose est quasi-totale. Néanmoins, il est important de noter que même lorsque le glucose n'est pratiquement pas consommé, les valeurs de densité de courant sont élevées (comprises entre 175 mA/m² et 220 mA/m²). Ce résultat surprenant peut être lié aux bactéries qui utilisent une source carbonée présente dans la matrice du biofilm, ce qui expliquerait la détérioration du biofilm observé avec l'augmentation de la DO à 1 UDO à 340 h et un taux d'alimentation de 1,2 h^{-1}. Pour les autres taux d'alimentation, la densité optique oscille entre 0,1 et 0,4 UDO.

Enfin, le pH diminue avec l'augmentation du débit jusqu'à un taux de 3 h^{-1} ce qui traduit l'oxydation du glucose par *P. aeruginosa* se trouvant sous forme libre. Au-delà, le pH augmente indiquant ainsi qu'il y a une diminution de l'oxydation du glucose en raison de la diminution de forme libre de *P. aeruginosa*.

Il est également important de réaliser la même étude sur les résultats obtenus lors du circuit fermé sur résistance externe.

3.5. Influence du débit d'alimentation sur résistance externe

Comme pour la configuration sous polarisation, l'ensemble des paramètres en fonction du temps et du taux d'alimentation sont reportés sur la **Figure 76**.

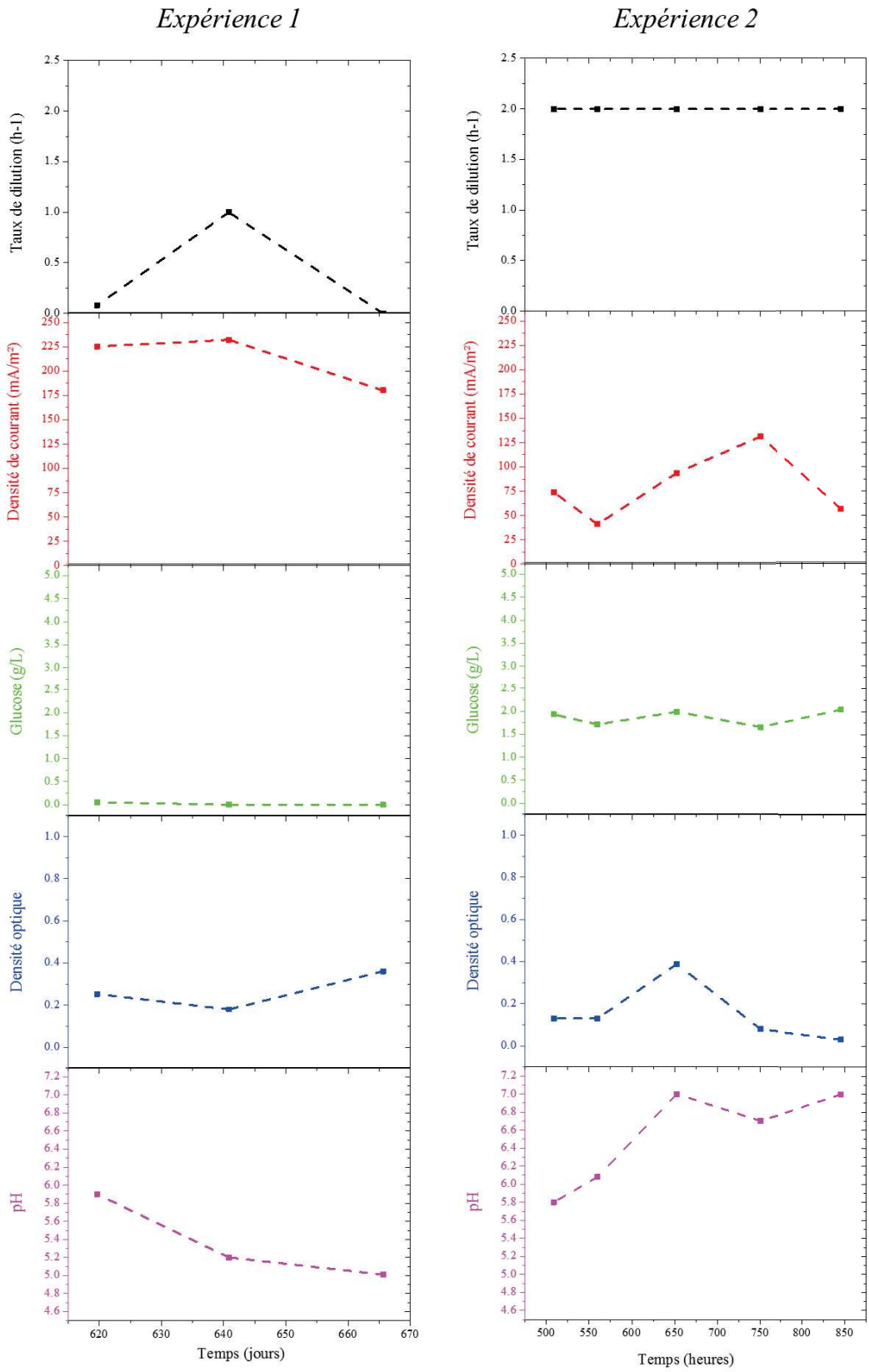


Figure 76 *: Evolution des différents paramètres au cours du temps lors du branchement sur résistance externe.*

Au cours de l'*Expérience 1*, pour suivre l'effet du taux de dilution, seulement deux valeurs ont été testées, celle utilisée en démarrage de réaction (0.08 h^{-1}) et celle qui permet d'éliminer les formes planctoniques : 1 h^{-1}. Ces deux valeurs sont les valeurs bornes de nos essais réalisés précédemment lors de la polarisation de l'anode. Le passage d'un faible taux de dilution (0.08 h^{-1}) à un fort taux de dilution (1 h^{-1}) n'a pas d'influence sur la densité de courant qui reste constante et égale à 230 mA/m². Par contre, le passage d'un taux de dilution élevée à un faible taux provoque une diminution de la densité de courant (facteur 1,3) démontrant ainsi une instabilité du biofilm. Lors de cette période, le glucose a été entièrement consommé. De plus, la DO est relativement constante tandis que le pH diminue. Ces résultats indiquent donc qu'il y a bien une dégradation du glucose par les microorganismes présents dans le compartiment anodique (aussi bien sous forme de biofilm que sous forme libre) du fait de la consommation totale du glucose et de la diminution du pH.

Lors de l'*Expérience 2*, le taux d'alimentation a été fixé à 2 h^{-1} afin d'éliminer toute forme planctonique de microorganismes dans le compartiment anodique. On peut noter que la densité de courant est très instable puisqu'elle varie de 40 mA/m² à 130 mA/m². Ces valeurs sont de 1,8 à 5,8 fois inférieures aux valeurs obtenues lors de l'*Expérience 1*. La DO varie quant à elle de 0,1 à 0,4 UDO au cours du test ce qui indique bien un lessivage des microorganismes par rapport à l'*Expérience 1*. La consommation du glucose est quant à elle incomplète puisqu'on retrouve une concentration moyenne de 2,0 g/L de glucose résiduel. Ceci peut s'expliquer par un taux d'alimentation trop élevé pour que le glucose soit dégradé par les microorganismes. Enfin, le pH augmente au cours du temps ce qui indique également que le glucose n'est pas entièrement consommé. Cependant, ces résultats montrent que pour un débit d'alimentation constant, la densité de courant ainsi que la DO et le pH varient au cours du temps. Il n'est donc pas possible de relier ces différentes variables bien qu'elles attestent toutes d'une activité métabolique. Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées comme un effet du temps sur les performances du à une instabilité du biofilm, une perte de viabilité ou une perte de médiateurs.

L'influence du débit d'alimentation sur les performances électriques (densité de courant) a ensuite été comparée afin de déterminer le taux d'alimentation optimal pour la production d'électricité.

3.6. Influence du débit d'alimentation sur la densité de courant

L'évolution de la densité de courant lors de la polarisation à -0,246 V vs pseudo Ag/AgCl a finalement étudiée en fonction du taux d'alimentation appliqué et est représenté en **Figure 77**.

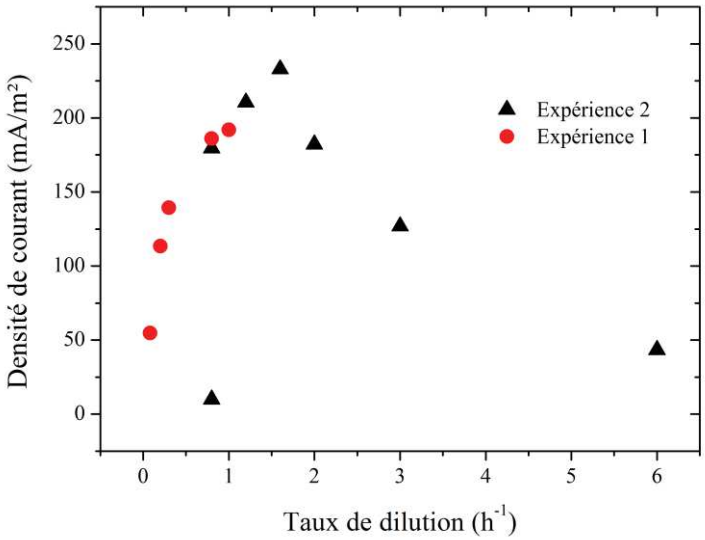


***Figure** 77 : Evolution de la densité de courant en fonction du taux de dilution lors de la polarisation à 0,246 V vs pseudo Ag/AgCl.*

D'après la **Figure 77**, on peut constater que la densité de courant maximale est obtenue pour un taux d'alimentation de 1,6 h^{-1}. Au-delà de ce débit, la densité de courant chute.

Lors de la polarisation à -0,246 V vs pseudo Ag/AgCl, on a pu constater une production d'électricité alors que le glucose n'était pratiquement pas consommé. Une expérience a donc été menée avec une alimentation en milieu nutritif BBM dépourvu de glucose.

3.7. Evaluation des performances lors d'une alimentation sans glucose

Cette expérience a été menée sous polarisation à -0,246 V afin de vérifier les observations effectuées dans le **paragraphe 3.4**. Elle a été effectuée à la suite des essais sur le différents taux d'alimentation, et donc à la suite d'une alimentation avec glucose. En effet, il est apparu que des densités de courant élevées étaient obtenues même si le glucose n'était pratiquement pas consommé. Ainsi, l'alimentation est effectuée avec du milieu BBM dépourvu de glucose et à un taux d'alimentation de 1,6 h^{-1}. Le suivi chronoampérométrique est représenté en **Figure 78**.

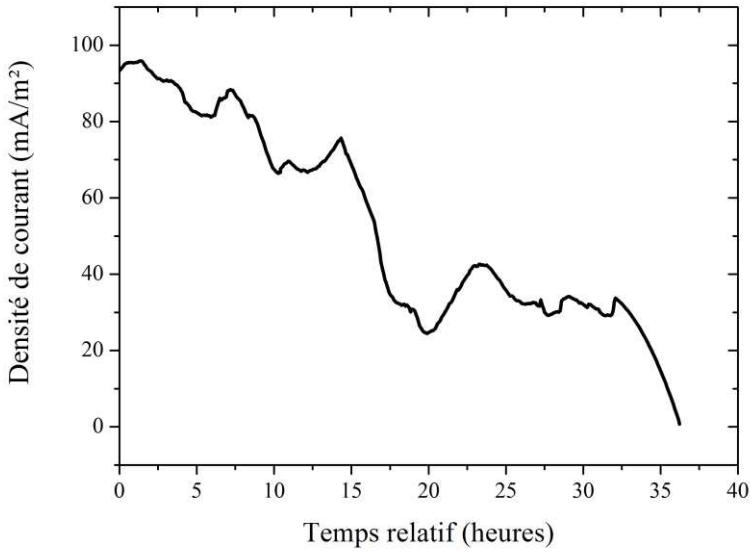


Figure 78 *: Evolution de la densité de courant en fonction du temps relatif en absence de glucose et avec une polarisation à -0,246 V vs Ag/AgCl et un taux d'alimentation de 1,6 h^{-1}.*

L'expérience montre que lorsque le milieu d'alimentation est dépourvu de glucose, les densités de courant sont très inférieures à celles obtenues dans les mêmes conditions mais avec du glucose. En effet, une diminution du courant est observée tout au long de l'expérience passant de 95 mA/m² à 0 mA/m² en fin d'expérience. Etant donné que cette expérience a été réalisée après une alimentation en glucose, ces résultats laissent donc supposer que le glucose avait été absorbé par le biofilm. En effet, en absence de glucose, la chute de courant devrait être brutale, ce qui n'est pas le cas ici. On observe une diminution progressive du courant qui correspond à une consommation du glucose absorbée dans le biofilm jusqu'à une dégradation totale du glucose présent.

3.8. Discussion

La vitesse d'alimentation joue un rôle essentiel dans la production d'électricité. En effet, lorsqu'un débit trop élevé est appliqué, il en résulte une diminution des performances électriques. Un taux d'alimentation de 1,6 h^{-1} permet d'obtenir la densité de courant maximale (233 mA/m²) lorsque l'anode est soumise à un potentiel. Au-delà de cette valeur, on observe une diminution du courant généré. Cette diminution peut être liée à une assimilation du glucose par le biofilm trop lente par rapport à la vitesse d'alimentation. Il est également apparu qu'en absence de glucose, une densité de courant résiduelle de 5 mA/m² est observée. Toutefois, il est

également montré que dans certains cas, le glucose n'est pas entièrement consommé au cours de la réaction même si un courant d'oxydation est observé. Ce résultat peut être lié à une absorption du glucose dans la matrice du biofilm et un courant résultant de son oxydation au sein de la matrice.

Il apparaît aussi qu'une optimisation des conditions de formation du biofilm permet d'obtenir des performances électriques plus élevées. La résistance interne a également pu être diminuée, engendrant une meilleure électroactivité du biofilm.

4. Conclusions

Il a été démontré dans ce chapitre que la géométrie du bioréacteur proposé est propice à la formation d'un biofilm électroactif et donc à un fonctionnement en biopile. Il est également possible de suivre l'évolution des paramètres comme la consommation de glucose, l'évolution du pH et de la densité optique en sortie du compartiment anodique.

L'optimisation de la formation d'un biofilm électroactif sur une anode en mousse d'acier inoxydable modifiée avec du graphène a été étudiée. Différents paramètres ont été évalués tels que l'activation de l'électroactivité du biofilm par voie électrochimique. Un potentiel de -0,246 V vs pseudo Ag/AgCl permet d'améliorer l'électroactivité du biofilm en augmentant la puissance et le courant délivrés par la biopile par rapport à la formation d'un biofilm en circuit fermé sur résistance externe. Après la polarisation, lorsque que le système est en circuit fermé sur résistance externe, les performances obtenus en terme de puissance sont plus faible que celles obtenues lors de la polarisation (77,7 mW/m² lors de la polarisation contre 47 mW/m²) mais sont équivalentes en terme de densité de courant (respectivement 233 mA/m² contre 225 mA/m²). Un débit d'alimentation optimal a également pu être déterminé comme étant de 1,6 h^{-1}.

L'utilisation d'une anode en mousse d'acier inoxydable modifiée par du graphène a également permis de fortement augmenter les performances de la biopile par rapport à une électrode en feutre de carbone. En effet, la densité de courant obtenue est multipliée par 30.

Le bioréacteur développé permet donc de contrôler la vitesse d'alimentation au sein du compartiment anodique ainsi que les conditions de formation du biofilm. Toutefois, il reste difficile de contrôler des paramètres tels que le pH et la consommation de glucose. Il est difficile

de conclure sur la biomasse présente en sortie de bioréacteur. En effet, celle-ci peut aussi bien provenir des microorganismes en suspension que d'un détachement du biofilm [232].

L'analyse des performances électrochimiques (OCV, courant, puissance…) montre des évolutions parfois surprenantes des différents paramètres, ce qui traduit la complexité des mécanismes d'électrogénécité bactérienne.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Conclusions et perspectives

Ce travail de thèse sur les piles à combustible microbiennes constituait un nouveau sujet au sein du laboratoire. Ces dispositifs bioélectrochimiques ont pour but de produire une énergie verte et renouvelable. Le principe des biopiles microbiennes consiste à convertir une énergie chimique, contenu dans les composés organiques, en électricité avec l'intervention de consortia de microorganismes sous forme de biofilm électroactif. Le domaine des biopiles est toujours à l'état de développement en raison des faibles densités de puissance obtenues.

La première étape de ces travaux a été de réaliser une bioanode. De la mousse d'acier inoxydable a été choisie comme support pour la formation d'un biofilm électroactif. Il a été vu dans l'état de l'art que la modification surfacique, notamment avec du graphène, permettait d'améliorer les performances des électrodes. Cette électrode a donc été modifiée en surface avec du graphène. Le graphène a été déposé par la méthode couche par couche et a été associé à un polyélectrolyte (le PolyEthylèneImine). Afin de caractériser et de comparer ces deux électrodes, un biofilm électroactif a été formé à la surface de chaque électrode. Un mélange complexe et capable de former des biofilms, électroactifs comme déjà reporté dans la littérature [74], [202], [219], a été sélectionné : le terreau de jardin. Il présente l'avantage d'être facile à mettre en œuvre et nécessite peu de conditions particulières et de paramètres extérieurs à maintenir. La pertinence de la modification de surface avec du graphène a pu être démontrée. En effet, en présence de graphène, le courant généré est 90 fois supérieur par rapport à l'anode non modifiée. De plus, un courant catalytique est observé plus rapidement pour l'électrode en graphène indiquant une meilleure capacité de transfert d'électrons entre le biofilm et l'anode. La deuxième étape a été le développement d'une cathode abiotique à base de complexe organométallique dans le but de remplacer le platine. Ainsi, du feutre de carbone a été modifié par électrodéposition avec de la phthalocyanine de nickel. Ces deux électrodes ont pu être associées en biopile, combinant ainsi un catalyseur d'origine biologique à l'anode et d'origine organométallique à la cathode. Cette biopile a été testée avec la cathode modifiée avec la phthalocyanine et avec une cathode en platine. Il est apparu que les performances obtenues avec le feutre de carbone modifié avec la phthalocyanine sont 7,5 supérieures à celles avec le platine, démontrant ainsi l'efficacité de la modification de surface.

L'ensemble de ce travail a été réalisé en milieu non renouvelé (batch). Toutefois, ces conditions de culture présentent l'inconvénient de devoir ajouter manuellement du substrat afin de maintenir une production d'électricité. De plus, dans ce système, il n'y pas de renouvellement de milieu, c'est-à-dire que ces conditions ne sont pas favorables à une élimination des microorganismes en suspensions et un renouvellement du biofilm. En effet, le biofilm, au cours du temps, se renouvelle avec le détachement des microorganismes morts. C'est pourquoi, la suite de ces travaux s'est focalisée sur la conception et la réalisation d'un nouveau bioréacteur permettant de travailler en alimentation continue en milieu de culture. Il était cependant difficile de réaliser cette étude avec du lixiviat de terreau de jardin du fait de sa composition complexe. En effet, il n'est pas possible de contrôler d'une part la formation d'un biofilm électroactif à l'anode et d'autre part la communauté microbienne présente. Dans le but de mieux comprendre les paramètres pouvant influencer le développement d'un biofilm et la production d'électricité, l'étude a été réalisée avec une souche pure dont l'inoculum et les conditions de culture ont pu être standardisés.

La troisième étape a donc été de concevoir un bioréacteur capable d'être alimenté en milieu de culture de façon continue afin de s'affranchir d'ajouts ponctuels de substrat. Le fait de travailler avec une souche pure impose de pouvoir stériliser le bioréacteur pour éviter toute contamination d'une autre espèce. Il est également important de pouvoir contrôler l'évolution de plusieurs paramètres biologiques (consommation du glucose, évolution de la biomasse et du pH du milieu de culture) à la sortie du compartiment et des performances électriques (densité de courant et puissance). Le prototype de bioréacteur proposé a par la suite été validé pour la formation d'un biofilm électroactif avec comme souche pure *Pseudomonas aeruginosa*. Cette souche d'étude forme facilement des biofilms et a démontré sa capacité à transférer ses électrons à une électrode. Le potentiel de ce bioréacteur a été montré avec l'utilisation d'une anode en feutre de carbone et d'une cathode en platine.

La dernière étape a été d'utiliser l'anode modifiée avec du graphène dans le bioréacteur réalisé. La formation d'un biofilm de *P. aeruginosa* ainsi que son électroactivité ont pu être évaluées. Avant d'étudier l'influence d'une alimentation continue, et notamment la vitesse d'alimentation, sur les performances de la biopile, il a fallu optimiser la formation d'un biofilm électroactif. Pour cela, deux configurations ont été testées : une en circuit fermé avec une résistance externe et une avec polarisation au niveau de l'anode. L'effet de ces configurations a été étudié sur les valeurs de densité de courant, de puissance et de résistance interne. Il a été montré qu'une activation du biofilm par voie électrochimique à un potentiel de -0,246 V vs

Ag/AgCl permet d'augmenter la puissance et la densité de courant par rapport à un biofilm formé en circuit fermé sur résistance externe. Le débit d'alimentation a par la suite pu être optimisé comme étant de 1,6 h-1. Les performances obtenues avec l'électrode modifiée avec du graphène ont aussi été comparées avec celles obtenues avec le feutre de carbone. Il apparait que la densité de courant est 30 fois supérieure avec l'électrode en graphène, démontrant ainsi le potentiel de cette nouvelle anode dans l'amélioration des performances des biopiles.

La biopile à flux continu développée dans ce travail permet donc de contrôler la vitesse d'alimentation au sein du compartiment anodique ainsi que les conditions de formation du biofilm. Néanmoins, les paramètres régissant la densité de courant dépendent également d'autres facteurs comme la variation de pH, la consommation de glucose et l'état de la biomasse sous forme libre dans le bioréacteur. Compte tenu du design du bioréacteur, il existe un effet retard sur les analyses en raison de l'existence d'un gradient de concentration entre l'entrée et la sortie compartiment anodique du fait de la présence d'un biofilm. Il est impossible d'avoir des informations sur ces paramètres à l'intérieur du compartiment et à proximité de la bioanode même si les microorganismes sous forme de biofilm devraient être alimentés de la même façon du fait de flux perpendiculaire. Les échanges de matières au sein du biofilm se font par gradient de concentration, les conditions douces appliquées devraient contribuer au maintien du biofilm sur l'électrode. Malgré la possibilité d'avoir un bilan entre l'entrée et la sortie du compartiment, d'avantages d'études doivent être menées afin d'avoir une analyse plus précise de l'évolution des paramètres, et notamment de la biomasse, au sein du compartiment anodique. Pour cela, il serait intéressant de pouvoir insérer des sondes à proximité de la bioanode pour avoir un suivi continu des différents paramètres.

Enfin, une perspective intéressante serait d'étudier un autre type de substrat ayant un potentiel énergétique supérieur au glucose comme les huiles par exemple. Si l'on prend l'exemple des effluents des moulins à huile de palme, pour la production d'une tonne d'huile de palme plus de 2,5 tonnes d'effluents sont produites [233]. Ce type d'effluent est riche en huile, graisse et en matière organique. Les composés organiques à longues chaines carbonées, tels que les acides gras (acide oléique), contenu dans les huiles végétales (huile d'olive, huile de palme, huile de tournesol…), peuvent s'avérer être des carburants intéressants pour les biopiles puisqu'ils sont susceptible de produire plus d'énergie lors de leur dégradation. Des études récentes [234] ont montré qu'il était possible de dégrader les effluents issus des moulins à huile de palme et de produire de l'électricité avec une biopile microbienne, notamment en utilisant un biofilm formé à partir de *P. aeruginosa* [180].

Nous avons donc, dans le cadre de ce travail, effectué quelques expériences préliminaires avec de l'huile d'olive comme carburant. L'avantage de cette huile par rapport à l'huile de palme est sa concentration plus élevée en acide oléique (71,3 g pour 100 g contre 36,6 g pour l'huile de palme). La principale difficulté dans l'utilisation de corps gras est l'obtention d'un milieu de culture homogène et sous forme d'émulsion. Il est donc nécessaire d'utiliser un tensioactif afin de maintenir une émulsion dans le milieu de culture. Il est important ici d'utiliser un surfactant non bactéricide. Des essais préliminaires ont été réalisés avec un biofilm de *P. aeruginosa* préalablement formé sur milieu BBM. De l'huile d'olive (à concentration en carbone équivalente à celle du glucose testée dans ces travaux) a été ajoutée dans un milieu BBM comme source de carbone et d'énergie, et du Tween-80 à 0,5 % a été utilisé comme tensioactif. Des densités de courant de l'ordre de 50 mA/m² ont été obtenues dans un système non optimisé pour l'utilisation d'huile d'olive. Il serait donc intéressant de poursuivre dans cette voie en optimisant le procédé. Une voie d'optimisation serait de travailler sur l'homogénéisation du milieu nutritif avec l'huile d'olive puisque l'huile n'est pas miscible avec l'eau sans la présence d'un tensioactif. Il serait donc nécessaire de sélectionner le tensioactif le plus adéquat. Il serait aussi important de maintenir cette émulsion de façon homogène tout au long de l'alimentation jusqu'au compartiment anodique. Il serait également intéressant de travailler sur la quantité d'huile d'olive initiale ainsi que sur la vitesse d'alimentation.

Annexe

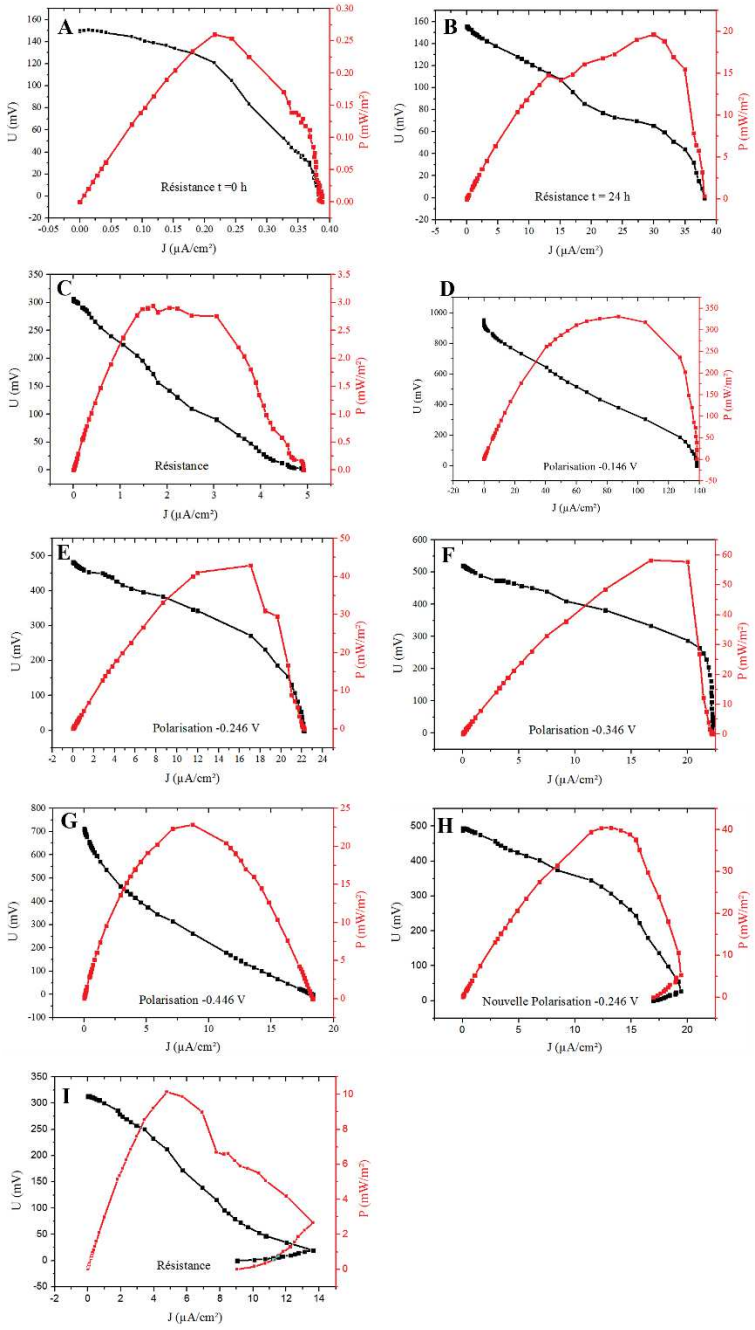


***Figure 79**: Courbes de puissance et de polarisations pour les différentes configurations testées (A) à t = 0 h en milieu TSA-B, (B) sur résistance à t = 24 h en milieu TSA-B, et après les configurations (C) sur résistance en milieu BBM, (D) polarisation à -0,146 V, (E) polarisation à -0,246 V, (F) polarisation à -0,346 V, (G) polarisation à -0,446 V, (H) polarisation à -0,246 V, (I) sur résistance.*

Contributions scientifiques

Publications :

Thi Xuan Huong Le, Mikhael Bechelany, Joffrey Champavert and Marc Cretin. "*A Highly Active Based Graphene Cathode for the Electro-Fenton Reaction*", **RSC Advances**, 2015, 5, 42536,
DOI : 10,1039/c5ra04811g

Joffrey Champavert, Salma Ben Rejeb, Christophe Innocent, Maxime Pontié. "*Microbial Fuel Cell Based on Ni- Tetra Sulfonated Phthalocyanine Cathode and Graphene Modified Bioanode*", **Journal of Electroanalytical Chemistry**, Volume 757, 15 November 2015, Pages 270–276,
DOI :10,1016/j.jelechem.2015,09,012

Joffrey Champavert, Christophe Innocent. "*Promising graphene modified electrode using Layer-by-Layer method for microbial Biofilm connection*", **Journal of Chemistry and Chemical Engineering**, 2015, vol 9, n°5, pages 309-317
DOI : 10,17265/1934-7375/2015,05,001

Conférences nationales :

Journées de l'Électrochimie, Paris, Juillet 2013 :

- **Présentation poster :** *« Développement d'une biopile microbienne pour la production d'électricité »*
  J. Champavert, C. Innocent, L. Preziosi-Belloy, C. Ghommidh

14ème Journées Francophone des Jeunes Physico-Chimistes, Fréjus, Octobre 2013 :

- **Présentation orale :** *« Production d'électricité par des biopiles microbiennes »*
  J. Champavert, C. Innocent, L. Preziosi-Belloy, C. Ghommidh

Ecole Energie et Recherche, Roscoff, Mars 2014 :

- **Présentation flash et poster :** *« Développement d'une bioanode à base de graphène pour la production d'électricité dans une biopile microbienne »*
  J. Champavert, C. Innocent, L. Preziosi-Belloy, C. Ghommidh

XIVème colloque du Groupe français de Bioélectrochimie, Sète, Septembre 2014 :

- **Présentation orale :** *« Electrode modifiée par du graphène pour la production d'électricité dans les biopiles microbiennes à base de terreau de jardin »*
  J. Champavert, C. Innocent, L. Preziosi-Belloy, C. Ghommidh

Congrès 2015 de la Société Chimique de France, Lille, Juillet 2015 :

- **Présentation orale :** *« Biopile microbienne hybride innovante composée d'une cathode à phthalocyanine de nickel tétrasulfonée et d'une bioanode modifiée par du graphène »*
  J. Champavert, S. Ben Rejeb, **C. Innocent**, M. Pontié

7ème Colloque du Réseau National Biofilms, Toulouse, Décembre 2015 :

- **Présentation orale :** *« Electrodes modifiées par du graphène pour la construction de biopiles microbiennes »*
  C. Innocent, J. Champavert, L. Preziosi-Belloy, C. Ghommidh

Conférences internationales :

Bio-Electrochemical Society, Malmö, Suède, Juin 2015 :

- **Présentation orale :** *« Hybrid Microbial Fuel Cell based on Ni-Tetra Sulfonated Phthalocyanine Cathode and Graphene Modified Bioanode »*
  J. Champavert, S. Ben Rejeb, C. Innocent, M. Pontié
- **Présentation poster :** *« Dynamic Bioreactor for the Production of Electricity using Reduced Graphene Oxide Modified Bioanode and Pseudomonas aeruginosa as Biocatalyst »*
  J. Champavert, C. Innocent, L. Preziosi-Belloy, C. Ghommidh

Journées de l'électrochimie, Rome, Italie, Juillet 2015 :

- **Présentation orale :** *« Microbial Fuel Cells using Graphene Based Electrode »*
  J. Champavert, C. Innocent

Références

[1] N. Kosciusko -Morizet, "Le grenelle environnement - mémento à l'usage des maires," *Ministère l'Ecologie, du Développement durable, des Transp. du Logement*, 2010.

[2] Nations Unies, "Convention - cadre sur les changements climatiques," *Cop 21*, vol. 21930, 2015.

[3] M. C. Potter, "Electrical Effects Accompanying the Decomposition of Organic Compounds," *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.*, vol. 84, no. 571, pp. 260–276, 1911.

[4] International Energy Agengy, "2014 Key World Energy Statistics," 2014.

[5] EDF ENR, "Les types de panneaux solaires photovoltaiques." [Online]. Available: http://www.edfenr.com/le-photovoltaique/types-de-panneaux-solaires-n798-1.aspx. [Accessed: 02-Oct-2015].

[6] R. O'Hayre, S. Cha, W. Colella, and F. Prinz, *Fuel cell fundamentals*, John Wiley. New York, 2006.

[7] J. Larminie and A. Dicks, *Fuel Cell Systems Explained - Second Edition*, John Wiley. 2003.

[8] Office of Energy Efficiency & Renewable Energy, "fuel cells: types of fuel cells," 2009. [Online]. Available: http://energy.gov/eere/fuelcells/types-fuel-cells#pem fc. [Accessed: 02-Oct-2015].

[9] Y. Wang, K. S. Chen, J. Mishler, S. C. Cho, and X. C. Adroher, "A review of polymer electrolyte membrane fuel cells: Technology, applications, and needs on fundamental research," *Appl. Energy*, vol. 88, no. 4, pp. 981–1007, 2011.

[10] A. Kazim, "Introduction of PEM fuel-cell vehicles in the transportation sector of the United Arab Emirates," *Appl. Energy*, vol. 74, no. 1–2, pp. 125–133, 2003.

[11] P. Pei and H. Chen, "Main factors affecting the lifetime of Proton Exchange Membrane fuel cells in vehicle applications: A review," *Appl. Energy*, vol. 125, pp. 60–75, 2014.

[12] S. Tribot, "Piles à combustible: c'est pour aujourd'hui ou pour demain ?," *Techniques de l'ingénieurs*. [Online]. Available: http://www.techniques-ingenieur.fr/actualite/articles/piles-a-combustible-cest-pour-aujourdhui-ou-pour-demain-10121/. [Accessed: 05-Oct-2015].

[13] Energy Office of Energy Efficiency & Renewable, "Fuel Cells," 2015. [Online]. Available: http://energy.gov/sites/prod/files/2014/12/f19/fcto_myrdd_fuel_cells.pdf. [Accessed: 29-Jul-2015].

[14] W. Schmittinger and A. Vahidi, "A review of the main parameters influencing long-term performance and durability of PEM fuel cells," *J. Power Sources*, vol. 180, no. 1, pp. 1–14, 2008.

[15] S. Shahgaldi and J. Hamelin, "Improved carbon nanostructures as a novel catalyst support in the cathode side of PEMFC: a critical review," *Carbon N. Y.*, vol. 94, pp. 705–728, 2015.

[16] P. Atanassov, C. Apblett, S. Banta, S. Brozik, S. C. Barton, M. Cooney, B. Y. Liaw, S. Mukerjee, and S. D. Minteer, "Enzymatic Biofuel Cells," *elctrochemical Soc.*, pp. 28–31, 2007.

[17] H. Sakai, T. Nakagawa, Y. Tokita, T. Hatazawa, T. Ikeda, S. Tsujimura, and K. Kano, "A high-power glucose/oxygen biofuel cell operating under quiescent conditions," *Energy Environ. Sci.*, vol. 2, no. 1, pp. 133–138, 2009.

[18] A. Zebda, S. Cosnier, J.-P. Alcaraz, M. Holzinger, A. Le Goff, C. Gondran, F. Boucher, F. Giroud, K. Gorgy, H. Lamraoui, and P. Cinquin, "Single Glucose Biofuel Cells Implanted in Rats Power Electronic Devices.," *Sci. Rep.*, vol. 3, p. 1516, 2013.

[19] M. Falk, Z. Blum, and S. Shleev, "Direct electron transfer based enzymatic fuel cells," *Electrochim. Acta*, vol. 82, pp. 191–202, 2012.

[20] B. Cohen, "The Bacterial Culture as an Electrical Half-Cell," *J. Bacteriol.*, vol. 21, pp. 18–19, 1931.

[21] J. B. Davis and H. F. Yarbrough, "Preliminary Experiments on a Microbial Fuel Cell," *Virology*, pp. 1–2, 1962.

[22] R. S. Berk and J. H. Canfield, "Bioelectrochemical Energy Conversion.," *Appl. Microbiol.*, vol. 12, no. 1, pp. 10–12, 1964.

[23] H. P. Bennetto, J. L. Stirling, M. E. Dew, and K. Tanaka, "Rates of reduction of phenothiazine 'redox' dyes by *E. coli*," *Chem. Ind.*, pp. 776–8, 1981.

[24] C. F. Thurston, H. P. Bennetto, G. M. Delaney, J. R. Mason, S. D. Roller, and J. L. Stirling, "Glucose Metabolism in a Microbial Fuel Cell. Stoichiometry of Product Formation in a Thionine-mediated *Proteus vulgaris* Fuel Cell and its Relation to Coulombic Yields," *Microbiology*, vol. 131, no. 6, pp. 1393–1401, 1985.

[25] R. M. Allen and H. P. Bennetto, "Microbial fuel cells: Electricity production from carbohydrates," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 39, pp. 27–40, 1993.

[26] B. H. Kim, T. Ikeda, H. S. Park, H. J. Kim, M. S. Hyun, K. Kano, K. Takagi, and H. Tatsumi, "Electrochemical activity of an Fe(III)-reducing bacterium, *Shewanella putrefaciens* IR-1, in the presence of alternative electron acceptors," *Biotechnol. Tech.*, vol. 13, no. 7, pp. 475–478, 1999.

[27] B. H. Kim, D. H. Park, P. K. Shin, In Seop Chang, and H. J. Kim, "Mediator-less Biofuel Cell," Patent number 5 976 719, 1999.

[28] Z. Du, H. Li, and T. Gu, "A state of the art review on microbial fuel cells: A promising technology for wastewater treatment and bioenergy," *Biotechnol. Adv.*, vol. 25, pp. 464–482, 2007.

[29] R. M. Donlan, J. W. Costerton, R. M. Donlan, and J. W. Costerton, "Biofilms : Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms," *Clin. Microbiol.*, vol. 15, no. 2, pp. 167–193, 2002.

[30] J. W. Costerton, G. G. Geesey, and K.-J. Cheng, "How Bacteria Stick," *Sci. Am.*, vol. 238, no. 1, pp. 86–95, 1978.

[31] H. Flemming and J. Wingender, "The biofilm matrix," *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 8, no. 9, pp. 623–33, 2010.

[32] S. A. Makin and T. J. Beveridge, "The influence of A-band and B-band

lipopolysaccharide on the surface characteristics and adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to surfaces," *Microbiology*, vol. 142, no. 2, pp. 299–307, 1996.

[33] P. A. Suci, M. W. Mittelman, F. P. Yu, and G. G. Geesey, "Investigation of ciprofloxacin penetration into *Pseudomonas aeruginosa* biofilms," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 38, no. 9, pp. 2125–2133, 1994.

[34] P. Stoodley, K. Sauer, D. G. Davies, and J. W. Costerton, "Biofilms as complex differentiated communities.," *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 56, pp. 187–209, 2002.

[35] J. W. Costerton, P. S. Stewart, and E. P. Greenberg, "Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections.," *Science*, vol. 284, no. 5418, pp. 1318–1322, 1999.

[36] S. A. Banwart, S. Thornton, H. Rees, D. Lerner, R. Wilson, and M. Romero-Gonzalez, "In Situ Bioremediation by Natural Attenuation: from Lab to Field Scale," in *AIP Conference Proceedings*, 2007, vol. 898, pp. 207–210.

[37] S. Fuchs, T. Haritopoulou, and M. Wilhelmi, "Biofilms in freshwater ecosystems and their use as a pollutant monitor," *Water Sci. Technol.*, vol. 34, no. 7–8–8 pt 4, pp. 137–140, 1996.

[38] D. R. Bond, D. E. Holmes, L. M. Tender, and D. R. Lovley, "Electrode-reducing microorganisms that harvest energy from marine sediments.," *Science*, vol. 295, no. 5554, pp. 483–485, 2002.

[39] D. R. Bond and D. R. Lovley, "Electricity Production by *Geobacter sulfurreducens* Attached to Electrodes," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 69, no. 3, pp. 1548–1555, 2003.

[40] L. Lapinsonnière, "Contribution à l'évaluation et à l'optimisation des applications des systèmes microbio-électrochimiques : traitement des eaux, production d'électricité, bioélectrosynthèse," Université de Rennes 1, 2013.

[41] U. Schröder, "Anodic electron transfer mechanisms in microbial fuel cells and their energy efficiency.," *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 9, no. 21, pp. 2619–29, Jun. 2007.

[42] D. H. Park and J. G. Zeikus, "Electricity Generation in Microbial Fuel Cells Using Neutral Red as an Electronophore," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 66, no. 4, pp. 1292–1297, 2000.

[43] N. Kim, Y. Choi, S. Jung, and S. Kim, "Effect of initial carbon sources on the performance of microbial fuel cells containing *Proteus vulgaris*.," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 70, no. 1, pp. 109–114, 2000.

[44] A. K. Shukla, P. Suresh, S. Berchmans, and A. Rajendran, "Biological fuel cells and their aplications," *Curr. Sci.*, vol. 87, pp. 455–468, 2004.

[45] G. M. Delaney, H. P. Bennetto, J. R. Mason, S. D. Roller, J. L. Stirling, and C. F. Thurston, "Electron-transfer coupling in microbial fuel cells. 2. performance of fuel cells containing selected microorganism-mediator-substrate combinations," *J. Chem. Technol. Biotechnol. Biotechnol.*, vol. 34, no. 1, pp. 13–27, 1984.

[46] C. A. Vega and I. Fernandez, "Mediating Effect of Ferric Chelate Compounds in Microbial Fuel-Cells With *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus lactis*, and *Erwinia dissolvens*," *Bioelectrochemistry Bioenerg.*, vol. 17, no. 2, pp. 217–222, 1987.

[47] R. Rossi, A. Fedrigucci, and L. Setti, "Characterization of Electron Mediated Microbial Fuel Cell by *Saccharomyces cerevisiae*," vol. 43, pp. 337–342, 2015.

[48] M. Rahimnejad, G. D. Najafpour, A. A. Ghoreyshi, F. Talebnia, G. C. Premier, G. Bakeri, J. R. Kim, and S. E. Oh, "Thionine increases electricity generation from microbial fuel cell using *Saccharomyces cerevisiae* and exoelectrogenic mixed culture," *J. Microbiol.*, vol. 50, no. 4, pp. 575–580, 2012.

[49] M.-Y. Xi and Y.-P. Sun, "Preliminary study on *Escherichia coli* microbial fuel cell and on-electrode taming of the biocatalyst," *Chinese J. Process Eng.*, vol. 8, no. 6, pp. 1179–1184, 2008.

[50] I. A. Ieropoulos, J. Greenman, C. Melhuish, and J. Hart, "Comparative study of three types of microbial fuel cell," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 37, no. 2, pp. 238–245, 2005.

[51] D. K. Newman and R. Kolter, "A role for excreted quinones in extracellular electron transfer," *Nature*, vol. 405, no. 6782, pp. 94–7, 2000.

[52] S. K. Lower and T. J. Beveridge, "Bacterial Recognition of Mineral Surfaces : Nanoscale Interactions Between *Shewanella* and FeOOH," vol. 292, no. May, pp. 1360–1363, 2001.

[53] M. E. Hernandez, "Extracellular electron transfer," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 58, no. 11, pp. 1562–1571, 2001.

[54] U. Schröder, "Advanced Fuel Cells: Bioelectrochemical Fuel Cells," *Ref. Modul. Chem. Mol. Sci. Chem. Eng.*, no. January, pp. 1–10, 2014.

[55] K. Rabaey, N. Boon, S. D. Siciliano, W. Verstraete, and M. Verhaege, "Biofuel Cells Select for Microbial Consortia That Self-Mediate Electron Transfer," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 70, no. 9, pp. 5373–5382, 2004.

[56] W. Habermann and E. H. Pommer, "Biological fuel cells with sulphide storage capacity," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 35, no. 1, pp. 128–133, 1991.

[57] C. Leang, M. V Coppi, and D. R. Lovley, "OmcB , a c -Type Polyheme Cytochrome , Involved in Fe (III) Reduction in *Geobacter sulfurreducens*," vol. 185, no. 7, pp. 2096–2103, 2003.

[58] D. R. Lovley, "Microbial fuel cells: novel microbial physiologies and engineering approaches," *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 17, no. 3, pp. 327–332, 2006.

[59] S. K. Chaudhuri and D. R. Lovley, "Electricity generation by direct oxidation of glucose in mediatorless microbial fuel cells.," *Nat. Biotechnol.*, vol. 21, no. 10, pp. 1229–32, Oct. 2003.

[60] D. Holmes, J. Nicoll, D. Bond, and D. Lovley, "Potential Role of a Novel Psychrotolerant Member of the Family *Geobacteraceae* , *Geopsychrobacter electrodiphilus* gen . nov ., sp . nov ., in Electricity Production by a Marine Sediment Fuel Cell," *App Env. Microbiol*, vol. 70, no. 10, pp. 6023–6030, 2004.

[61] G. T. Kim, M. S. Hyun, I. S. Chang, H. J. Kim, H. S. Park, B. H. Kim, S. D. Kim, J. W. T. Wimpenny, and A. J. Weightman, "Dissimilatory Fe(III) reduction by an electrochemically active lactic acid bacterium phylogenetically related to *Enterococcus gallinarum* isolated from submerged soil," *J. Appl. Microbiol.*, vol. 99, no. 4, pp. 978–987, 2005.

[62] H. S. Park, B. H. Kim, H. S. Kim, H. J. Kim, G. T. Kim, M. Kim, I. S. Chang, Y. K. Park, and H. I. Chang, "A Novel Electrochemically Active and Fe(III)-reducing Bacterium Phylogenetically Related to *Clostridium butyricum* Isolated from a Microbial

Fuel Cell," *Anaerobe*, vol. 7, no. 6, pp. 297–306, Dec. 2001.

[63] C. A. Pham, S. J. Jung, N. T. Phung, J. Lee, I. S. Chang, B. H. Kim, H. Yi, and J. Chun, "A novel electrochemically active and Fe(III)-reducing bacterium phylogenetically related to *Aeromonas hydrophila*, isolated from a microbial fuel cell," *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 223, no. 1, pp. 129–134, 2003.

[64] B. R. Ringeisen, E. Henderson, P. K. Wu, J. Pietron, R. Ray, B. Little, J. C. Biffinger, and J. M. Jones-Meehan, "High power density from a miniature microbial fuel cell using *Shewanella oneidensis* DSP10.," *Environ. Sci. Technol.*, vol. 40, no. 8, pp. 2629–2634, 2006.

[65] G. Reguera, K. D. McCarthy, T. Mehta, J. S. Nicoll, M. T. Tuominen, and D. R. Lovley, "Extracellular electron transfer via microbial nanowires.," *Nature*, vol. 435, no. 7045, pp. 1098–1101, 2005.

[66] S. M. Strycharz-Glaven, R. M. Snider, A. Guiseppi-Elie, and L. M. Tender, "On the electrical conductivity of microbial nanowires and biofilms," *Energy Environ. Sci.*, vol. 4, no. 11, p. 4366, 2011.

[67] N. S. Malvankar, M. T. Tuominen, and D. R. Lovley, "Comment on 'On electrical conductivity of microbial nanowires and biofilms' by S. M. Strycharz-Glaven, R. M. Snider, A. Guiseppi-Elie and L. M. Tender, Energy Environ. Sci., 2011, 4, 4366," *Energy Environ. Sci.*, vol. 5, no. 3, p. 6247, 2012.

[68] S. B. R. Yuri A. Gorby, Svetlana Yanina, Jeffrey S. McLean, Kevin M. Rosso, Dianne Moyles, Alice Dohnalkova, Terry J. Beveridge, In Seop Chang, Byung Hong Kim, Kyung Shik Kim, David E. Culley and and J. K. F. Margaret F. Romine, Daad A. Saffarini, Eric A. Hill, Liang Shi, Dwayne A. Elias, David W. Kennedy, Grigoriy Pinchuk, Kazuya Watanabe, Shun'ichi Ishii, Bruce Logan, Kenneth H. Nealson, "Electrically conductive bacterial nanowires produced by *Shewanella oneidensis* strain MR-1 and other microorganisms," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 106, no. 23, p. 9535, 2009.

[69] B. H. Kim, H.-J. Kim, M.-S. Hyun, and D.-H. Park, "Direct Electrode reaction of Fe(III)-Reducing Bacterium, *Shewanella putrefaciens*," *J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 9, no. 2, pp. 127–131, 1999.

[70] B. R. Ringeisen, R. Ray, and B. Little, "A miniature microbial fuel cell operating with an aerobic anode chamber," *J. Power Sources*, vol. 165, no. 2, pp. 591–597, 2007.

[71] O. Bretschger, A. Obraztsova, C. a. Sturm, S. C. In, Y. a. Gorby, S. B. Reed, D. E. Culley, C. L. Reardon, S. Barua, M. F. Romine, J. Zhou, A. S. Beliaev, R. Bouhenni, D. Saffarini, F. Mansfeld, B. H. Kim, J. K. Fredrickson, and K. H. Nealson, "Current production and metal oxide reduction by *Shewanella oneidensis* MR-1 wild type and mutants," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 73, no. 21, pp. 7003–7012, 2007.

[72] B. E. Logan, "Exoelectrogenic bacteria that power microbial fuel cells," *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 7, pp. 375–381, 2009.

[73] B. Erable, L. Etcheverry, and A. Bergel, "Increased power from a two-chamber microbial fuel cell with a low-pH air-cathode compartment," *Electrochem. commun.*, vol. 11, no. 3, pp. 619–622, 2009.

[74] S. Parot, M. L. Délia, and A. Bergel, "Acetate to enhance electrochemical activity of biofilms from garden compost," *Electrochim. Acta*, vol. 53, no. 6, pp. 2737–2742, 2008.

[75] S. Parot, M. L. Délia, and A. Bergel, "Forming electrochemically active biofilms from garden compost under chronoamperometry," *Bioresour. Technol.*, vol. 99, no. 11, pp. 4809–4816, 2008.

[76] H. Liu, S. Cheng, and B. E. Logan, "Power generation in fed-batch microbial fuel cells as a function of ionic strength, temperature, and reactor configuration.," *Environ. Sci. Technol.*, vol. 39, no. 14, pp. 5488–93, 2005.

[77] B. Cercado-Quezada, M. L. Delia, and A. Bergel, "Testing various food-industry wastes for electricity production in microbial fuel cell," *Bioresour. Technol.*, vol. 101, no. 8, pp. 2748–2754, 2010.

[78] J.-Y. Nam, H.-W. Kim, K.-H. Lim, H.-S. Shin, and B. E. Logan, "Variation of power generation at different buffer types and conductivities in single chamber microbial fuel cells.," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 25, no. 5, pp. 1155–9, 2010.

[79] S. J. Dunaj, J. J. Vallino, M. E. Hines, M. Gay, C. Kobyljanec, and J. N. Rooney-Varga, "Relationships between soil organic matter, nutrients, bacterial community structure, and the performance of microbial fuel cells.," *Environ. Sci. Technol.*, vol. 46, no. 3, pp. 1914–22, 2012.

[80] D. H. Park and J. G. Zeikus, "Improved fuel cell and electrode designs for producing electricity from microbial degradation," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 81, no. 3, pp. 348–355, 2003.

[81] Z. He, S. D. Minteer, and L. T. Angenent, "Electricity Generation from Artificial Wastewater Using an Upflow Microbial Fuel Cell," *Environ. Sci. Technol.*, vol. 39, no. 14, pp. 5262–5267, 2005.

[82] D. Pocaznoi, "Optimisation d'anodes microbiennes à partir de lixiviat de sol pour la conception de piles à combustible microbiennes," Université de Toulouse, 2012.

[83] Y.-C. Yong, X.-Y. Wu, J.-Z. Sun, Y.-X. Cao, and H. Song, "Engineering quorum sensing signaling of *Pseudomonas* for enhanced wastewater treatment and electricity harvest: A review," *Chemosphere*, vol. 140, pp. 18–25, 2015.

[84] Y. C. Yong, Y. Y. Yu, C. M. Li, J. J. Zhong, and H. Song, "Bioelectricity enhancement via overexpression of quorum sensing system in *Pseudomonas aeruginosa*-inoculated microbial fuel cells," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 30, no. 1, pp. 87–92, 2011.

[85] T. H. Pham, N. Boon, P. Aelterman, P. Clauwaert, L. De Schamphelaire, L. Vanhaecke, K. De Maeyer, M. Höfte, W. Verstraete, and K. Rabaey, "Metabolites produced by *Pseudomonas* sp. enable a Gram-positive bacterium to achieve extracellular electron transfer," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 77, no. 5, pp. 1119–1129, 2008.

[86] K. Rabaey, N. Boon, M. Höfte, and W. Verstraete, "Microbial phenazine production enhances electron transfer in biofuel cells," *Environ. Sci. Technol.*, vol. 39, no. 9, pp. 3401–3408, 2005.

[87] H. B. Shen, X. Y. Yong, Y. L. Chen, Z. H. Liao, R. W. Si, J. Zhou, S. Y. Wang, Y. C. Yong, P. K. OuYang, and T. Zheng, "Enhanced bioelectricity generation by improving pyocyanin production and membrane permeability through sophorolipid addition in *pseudomonas aeruginosa*-inoculated microbial fuel cells," *Bioresour. Technol.*, vol. 167, pp. 490–494, 2014.

[88] B. Little, P. Wagner, and F. Mansfeld, "Microbiologically influenced corrosion of metals and alloys," *Int. Mater. Rev.*, vol. 36, no. 1, pp. 253–272, 1991.

[89] H. A. Videla and L. K. Herrera, "Understanding microbial inhibition of corrosion. A comprehensive overview," *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, vol. 63, no. 7, pp. 896–900, 2009.

[90] H. Liu, R. Ramnarayanan, and B. E. Logan, "Production of electricity during wastewater treatment using a single chamber microbial fuel cell.," *Environ. Sci. Technol.*, vol. 38, no. 7, pp. 2281–5, Apr. 2004.

[91] Y. Ahn and B. E. Logan, "Effectiveness of domestic wastewater treatment using microbial fuel cells at ambient and mesophilic temperatures," *Bioresour. Technol.*, vol. 101, no. 2, pp. 469–475, 2010.

[92] S. Ishii, K. Watanabe, S. Yabuki, B. E. Logan, and Y. Sekiguchi, "Comparison of electrode reduction activities of *Geobacter sulfurreducens* and an enriched consortium in an air-cathode microbial fuel cell," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 74, no. 23, pp. 7348–7355, 2008.

[93] J. R. Kim, J. Dec, M. A. Bruns, and B. E. Logan, "Removal of odors from Swine wastewater by using microbial fuel cells.," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 74, no. 8, pp. 2540–2543, 2008.

[94] H. J. Kim, H. S. Park, M. S. Hyun, I. S. Chang, M. Kim, and B. H. Kim, "A mediator-less microbial fuel cell using a metal reducing bacterium, *Shewanella putrefaciens*," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 30, no. 2, pp. 145–152, 2002.

[95] B. Wang and J. I. Han, "A single chamber stackable microbial fuel cell with air cathode," *Biotechnol. Lett.*, vol. 31, no. 3, pp. 387–393, 2009.

[96] C. Dumas, R. Basséguy, and A. Bergel, "Electrochemical activity of Geobacter sulfurreducens biofilms on stainless steel anodes," *Electrochim. Acta*, vol. 53, no. 16, pp. 5235–5241, 2008.

[97] G. Messina and S. Saveria, *Carbon - The futur material for advanced technology applications*, Springer. 2006.

[98] T. E. Rufford, J. Zhu, and D. Hulicova-Jurcakova, *Green carbon materials: advances and applications*, CRC Press. 2014.

[99] E. H. Falcao and E. H. Falcao, "Carbon allotropes: beyond graphite and diamond," *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, vol. 82, no. May, pp. 524–531, 2007.

[100] K. S. Novoselov, a K. Geim, S. V Morozov, D. Jiang, Y. Zhang, S. V Dubonos, I. V Grigorieva, and a a Firsov, "Electric field effect in atomically thin carbon films.," *Science*, vol. 306, no. 5696, pp. 666–669, 2004.

[101] D. Li and R. B. Kaner, "Graphene-based materials.," *Science (80-.).*, vol. 320, no. 5880, pp. 1170–1171, 2008.

[102] A. K. Geim, "Graphene: status and prospects.," *Science*, vol. 324, no. 5934, pp. 1530–1534, 2009.

[103] M. S. Dresselhaus and P. T. Araujo, "Perspectives on the 2010 nobel prize in physics for graphene," *ACS Nano*, vol. 4, no. 11, pp. 6297–6302, 2010.

[104] Q. Xiang, J. Yu, and M. Jaroniec, "Synergetic effect of MoS2 and graphene as cocatalysts for enhanced photocatalytic H2 production activity of TiO2 nanoparticles.," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 134, no. 15, pp. 6575–8, 2012.

[105] P. Nguyen and V. Berry, "Graphene interfaced with biological cells: Opportunities and challenges," *J. Phys. Chem. Lett.*, vol. 3, no. 8, pp. 1024–1029, 2012.

[106] T. Premkumar and K. E. Geckeler, "Graphene-DNA hybrid materials: Assembly, applications, and prospects," *Prog. Polym. Sci.*, vol. 37, no. 4, pp. 515–529, 2012.

[107] Y. Liu, X. Dong, and P. Chen, "Biological and chemical sensors based on graphene materials," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 41, no. 6, p. 2283, 2012.

[108] S. Goenka, V. Sant, and S. Sant, "Graphene-based nanomaterials for drug delivery and tissue engineering," *J. Control. Release*, vol. 173, no. 1, pp. 75–88, 2014.

[109] A. T. Lawal, "Synthesis and utilisation of graphene for fabrication of electrochemical sensors," *Talanta*, vol. 131, pp. 424–443, 2014.

[110] F. Bonaccorso, L. Colombo, G. Yu, M. Stoller, V. Tozzini, a C. Ferrari, R. S. Ruoff, and V. Pellegrini, "2D materials. Graphene, related two-dimensional crystals, and hybrid systems for energy conversion and storage," *Science (80-.).*, vol. 347, no. 6217, p. 1246501, 2015.

[111] C. Lee, X. Wei, J. W. Kysar, and J. Hone, "Measurement of the elastic properties and intrinsic strength of monolayer graphene.," *Science*, vol. 321, no. 5887, pp. 385–8, Jul. 2008.

[112] A. a. Balandin, S. Ghosh, W. Bao, I. Calizo, D. Teweldebrhan, F. Miao, and C. N. Lau, "Superior thermal conductivity of single-layer graphene," *Nano Lett.*, vol. 8, no. 3, pp. 902–907, 2008.

[113] K. Novoselov, "Graphene: The Magic of Flat Carbon," *Electrochem. Soc. Interface*, vol. 20, no. 1, pp. 45–46, 2011.

[114] C. Gómez-Navarro, R. T. Weitz, A. M. Bittner, M. Scolari, A. Mews, M. Burghard, and K. Kern, "Electronic transport properties of individual chemically reduced graphene oxide sheets.," *Nano Lett.*, vol. 9, no. 5, p. 2206, 2009.

[115] O. N. Ruiz, K. a S. Fernando, B. Wang, N. a. Brown, P. G. Luo, N. D. McNamara, M. Vangsness, Y. P. Sun, and C. E. Bunker, "Graphene oxide: a nonspecific enhancer of cellular growth," *ACS Nano*, vol. 5, no. 10, pp. 8100–8107, 2011.

[116] A. Bianco, "Graphene: Safe or toxic? the two faces of the medal," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 52, no. 19, pp. 4986–4997, 2013.

[117] F. Xia, D. B. Farmer, Y. M. Lin, and P. Avouris, "Graphene field-effect transistors with high on/off current ratio and large transport band gap at room temperature," *Nano Lett.*, vol. 10, no. 2, pp. 715–718, 2010.

[118] K. S. Novoselov, V. I. Fal′ko, L. Colombo, P. R. Gellert, M. G. Schwab, and K. Kim, "A roadmap for graphene," *Nature*, vol. 490, no. 7419, pp. 192–200, 2012.

[119] E. P. Randviir, D. a C. Brownson, and C. E. Banks, "A decade of graphene research: production, applications and outlook," *Mater. Today*, vol. 17, no. 9, pp. 426–432, 2014.

[120] Z. Ji, S. K. Doorn, and M. Sykora, "Electrochromic graphene molecules," *ACS Nano*, vol. 9, no. 4, pp. 4043–4049, 2015.

[121] H. Wang, K. Sun, F. Tao, D. J. Stacchiola, and Y. H. Hu, "3D honeycomb-like structured graphene and its high efficiency as a counter-electrode catalyst for dye-sensitized solar cells," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 52, no. 35, pp. 9210–9214, 2013.

[122] C. Deng, J. Chen, Z. Nie, and S. Si, "Biosensors and Bioelectronics A sensitive and stable biosensor based on the direct electrochemistry of glucose oxidase assembled layer-by-layer at the multiwall carbon nanotube-modified electrode," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 26, no. 1, pp. 213–219, 2010.

[123] K. S. Novoselov, D. Jiang, F. Schedin, T. J. Booth, V. V Khotkevich, S. V Morozov, and a K. Geim, "Two-dimensional atomic crystals.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, no. 30, pp. 10451–10453, 2005.

[124] D. a. C. Brownson and C. E. Banks, "The electrochemistry of CVD graphene: progress and prospects," *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 14, no. 23, p. 8264, 2012.

[125] S. Bae, H. Kim, Y. Lee, X. Xu, J.-S. Park, Y. Zheng, J. Balakrishnan, T. Lei, H. R. Kim, Y. Il Song, Y.-J. Kim, K. S. Kim, B. Ozyilmaz, J.-H. Ahn, B. H. Hong, and S. Iijima, "Roll-to-roll production of 30-inch graphene films for transparent electrodes.," *Nat. Nanotechnol.*, vol. 5, no. 8, pp. 574–578, 2010.

[126] M. Lotya, Y. Hernandez, P. J. King, R. J. Smith, V. Nicolosi, L. S. Karlsson, M. Blighe, S. De, Z. Wang, I. T. Mcgovern, G. S. Duesberg, J. N. Coleman, and F. M. Blighe, "Liquid Phase Production of Graphene by Exfoliation of Graphite in Surfactant / Water Solutions Liquid Phase Production of Graphene by Exfoliation of Graphite in Surfactant / Water Solutions," no. 11, pp. 3611–3620, 2009.

[127] M. Lotya, P. J. King, U. Khan, S. De, and J. N. Coleman, "High-Concentration, Surfactant- Stabilized Graphene Dispersions," *ACS Nano*, vol. 4, no. 6, pp. 3155–3162, 2010.

[128] V. Y. Aristov, G. Urbanik, K. Kummer, D. V. Vyalikh, O. V. Molodtsova, A. B. Preobrajenski, A. a. Zakharov, C. Hess, T. Hänke, B. Büchner, I. Vobornik, J. Fujii, G. Panaccione, Y. a. Ossipyan, and M. Knupfer, "Graphene synthesis on cubic SiC/Si wafers. Perspectives for mass production of graphene-based electronic devices," *Nano Lett.*, vol. 10, no. 3, pp. 992–995, 2010.

[129] W. S. Hummers and R. E. Offeman, "Preparation of Graphitic Oxide," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 80, no. 6, pp. 1339–1339, 1958.

[130] N. I. Kovtyukhova, P. J. Ollivier, B. R. Martin, T. E. Mallouk, S. a. Chizhik, E. V. Buzaneva, and A. D. Gorchinskiy, "Layer-by-Layer Assembly of Ultrathin Composite Films from Micron-Sized Graphite Oxide Sheets and Polycations," *Chem. Mater.*, vol. 11, no. 3, pp. 771–778, Mar. 1999.

[131] M. Acik, G. Lee, C. Mattevi, M. Chhowalla, K. Cho, and Y. J. Chabal, "Unusual infrared-absorption mechanism in thermally reduced graphene oxide.," *Nat. Mater.*, vol. 9, no. 10, pp. 840–845, 2010.

[132] J. Liu, Y. Qiao, C. X. Guo, S. Lim, H. Song, and C. M. Li, "Graphene/carbon cloth anode for high-performance mediatorless microbial fuel cells.," *Bioresour. Technol.*, vol. 114, pp. 275–80, Jun. 2012.

[133] J. Filip and J. Tkac, "Is graphene worth using in biofuel cells?," *Electrochim. Acta*, vol. 136, pp. 340–354, 2014.

[134] V. C. Tung, M. J. Allen, Y. Yang, and R. B. Kaner, "High-throughput solution processing of large-scale graphene.," *Nat. Nanotechnol.*, vol. 4, no. 1, pp. 25–29, 2009.

[135] W. Grosse, J. Champavert, S. Gambhir, G. G. Wallace, and S. E. Moulton, "Aqueous dispersions of reduced graphene oxide and multi wall carbon nanotubes for enhanced

glucose oxidase bioelectrode performance," *Carbon N. Y.*, vol. 61, pp. 467–475, Sep. 2013.

[136] a. Krishnamurthy, V. Gadhamshetty, R. Mukherjee, Z. Chen, W. Ren, H.-M. Cheng, and N. Koratkar, "Passivation of microbial corrosion using a graphene coating," *Carbon N. Y.*, vol. 56, pp. 45–49, May 2013.

[137] D. Prasai, J. C. Tuberquia, R. R. Harl, G. K. Jennings, and K. I. Bolotin, "Graphene: Corrosion-inhibiting coating," *ACS Nano*, vol. 6, no. 2, pp. 1102–1108, 2012.

[138] C. Feng, Z. Lv, X. Yang, and C. Wei, "Anode modification with capacitive materials for a microbial fuel cell: an increase in transient power or stationary power.," *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 16, no. 22, pp. 10464–72, 2014.

[139] J. Hou, Z. Liu, Y. Li, S. Yang, and Y. Zhou, "A comparative study of graphene-coated stainless steel fiber felt and carbon cloth as anodes in MFCs," *Bioprocess Biosyst. Eng.*, vol. 38, no. 5, pp. 881–888, 2015.

[140] Y.-X. Huang, X.-W. Liu, J.-F. Xie, G.-P. Sheng, G.-Y. Wang, Y.-Y. Zhang, A.-W. Xu, and H.-Q. Yu, "Graphene oxide nanoribbons greatly enhance extracellular electron transfer in bio-electrochemical systems.," *Chem. Commun. (Camb).*, vol. 47, no. 20, pp. 5795–5797, 2011.

[141] J. Tang, S. Chen, Y. Yuan, X. Cai, and S. Zhou, "In situ formation of graphene layers on graphite surfaces for efficient anodes of microbial fuel cells," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 71, pp. 387–395, 2015.

[142] J. Ahmed, Y. Yuan, L. Zhou, and S. Kim, "Carbon supported cobalt oxide nanoparticles–iron phthalocyanine as alternative cathode catalyst for oxygen reduction in microbial fuel cells," *J. Power Sources*, vol. 208, pp. 170–175, 2012.

[143] S. L. Edwards, R. Fogel, K. Mtambanengwe, C. Togo, R. Laubscher, and J. L. Limson, "Metallophthalocyanine/carbon nanotube hybrids: extending applications to microbial fuel cells," *J. Porphyr. Phthalocyanines*, vol. 16, no. 07n08, pp. 917–926, 2012.

[144] H. Rismani-yazdi, A. D. Christy, B. A. Dehority, M. Morrison, Z. Yu, and O. H. Tuovinen, "Electricity Generation From Cellulose by Rumen Microorganisms in Microbial Fuel Cells," vol. 97, no. 6, pp. 1398–1407, 2007.

[145] N. Sehlotho and T. Nyokong, "Effects of ring substituents on electrocatalytic activity of manganese phthalocyanines towards the reduction of molecular oxygen," *J. Electroanal. Chem.*, vol. 595, no. 2, pp. 161–167, 2006.

[146] J. H. Zagal, S. Griveau, J. F. Silva, T. Nyokong, and F. Bedioui, "Metallophthalocyanine-based molecular materials as catalysts for electrochemical reactions," *Coord. Chem. Rev.*, vol. 254, no. 23–24, pp. 2755–2791, 2010.

[147] J. P. D. J. H. Zagal, F. Bedioui, "N4-Macrocyclic Metal Complexes," *Springer, New York*, no. 0, 2006.

[148] M. Pontié, L. Sikpo, G. Thouand, R. Lahan, I. Tapsoba, R. Mallet, and T. Feng, "Direct Electroanalysis of p-Nitrophenol (PNP) in Estuarine and Surface Waters by a High Sensitive Type C/p-NiTSPc Coating Carbon Fiber Microelectrode (CFME)," *Electroanalysis*, vol. 23, no. 2, pp. 433–441, 2011.

[149] S.-E. Oh and B. E. Logan, "Proton exchange membrane and electrode surface areas as factors that affect power generation in microbial fuel cells.," *Appl. Microbiol.*

Biotechnol., vol. 70, no. 2, pp. 162–9, Mar. 2006.

[150] A. L. He Z, Wagner N, Minteer SD, "An upflow microbial fuel cell with an interior cathode: assessment of the internalresistance by impedance spectroscopy.," *Env. Sci Technol*, vol. 40, no. 17, pp. 5212–7., 2006.

[151] B. Min and B. E. Logan, "Continuous electricity generation from domestic wastewater and organic substrates in a flat plate microbial fuel cell.," *Environ. Sci. Technol.*, vol. 38, no. 21, pp. 5809–14, Nov. 2004.

[152] Z. Du, H. Li, and T. Gu, "A state of the art review on microbial fuel cells: A promising technology for wastewater treatment and bioenergy," *Biotechnol. Adv.*, vol. 25, no. 5, pp. 464–482, 2007.

[153] V. Neburchilov, H. Wang, J. J. Martin, and W. Qu, "A review on air cathodes for zinc-air fuel cells," *J. Power Sources*, vol. 195, no. 5, pp. 1271–1291, 2010.

[154] Y. Li, M. Gong, Y. Liang, J. Feng, J. E. Kim, H. Wang, G. Hong, B. Zhang, and H. Dai, "Advanced zinc-air batteries based on high-performance hybrid electrocatalysts," *Nat Commun*, vol. 4, no. May, p. 1805, 2013.

[155] G.-C. Gil, I.-S. Chang, B. H. Kim, M. Kim, J.-K. Jang, H. S. Park, and H. J. Kim, "Operational parameters affecting the performannce of a mediator-less microbial fuel cell," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 18, no. 4, pp. 327–334, Apr. 2003.

[156] K. Rabaey, G. Lissens, S. D. Siciliano, and W. Verstraete, "A microbial fuel cell capable of converting glucose to electricity at high rate and efficiency.," *Biotechnol. Lett.*, vol. 25, no. 18, pp. 1531–5, Sep. 2003.

[157] P. Aelterman, K. Rabaey, H. T. Pham, N. Boon, and W. Verstraete, "Continuous electricity generation at high voltages and currents using stacked microbial fuel cells," *Environ. Sci. Technol.*, vol. 40, no. 10, pp. 3388–3394, 2006.

[158] S. E. Oh and B. E. Logan, "Voltage reversal during microbial fuel cell stack operation," *J. Power Sources*, vol. 167, no. 1, pp. 11–17, 2007.

[159] L. Zhuang, Y. Yuan, Y. Wang, and S. Zhou, "Long-term evaluation of a 10-liter serpentine-type microbial fuel cell stack treating brewery wastewater," *Bioresour. Technol.*, vol. 123, pp. 406–412, 2012.

[160] H. Liu, S. Grot, and B. E. Logan, "Electrochemically assisted microbial production of hydrogen from acetate.," *Environ. Sci. Technol.*, vol. 39, no. 11, pp. 4317–20, 2005.

[161] B. H. Kim, H. S. Park, H. J. Kim, G. T. Kim, I. S. Chang, J. Lee, and N. T. Phung, "Enrichment of microbial community generating electricity using a fuel-cell-type electrochemical cell," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 63, no. 6, pp. 672–681, 2004.

[162] I. Shizas and D. M. Bagley, "Experimental Determination of Energy Content of Unknown Organics in Municipal Wastewater Streams," *J. Energy Eng.*, vol. 130, no. 2, pp. 45–53, 2004.

[163] Unesco, "Water in a Changing World," 2009.

[164] M. a Shannon, P. W. Bohn, M. Elimelech, J. G. Georgiadis, B. J. Mariñas, and A. M. Mayes, "Science and technology for water purification in the coming decades," *Nature*, vol. 452, no. 7185, pp. 301–10, 2008.

[165] X. Cao, X. Huang, P. Liang, K. Xiao, Y. Zhou, X. Zhang, and B. E. Logan, "A New

Method for Water Desalination Using Microbial Desalination Cells," *Environ. Sci. Technol.*, vol. 43, no. 18, pp. 7148–7152, 2009.

[166] H. Wang and Z. J. Ren, "A comprehensive review of microbial electrochemical systems as a platform technology," *Biotechnol. Adv.*, vol. 31, no. 8, pp. 1796–1807, 2013.

[167] H. Luo, P. E. Jenkins, and Z. Ren, "Concurrent desalination and hydrogen generation using microbial electrolysis and desalination cells," *Environ. Sci. Technol.*, vol. 45, no. 1, pp. 340–344, 2011.

[168] M. Mehanna, P. D. Kiely, D. F. Call, and B. E. Logan, "Microbial Desalination Cell for Simultaneous Water Desalination and Energy Production," *Env. Sci Technol*, vol. 44, no. Figure 1, pp. 1–10, 2010.

[169] F. Zhang and Z. He, "Scaling up microbial desalination cell system with a post-aerobic process for simultaneous wastewater treatment and seawater desalination," *Desalination*, vol. 360, pp. 28–34, 2015.

[170] D. Das and T. N. Veziroglu, "Advances in biological hydrogen production processes," *Int. J. Hydrogen Energy*, vol. 33, no. 21, pp. 6046–6057, 2008.

[171] D. Call and B. E. Logan, "Hydrogen production in a single chamber microbial electrolysis cell lacking a membrane," *Environ. Sci. Technol.*, vol. 42, no. 9, pp. 3401–3406, 2008.

[172] B. E. Logan, S. Grot, T. Mallouk, and H. Liu, "Bio-electrochemically assisted microbial reactor that generates hydrogen gas and method of generating hydrogen gas," 2010.

[173] C. Dai and S. Choi, "Technology and Applications of Microbial Biosensor," *Open J. Appl. Biosens.*, vol. 02, no. 03, pp. 83–93, 2013.

[174] B. H. Kim, I. S. Chang, G. C. Gil, H. S. Park, and H. J. Kim, "Novel BOD (biological oxygen demand) sensor using mediator-less microbial fuel cell," *Biotechnol. Lett.*, vol. 25, no. 7, pp. 541–545, 2003.

[175] Y. Zhang and I. Angelidaki, "A simple and rapid method for monitoring dissolved oxygen in water with a submersible microbial fuel cell (SBMFC)," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 38, no. 1, pp. 189–194, 2012.

[176] K. B. Gregory, D. R. Bond, and D. R. Lovley, "Graphite electrodes as electron donors for anaerobic respiration," *Environ. Microbiol.*, vol. 6, no. 6, pp. 596–604, 2004.

[177] C. Dumas, R. Basséguy, and A. Bergel, "Microbial electrocatalysis with *Geobacter sulfurreducens* biofilm on stainless steel cathodes," *Electrochim. Acta*, vol. 53, no. 5, pp. 2494–2500, 2008.

[178] L. Pons, M. L. Délia, R. Basséguy, and A. Bergel, "Effect of the semi-conductive properties of the passive layer on the current provided by stainless steel microbial cathodes," *Electrochim. Acta*, vol. 56, no. 6, pp. 2682–2688, 2011.

[179] K. B. Gregory and D. R. Lovley, "Remediation and recovery of uranium from contaminated subsurface environments with electrodes.," *Environ. Sci. Technol.*, vol. 39, no. 22, pp. 8943–7, 2005.

[180] M. H. M. Nor, M. F. M. Mubarak, H. S. A. Elmi, N. Ibrahim, M. F. A. Wahab, and Z. Ibrahim, "Bioelectricity generation in microbial fuel cell using natural microflora and isolated pure culture bacteria from anaerobic palm oil mill effluent sludge," *Bioresour. Technol.*, vol. 190, pp. 458–465, 2015.

[181] V. J. Watson and B. E. Logan, "Power production in MFCs inoculated with *Shewanella oneidensis* MR-1 or mixed cultures," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 105, no. 3, pp. 489–498, 2010.

[182] G.-W. Chen, S.-J. Choi, T.-H. Lee, G.-Y. Lee, J.-H. Cha, and C.-W. Kim, "Application of biocathode in microbial fuel cells: cell performance and microbial community.," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 79, no. 3, pp. 379–88, 2008.

[183] L. M. Tender, S. a. Gray, E. Groveman, D. a. Lowy, P. Kauffman, J. Melhado, R. C. Tyce, D. Flynn, R. Petrecca, and J. Dobarro, "The first demonstration of a microbial fuel cell as a viable power supply: Powering a meteorological buoy," *J. Power Sources*, vol. 179, no. 2, pp. 571–575, 2008.

[184] D. Li, M. B. Müller, S. Gilje, R. B. Kaner, and G. G. Wallace, "Processable aqueous dispersions of graphene nanosheets.," *Nat. Nanotechnol.*, vol. 3, no. 2, pp. 101–5, Feb. 2008.

[185] W. Guo, Y. Cui, H. Song, and J. Sun, "Layer-by-layer construction of graphene-based microbial fuel cell for improved power generation and methyl orange removal.," *Bioprocess Biosyst. Eng.*, Feb. 2014.

[186] A. J. Bard and L. R. Faulkner, *Electrochemical methods: Fundamentals and applications*, 2nd editio. 2001.

[187] C. Zoski, *Handbook of Electrochemistry*, Elsevier. 2006.

[188] C. Feng, L. Ma, F. Li, H. Mai, X. Lang, and S. Fan, "A polypyrrole/anthraquinone-2,6-disulphonic disodium salt (PPy/AQDS)-modified anode to improve performance of microbial fuel cells.," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 25, no. 6, pp. 1516–20, Feb. 2010.

[189] G. Binnig and C. F. Quate, "Atomic Force Microscope," *Phys. Rev. Lett.*, vol. 56, no. 9, pp. 930–933, 1986.

[190] H. Stanjek and W. Häusler, "Basics of X-ray diffraction," *Hyperfine Interact.*, vol. 154, pp. 107–119, 2004.

[191] R. C. Chastain, J., & King, *Handbook of X-ray photoelectron spectroscopy: a reference book of standard spectra for identification and interpretation of XPS data*. Perkin-Elmer, 1992.

[192] D. C. Harris, *Quantitative Chemical Analysis*, Seventh Ed., vol. 42, no. 5. 2007.

[193] P. Trambouze and J. P. Euzen, *Les réacteurs chimiques: de la conception à la mise en oeuvre*, Editions T. 2002.

[194] P. Khalilzadeh, "Formation de Biofilm à *Pseudomonas aeruginosa* : évaluation d'inhibiteurs potentiels du Quorum Sensing," Université de Toulouse III, 2009.

[195] N. Nelson, "A photometric adaptation of the somogyi method for the determination of glucose," *J. Biol. Chem.*, vol. 153, no. 2, pp. 375–380, 1944.

[196] M. Somogyi, "Notes on sugar determination," *J. Biol. Chem.*, pp. 19–23, 1952.

[197] A. D. Brown, "Some general properties of a psychrophilic pseudomonad: the effects of temperature on some of these properties and the utilization of glucose by this organism and *Pseudomonas aeruginosa*," *J. Gen. Microbiol.*, vol. 17, no. 0, pp. 640–648, 1957.

[198] B. Cercado Quezada, "Traitement de déchets issus de l'industrie agro-alimentaire par pile à combustible microbienne," Université de Toulouse, 2009.

[199] Y. R. J. Thomas, M. Picot, A. Carer, O. Berder, O. Sentieys, and F. Barrière, "A single sediment-microbial fuel cell powering a wireless telecommunication system," *J. Power Sources*, vol. 241, pp. 703–708, 2013.

[200] G.-H. Xu, Y.-K. Wang, G.-P. Sheng, Y. Mu, and H.-Q. Yu, "An MFC-based online monitoring and alert system for activated sludge process.," *Sci. Rep.*, vol. 4, p. 6779, 2014.

[201] C. Rivalland, S. Madhkour, P. Salvin, and F. Robert, "Electrochemical and microbial monitoring of multi-generational electroactive biofilms formed from mangrove sediment," *Bioelectrochemistry*, vol. 106, pp. 125–132, 2015.

[202] B. Cercado, N. Byrne, M. Bertrand, D. Pocaznoi, M. Rimboud, W. Achouak, and A. Bergel, "Garden compost inoculum leads to microbial bioanodes with potential-independent characteristics.," *Bioresour. Technol.*, vol. 134, pp. 276–84, Apr. 2013.

[203] S. Parot, "Biofilms électroactifs: formation, caractérisation et mécanismes," Université de Toulouse, 2007.

[204] D. Pocaznoi, A. Calmet, L. Etcheverry, B. Erable, and A. Bergel, "Stainless steel is a promising electrode material for anodes of microbial fuel cells," *Energy Environ. Sci.*, vol. 5, no. 11, p. 9645, 2012.

[205] Y. Shao, J. Wang, M. Engelhard, C. Wang, and Y. Lin, "Facile and controllable electrochemical reduction of graphene oxide and its applications," *J. Mater. Chem.*, vol. 20, no. 4, p. 743, 2010.

[206] K. S. B. De Silva, S. Gambhir, X. L. Wang, X. Xu, W. X. Li, D. L. Officer, D. Wexler, G. G. Wallace, and S. X. Dou, "The effect of reduced graphene oxide addition on the superconductivity of MgB2," *J. Mater. Chem.*, vol. 22, no. 28, p. 13941, 2012.

[207] K. SHENG, Y. XU, C. LI, and G. SHI, "High-performance self-assembled graphene hydrogels prepared by chemical reduction of graphene oxide," *New Carbon Mater.*, vol. 26, no. 1, pp. 9–15, Jan. 2011.

[208] J. T. Robinson, F. K. Perkins, E. S. Snow, Z. Wei, and P. E. Sheehan, "Reduced graphene oxide molecular sensors," *Nano Lett.*, vol. 8, no. 10, pp. 3137–3140, 2008.

[209] C. Mattevi, G. Eda, S. Agnoli, S. Miller, K. A. Mkhoyan, O. Celik, D. Mastrogiovanni, C. Cranozzi, E. Carfunkel, and M. Chhowalla, "Evolution of electrical, chemical, and structural properties of transparent and conducting chemically derived craphene thin films," *Adv. Funct. Mater.*, vol. 19, no. 16, pp. 2577–2583, 2009.

[210] Z. Xu and C. Gao, "Graphene chiral liquid crystals and macroscopic assembled fibres.," *Nat. Commun.*, vol. 2, p. 571, 2011.

[211] S. Gilje, R. B. Kaner, G. G. Wallace, D. A. N. Li, and M. B. Mu, "Processable aqueous dispersions of graphene nanosheets," pp. 101–105, 2008.

[212] H. Gu, Y. Yu, X. Liu, B. Ni, T. Zhou, and G. Shi, "Layer-by-layer self-assembly of functionalized graphene nanoplates for glucose sensing in vivo integrated with on-line microdialysis system.," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 32, no. 1, pp. 118–26, Feb. 2012.

[213] M. B. Müller, "Chemically Converted Graphene Dispersions and Graphene Films," University of Wollongong, 2011.

[214] W. Teughels, N. Van Assche, I. Sliepen, and M. Quirynen, "Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development," *Clin. Oral Implants*

Res., vol. 17, pp. 68–81, 2006.

[215] F. Song, H. Koo, and D. Ren, "Effects of Material Properties on Bacterial Adhesion and Biofilm Formation," *J. Dent. Res.*, pp. 1–8, 2015.

[216] F. Habouzit, G. Gévaudan, J. Hamelin, J. P. Steyer, and N. Bernet, "Influence of support material properties on the potential selection of *Archaea* during initial adhesion of a methanogenic consortium," *Bioresour. Technol.*, vol. 102, no. 5, pp. 4054–4060, 2011.

[217] C. Dumas, A. Mollica, D. Féron, R. Basséguy, L. Etcheverry, and A. Bergel, "Marine microbial fuel cell: Use of stainless steel electrodes as anode and cathode materials," *Electrochim. Acta*, vol. 53, no. 2, pp. 468–473, Dec. 2007.

[218] S. Dulon, S. Parot, M.-L. Delia, and A. Bergel, "Electroactive biofilms: new means for electrochemistry," *J. Appl. Electrochem.*, vol. 37, no. 1, pp. 173–179, Oct. 2007.

[219] B. Cercado-Quezada, M. L. Delia, and A. Bergel, "Treatment of dairy wastes with a microbial anode formed from garden compost," *J. Appl. Electrochem.*, vol. 40, no. 2, pp. 225–232, 2010.

[220] B. E. Logan, *Microbial Fuel Cells*, Wiley. 2008.

[221] F. Bedioui, G. Gomez, and C. Bied-charreton, "Electropolymerized nickel macrocyclic complex-based films : design and electrocatalytic application," vol. 7, no. 216, pp. 923–928, 1997.

[222] M. Pontie, H. Lecture, and F. Bedioui, "Improvement in the performance of a nickel complex-based electrochemical sensor for the detection of nitric oxide in solution," *Sensors Actuators B Chem.*, vol. 56, no. 1–2, pp. 1–5, Jul. 1999.

[223] A. Y. Obaid, E. H. El-Mossalamy, S. A. Al-Thabaiti, I. S. El-Hallag, A. A. Hermas, and A. M. Asiri, "Electrodeposition and characterization of polyaniline on stainless steel surface via cyclic, convolutive voltammetry and SEM in aqueous acidic solutions," *Int. J. Electrochem. Sci.*, vol. 9, no. 2, pp. 1003–1015, 2014.

[224] M. S. Ureta-Zañartu, A. Alarcón, C. Berríos, G. I. Cárdenas-Jirón, J. Zagal, and C. Gutiérrez, "Electropreparation and characterization of polyNiTSPc films. An EQCM study," *J. Electroanal. Chem.*, vol. 580, no. 1, pp. 94–104, Jun. 2005.

[225] S. E. Oh, J. R. Kim, J. H. Joo, and B. E. Logan, "Effects of applied voltages and dissolved oxygen on sustained power generation by microbial fuel cells," *Water Sci. Technol.*, vol. 60, no. 5, pp. 1311–1317, 2009.

[226] A. Cournet, M. Bergé, C. Roques, A. Bergel, and M. L. Délia, "Electrochemical reduction of oxygen catalyzed by *Pseudomonas aeruginosa*," *Electrochim. Acta*, vol. 55, no. 17, pp. 4902–4908, 2010.

[227] H. Beyenal and A. Tanyolaç, "A combined growth model of *Zoogloea ramigera* including multisubstrate, pH, and agitation effects," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 21, no. 2, pp. 74–78, 1997.

[228] DuPont, "DuPont Fuel Cells Nafion PFSA Membranes," 2009.

[229] G. Gritzner, *Handbook of Reference Electrodes*. 2013.

[230] B. Lai, S. Yu, P. V. Bernhardt, K. Rabaey, B. Virdis, and J. O. Krömer, "Anoxic metabolism and biochemical production in Pseudomonas putida F1 driven by a bioelectrochemical system," *Biotechnol. Biofuels*, vol. 9, no. 1, p. 39, 2016.

[231] J. P. Folsom, L. Richards, B. Pitts, F. Roe, G. D. Ehrlich, A. Parker, A. Mazurie, and P. S. Stewart, "Physiology of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms as revealed by transcriptome analysis," *BMC Microbiol.*, vol. 10, no. 1, p. 294, 2010.

[232] A. Delille, "Etude in situ, par spectroscopie infrarouge en mode ATR, des premières étapes de la formation d'un biofilm de *Pseudomonas fluorescens* et de sa réponse aux variations de la quantité de carbone organique dissous : application à la détection précoce d," Université Henri Poincaré, Nancy I, 2014.

[233] A. L. Ahmad, S. Ismail, and S. Bhatia, "Water recycling from palm oil mill effluent (POME) using membrane technology," *Desalination*, vol. 157, no. 1–3, pp. 87–95, 2003.

[234] J. Cheng, X. Zhu, J. Ni, and A. Borthwick, "Palm oil mill effluent treatment using a two-stage microbial fuel cells system integrated with immobilized biological aerated filters.," *Bioresour. Technol.*, vol. 101, no. 8, pp. 2729–34, Apr. 2010.

Résumé / Abstract

Résumé

Les biopiles microbiennes sont des sources d'énergie renouvelables utilisant des bactéries qui convertissent une énergie chimique en électricité. Pour cela, l'anode doit collecter les électrons issus des microorganismes. La sélection d'un matériau d'anode possédant de grandes performances est d'une importance cruciale dans la construction d'une biopile microbienne. Le graphène est considéré comme un matériau prometteur avec de grandes possibilités d'application dans de nombreux domaines tels que les batteries Li-ion, les cellules photovoltaïques et les super condensateurs électrochimiques en raison de sa structure nanométrique. Ainsi, la modification de surface par de l'oxyde de graphène réduit a été appliquée à la construction d'anodes pour biopiles microbiennes. La cathode abiotique a aussi été étudiée puisqu'elle présente souvent une limitation cinétique vis-à-vis de la réduction de l'oxygène. Les potentialités des complexes organométalliques, et en particulier les phthalocyanines de nickel, ont été étudiés et appliquées à la construction d'une cathode pour biopile. Ainsi, une biopile hybride à deux compartiments a été construite en combinant une bioanode en mousse d'acier inoxydable modifiée par de l'oxyde de graphène réduit et une cathode en feutre de carbone modifiée avec de la phthalocyanine de nickel. La biopile microbienne ainsi construite utilise du lixiviat de terreau, comme source de microorganismes, pour le développement d'un biofilm électroactif à l'anode et présente une bonne stabilité dans le temps. Le graphène a permis d'obtenir une densité de puissance stable pendant une période 40 jours (24,8 mW/m² en présence d'oxygène pur). La cathode présentée dans ce travail a permis d'obtenir une densité de puissance supérieure à une cathode de platine (7,5 fois supérieur). Par ailleurs, un nouveau design de biopile à deux compartiments a été construit, afin de produire de l'électricité à partir d'une souche pure : *Pseudomonas aeruginosa* qui est connu pour la formation de biofilm électroactif. Un nouveau design a été proposé, permettant de travailler avec une alimentation constante et non plus en batch comme cela se fait de manière classique. Cette configuration permet de ne plus avoir de diminution de courant liée à un manque d'apport en carburant. Différents paramètres ont ainsi été explorés tels que le débit d'alimentation, la consommation en glucose dans le compartiment anodique, la variation de pH au cours du temps ainsi que l'évolution de la biomasse. Une première approche d'étude de corrélation de ces différents paramètres est proposée.

Abstract

Microbial fuel cell (MFC) has been considered as a renewable energy source which uses bacteria to convert chemical energy into electricity. Since the anode, as the electron acceptor for the electroactive bacteria, directly interacts with microorganisms, the selection of high performance anode materials is of crucial importance in the design of a MFC. Recently, graphene has been considered as the intriguing material, attracting strong scientific and technological interest with great application potentials in various fields, such as lithium ion batteries, solar cells and electrochemical super-capacitors, for its unique nanostructure and extraordinary properties. Therefore, surface modification using reduced graphene oxide has been investigated for the construction of anodes. An abiotic cathode has also been investigated since it often has a kinetic limitation regarding the oxygen reduction reaction. The potential of the use of organometallics complexes, and more particularly nickel phthalocyanines (poly-NiTSPc), has been studied and applied to the fabrication of cathodes for biofuel cells applications. Thereby, a dual chamber hybrid MFC has been constructed combining a reduced graphene oxide modified bioanode with a chemical poly-NiTSPc modified carbon felt cathode. This MFC uses compost garden leachate, as source of microorganisms, for the growth of an electroactive biofilm onto the anode and presents an excellent lifetime. Indeed, graphene allowed to obtain a power density stable for 40 days (24,8 mW/m² with pure oxygen). When the modified carbon felt was used as cathode, the power densities obtained were 7,5 higher than the use of platinum cathode. Furthermore, a new design of a dual chamber MFC has been built up in order to work with a constant flow to supply continuously substrates to the biofilm formed onto the anode from a pure strain, *Pseudomonas aeruginosa*, and to avoid to work in a batch as it is usually done. The interest of this configuration is to prevent any current loss due to a lack in supply of substrates. Using this bioreactor as a MFC, different parameters have been explored such as the feed rate and the glucose consumption in the anodic compartment, the evolution of the pH as well as the biomass between the entrance and the exit of the chamber. A first study of the correlation between all these parameters has been proposed.