



**HAL**  
open science

# Procédé électro-microbien pour le traitement des eaux usées domestiques

Morgane Hoareau

► **To cite this version:**

Morgane Hoareau. Procédé électro-microbien pour le traitement des eaux usées domestiques. Autre. Institut National Polytechnique de Toulouse - INPT, 2021. Français. NNT: 2021INPT0047. tel-04170707

**HAL Id: tel-04170707**

**<https://theses.hal.science/tel-04170707v1>**

Submitted on 25 Jul 2023

**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.



Université  
de Toulouse

# THÈSE

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

**Délivré par :**

Institut National Polytechnique de Toulouse (Toulouse INP)

**Discipline ou spécialité :**

Génie des Procédés et de l'Environnement

---

**Présentée et soutenue par :**

Mme MORGANE HOAREAU

le lundi 3 mai 2021

**Titre :**

Procédé électro-microbien pour le traitement des eaux usées domestiques

---

**Ecole doctorale :**

Mécanique, Energétique, Génie civil, Procédés (MEGeP)

**Unité de recherche :**

Laboratoire de Génie Chimique ( LGC)

**Directeur(s) de Thèse :**

M. ALAIN BERGEL

M. BENJAMIN ERABLE

**Rapporteurs :**

MME LAURENCE SOUSSAN, ECOLE NLE SUP DE CHIMIE DE MONTPELLIER

M. NICOLAS BERNET, INRAE NARBONNE

**Membre(s) du jury :**

M. ETIENNE PAUL, INSA TOULOUSE, Président

M. ALAIN BERGEL, TOULOUSE INP, Membre

M. BENJAMIN ERABLE, TOULOUSE INP, Membre

M. SAM AZIMI, SIAAP, Membre

M. THÉODORE BOUCHEZ, INRAE ANTHONY, Membre

M. YANNICK FAYOLLE, INRAE ANTHONY, Membre



## Remerciements

Les travaux présentés au sein de ce manuscrit de thèse ont été menés au sein de l'équipe biofilm du département Bioprocédés et Systèmes Microbiens du Laboratoire de Génie Chimique, sous la tutelle de l'Institut National Polytechnique de Toulouse.

Je tiens en premier lieu à remercier mes directeurs de thèse, Alain Bergel et Benjamin Erable. Alain, tout d'abord, que je remercie de m'avoir fait confiance pour le développement du biotuba, malgré mon manque de connaissances initial en électrochimie. Merci pour ton accueil, je me souviens encore des premiers instants de découverte du laboratoire à tes côtés. Merci ensuite pour ton accompagnement tout au long de la thèse, ton soutien et ton enthousiasme sans faille. Tu as la faculté de trouver du positif dans tout résultat, faculté que j'espère avoir pu acquérir au cours de ces trois années. Benjamin je te remercie aussi pour tout ce que tu as pu apporter au cours de cette thèse. Merci d'avoir été réactif à chaque « je crois que j'ai un problème sur la manip, tu peux venir voir ? » et d'avoir trouvé des solutions à chaque fois. Merci aussi pour toutes les discussions et réunions, ponctuées par tes idées toujours très novatrices et permettant d'enrichir le projet. Enfin je vous remercie tous les deux, en tant que duo de directeurs, la complémentarité de vos compétences et points de vue a permis de rendre chaque échange hautement instructif pour moi et prolifique pour le projet.

Je remercie aussi les partenaires du projet ANR Biotuba, coordonné par Yannick Fayolle de l'unité Prose de l'INRAE Anthony, le SIAAP et 6TMIC pour leurs différentes contributions. Merci tout particulièrement à Olivier Chapleur et Cédric Midoux de l'INRAE pour le traitement de données des analyses de population. Merci à Valentin, de 6TMIC, qui a découpé tous ces petits cubes de bois pour l'électrode volumique. Merci aussi à Francesca Soavi de l'Université de Bologne pour les matériaux capacitifs, ainsi qu'à Hugo Terol, stagiaire de Master 2, qui les a mis en application et a permis d'ouvrir de nouvelles perspectives.

Je remercie les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer cette thèse. Merci à Laurence Soussan et Nicolas Bernet d'avoir accepté d'en être les rapporteurs. Merci aussi à Etienne Paul, Yannick Fayolle, Sam Azimi et Théodore Bouchez d'avoir accepté d'en être les examinateurs.

Je tiens aussi à remercier les membres de l'équipe biofilm. Régine et Marie-Line tout d'abord pour leur bonne humeur et leurs conseils avisés. Merci aussi pour toutes les petites discussions autour de La Réunion, me permettant chaque fois de m'évader quelques instants vers mon île natale. J'ajoute une mention spéciale pour Luc, qui, en plus de son aide sur les dispositifs expérimentaux, m'a accompagnée un nombre incalculable de fois à la STEP de Castanet-Tolosan récupérer des litres et des litres d'eaux usées.

Plus largement au sein du LGC, je tiens à remercier Marie-Line de Solan, du SAP, qui m'a accompagnée pour les observations au MEB. Merci aux équipes informatique, technique

et administrative, plus particulièrement à Agathe Juppeau, Alain Philip, Danièle Bouscary, Christine Taurines, Claudine Laurenzon, Patricia Uliana et Brice Vouillarmet. Merci aussi aux équipes de l'atelier du LGC pour les dispositifs expérimentaux.

Petite pensée pour tous les locataires des bureaux 1-r5-4 et 5 (et autres), présents et passés, Pierre C., Poehere, Nadège, Mickaël, Pierre A., Xavier, Silvia, Lauren, Cédric, Simon, Julien, Marco, Isaura, Lucila, Tasnim. Je m'étais toujours dit que l'équipe jouait un rôle majeur dans la réussite d'une thèse, j'en ai aujourd'hui la confirmation grâce à vous tous. Vous avez, chacun à votre façon, rendu ces trois années au LGC incroyables. Merci pour les discussions, les fous rires, les conseils, et le soutien dans les moments un peu plus difficiles. Merci tout particulièrement à Emma, qui a été un réel guide lors de mon arrivée au laboratoire. J'espère, après ton départ, avoir réussi à transmettre le flambeau et que cette entraide entre les générations de doctorants perdurera aussi longtemps que le laboratoire !

Tout ceci n'aurait bien sûr pas été possible sans mes parents, Michel et Liliane, que je remercie infiniment. Ils m'ont toujours poussée à me dépasser, et je n'ai pas aujourd'hui de plus beau cadeau que la fierté dans leurs regards. Merci pour votre soutien sans faille, même dans les moments les plus compliqués. J'ai une grosse pensée aussi pour mes deux frères. Sébastien, tu ne liras jamais ces mots, mais c'est grâce à toi que j'ai toujours continué à avancer, jour après jour. Alexandre, je te souhaite dans le futur de trouver ta voie et d'être aussi épanoui que je peux l'être dans la mienne. Merci aussi à toute ma très très grande famille, il faudrait des dizaines de pages pour parler de chacun de vous, et chacun de vous a son importance. Peut-être que si je suis docteure aujourd'hui, c'est aussi parce que tatie m'a déposée à l'école chaque matin, ou que Daniella m'a fait réviser l'écriture et les multiplications chaque soir, et je ne l'oublierai jamais. Une pensée particulière pour Monmon, Matante Fifi et Mamie, les trois femmes les plus fortes que je connaisse, un exemple à suivre. Emile Alaguiry, Vanon, papy, tu n'es malheureusement plus là pour assister à tout cela, mais je sais que, de là où tu es, toi pour qui l'éducation a toujours été la base de toute chose, tu es fier de ta petite fille aujourd'hui ingénieure et docteure.

Je tiens ensuite à remercier mes amis les plus proches, Paul, Sarah et Doris, vous êtes là depuis le tout début de l'école d'ingénieur, nous avons chacun évolué différemment et à différents endroits, tout en gardant ce lien, merci pour vos encouragements tout au long de la thèse.

Enfin, j'adresse mes remerciements les plus profonds à Ludovic, mon amour, mon confident et mon meilleur allié, à chaque instant. Merci pour ton soutien indéfectible, merci de m'avoir redonné confiance en moi et de m'avoir rappelé que tout était possible si on s'en donnait les moyens.

# Procédé électro-microbien pour le traitement des eaux usées domestiques

## Résumé

Au cours du traitement biologique des eaux usées, les bactéries aérobies présentes dans les boues activées oxydent la matière organique et transfèrent les électrons issus de l'oxydation à l'oxygène. Il est alors nécessaire d'aérer l'intégralité du bassin de traitement de façon intensive, ce qui entraîne un coût énergétique important. Le tuba électro-microbien, ou biotuba, se présente sous la forme d'une électrode unique avec une partie haute cathodique aérobie et une partie basse anodique anaérobie. Les bactéries électroactives anodiques oxydent la matière organique en condition anaérobie en transférant les électrons à l'électrode. Ces électrons sont évacués au niveau de la partie cathodique qui assure la réduction de l'oxygène. Ce type de traitement permet de diminuer le coût d'aération en passant d'une aération intensive de tout le bassin à une aération la plus réduite possible, uniquement de la partie cathodique. La thèse a eu pour objectif d'optimiser un biotuba pour le traitement des eaux usées domestiques en diminuant au maximum le besoin d'aération. Le biotuba a été caractérisé par le suivi de son potentiel, des abattements de matière organique et des populations microbiennes impliquées dans les parties anodique et cathodique de l'électrode.

Le premier type d'aération réalisé en continu sur la partie haute n'est pas concluant car il est difficile de maintenir une partie haute aérobie et une partie basse anaérobie sur le long terme. Une aération séquentielle est alors testée. L'aération séquentielle a déjà été développée pour des électrodes dites bidirectionnelles, qui se comportent en anode ou en cathode selon les conditions expérimentales (ajout de substrat ou d'oxygène). L'impact d'une aération séquentielle est d'abord évalué sur une électrode bidirectionnelle en eaux usées domestiques avant de l'appliquer au biotuba. L'électrode bidirectionnelle assure des densités maximales de courant d'oxydation de l'ordre de  $6,4 \text{ A/m}^2$ , c'est-à-dire au niveau des meilleures performances reportées dans la bibliographie avec des eaux usées domestiques réelles. L'étude des populations microbiennes montre que le biofilm évolue peu au cours du temps et est peu sensible aux changements de conditions, ce qui donne une électrode bidirectionnelle robuste qui maintient ses performances au cours du temps.

Ce protocole est alors appliqué aux biotubas dans les eaux usées domestiques avec une aération séquentielle de la partie haute cathodique. La partie basse anodique reste anaérobie. L'objectif est d'abattre le maximum de matière organique tout en aérant au minimum. Les résultats indiquent que le potentiel du biotuba est un paramètre clé pour son pilotage. Ce dernier oscille entre 0 et  $+0,1 \text{ V/ECS}$  lors des phases aérobies et entre  $-0,4$  à  $-0,5 \text{ V/ECS}$  lors des phases anaérobies. Le passage du potentiel haut au potentiel bas correspond à la période d'activité du biotuba pendant laquelle il assure l'oxydation de la matière organique et donc un abattement de la DCO. Cette dernière dure environ 30 minutes, alors que l'abattement cesse dès l'arrêt de l'aération pour les contrôles sans biotuba. Il est également apparu qu'une période trop longue sans aération n'est pas utile (activité du biotuba de 30 minutes) mais qu'une aération trop importante gêne le développement du biofilm anodique, du fait de la compétition avec les bactéries aérobies. Les biotubas avec une aération de 30 minutes toutes les 5 heures 30 ont assuré un abattement de 3 à 6,3 fois plus important que les contrôles. Des communautés microbiennes différentes se développent alors selon les conditions aérobies/anaérobies de chaque zone du biotuba.

Une autre stratégie de gestion de l'oxygène a été développée. Elle permet d'abattre jusqu'à 75% de la matière organique contre aucun abattement pour les contrôles en milieu synthétique optimal. En eaux usées réelles, l'abattement est 2,8 fois plus important que pour les contrôles. Un brevet est en cours de dépôt sur cette nouvelle technologie.

**Mots clés :** Tuba électro-microbien, Pile à combustible microbienne, Biofilm électroactif, Traitement des eaux usées, Electrode bidirectionnelle, Analyse métagénomique

# Microbial electrochemical process for domestic wastewater treatment

## Abstract

During biological wastewater treatment, aerobic bacteria in the activated sludge oxidize organic matter and transfer to oxygen the electrons produced by this oxidation. The entire treatment tank must then be aerated intensively, which results in high energy cost. The microbial electrochemical snorkel, or MES, is a single electrode with an aerobic cathodic upper part and an anaerobic anodic lower part. Anodic electroactive bacteria oxidize organic matter in anaerobic condition by transferring electrons to the electrode. They are evacuated at the cathodic part, which achieves oxygen reduction. This type of treatment reduces the aeration cost by switching from an intensive aeration of the entire tank to the lowest possible aeration of the cathodic zone only. The objective of the thesis was to optimize a MES for domestic wastewater treatment by reducing the aeration requirement to a minimum. The MES was characterized by monitoring its potential, organic matter removal and microbial populations involved in anodic and cathodic parts of the electrode.

The first type of aeration, performed in continuous mode at the upper part, was not conclusive because it was difficult to maintain an aerobic upper part and an anaerobic lower part in the long run. Sequential aeration was then tested. Sequential aeration has already been developed for so-called bidirectional electrodes, which behave as an anode or a cathode depending on the experimental conditions (addition of substrate or oxygen). The impact of sequential aeration was first evaluated on a bidirectional electrode in domestic wastewater before applying it to the MES. The bidirectional electrode ensured maximum oxidation current densities of  $6.4 \text{ A/m}^2$ , i.e. at the level of the best performances reported in the literature for bidirectional electrode fed with real domestic wastewater, without addition of substrate. The study of microbial populations showed that the biofilm did not evolve much over time and was not very sensitive to changing conditions, resulting in robust bidirectional electrodes that maintained their performance over time.

This protocol was then applied to MES in domestic wastewater with sequential aeration of the cathodic upper part. The lower anodic part remained anaerobic. The objective was to remove as much organic matter as possible while keeping aeration to a minimum. The results indicate that the potential of the MES is a key parameter for its management. It oscillates between 0 and +0.1 V/SCE during aerobic phases and between -0.4 and -0.5 V/SCE during anaerobic phases. The transition from high to low potential corresponds to the period of activity of the MES during which it ensures the oxidation of the organic matter and thus the COD (Chemical Oxygen Demand) removal. The period of activity lasted about 30 minutes, whereas the reduction stopped as soon as aeration was stopped for controls without MES. It was also shown that a too long period without aeration is not useful (30 minutes MES activity) but that, in contrast, too much aeration hinders the development of the anodic biofilm due to competition with aerobic bacteria. MES with 30 minutes aeration every 5.5 hours provided a 3 to 6.3 times greater COD removal than the controls. Different microbial communities then develop according to the aerobic/anaerobic conditions in each area of the MES.

Another oxygen management strategy was developed. It allowed up to 75% of the organic matter to be removed versus no removal for controls in an optimal synthetic medium. In real wastewater, the removal was 2.8 times greater than for controls. A patent is pending on this new technology.

**Keywords:** Microbial electrochemical snorkel, Microbial fuel cell, Electroactive biofilm, Wastewater treatment, Bidirectional electrode, Metagenomic Analysis

# *Table des matières*



# Table des matières

<b>Introduction générale</b> .....	11
<b>Chapitre 1 : Etude bibliographique</b> .....	17
1 Traitement et valorisation des eaux usées domestiques et des boues activées .....	19
1.1 Traitement des eaux usées dans les stations d'épurations .....	19
1.2 Coût énergétique des procédés de traitement .....	23
1.3 Populations microbiennes dans les eaux usées .....	27
2 Biofilms électroactifs .....	31
2.1 Electroactivité bactérienne .....	31
2.2 Ubiquité des bactéries électroactives .....	34
3 Pile à combustible microbienne (PCM).....	37
3.1 Principe de la PCM.....	37
3.2 Caractérisation de la PCM.....	39
3.3 Limitations des PCM .....	43
4 Electrodes dans les systèmes électro-microbiens .....	45
4.1 Anodes microbiennes.....	45
4.2 Cathodes microbiennes de réduction de l'oxygène.....	50
4.3 Cathodes capillaires.....	55
4.4 Electrodes bidirectionnelles (Article 1).....	56
5 Performances et applications des PCM.....	73
5.1 Développement des PCM.....	73
5.2 PCM pour le traitement des eaux usées.....	74
6 De la PCM au biotuba .....	78
6.1 Principe du biotuba.....	78
6.2 Applications et performances des biotubas (Article 2) .....	79
<b>Chapitre 2 : Matériels et méthodes</b> .....	95

1 Inocula et milieux de culture .....	97
1.1 Inocula .....	97
1.2 Milieux de culture .....	98
2 Dispositifs expérimentaux .....	100
2.1 Réacteurs électrochimiques .....	100
2.2 Montages électrochimiques à trois électrodes .....	105
2.3 Montage électrochimique de type biotuba .....	109
3 Techniques d'analyse .....	111
3.1 Techniques électrochimiques .....	111
3.2 Techniques physico-chimiques .....	113
3.3 Techniques d'observation.....	116
3.4 Analyses des populations microbiennes.....	118
<b>Chapitre 3 : Optimisation d'une électrode microbienne aérée en eaux usées domestiques .....</b>	<b>121</b>
1 Objectifs et choix de l'étude .....	123
2 Développement d'une cathode microbienne à air flottante .....	124
2.1 Rappel des conditions opératoires .....	124
2.2 Résultats expérimentaux.....	127
2.3 Conclusion .....	138
3 Optimisation d'une électrode microbienne capable de transferts d'électrons extracellulaires (TEE) bidirectionnels.....	139
3.1 Essai préliminaire de permutation d'une anode déjà formée en cathode immergée de réduction de l'oxygène.....	139
3.2 Rappel des conditions opératoires utilisées pour les trois essais de formation d'une électrode bidirectionnelle.....	147
3.3 Résultats expérimentaux.....	148
3.4 Conclusion .....	157
4 TEE bidirectionnels dans les eaux usées et analyses de population (article 3) .....	158
5 Conclusion du chapitre 3.....	182

<b>Chapitre 4 : Biotuba aéré en eaux usées domestiques</b> .....	185
1 Objectifs et choix de l'étude .....	187
2 Biotuba_26 avec aération continue .....	188
2.1 Expériences préliminaires sans biotuba, essais 1 à 6.....	188
2.2 Expériences avec le Biotuba_26 .....	191
3 Biotuba_26 avec aération séquentielle.....	198
3.1 Biotuba_26.3.....	198
3.2 Conclusion sur le Biotuba_26.....	207
3.3 Transition du Biotuba_26 au Biotuba_48 (Article 4).....	209
4 Ajustement de l'aération séquentielle et analyses des populations microbiennes.....	228
4.1 Conditions opératoires .....	228
4.2 Résultats électrochimiques et performances d'abattement.....	229
4.3 Analyses des populations microbiennes.....	232
4.4 Conclusion .....	237
5 Conclusion du chapitre 4.....	238
<b>Chapitre 5 : Biotuba avec électrode capillaire émergée en milieu synthétique</b> .....	241
1 Objectifs et choix de l'étude .....	243
2 Formation et caractérisation de l'anode microbienne par polarisation retardée .....	244
2.1 Conditions opératoires .....	244
2.2 Essai 1 : 3 heures en circuit ouvert.....	245
2.3 Essai 2 : 48 heures en circuit ouvert.....	247
2.4 Essai 3 : 1 à 8 jours en circuit ouvert.....	248
2.5 Essai 4 : 2 à 8 jours en circuit ouvert.....	250
2.6 Essai 5 : 2 à 8 jours en circuit ouvert - bis .....	253
2.7 Conclusion .....	256
3 Electrode capillaire en milieu synthétique.....	257
3.1 Conditions opératoires .....	258
3.2 Essai 1 – Feutre sec, $\sigma = 0,2$ S/m .....	259

3.3 Essai 2 – Feutre trempé 24 heures, $\sigma = 0,2$ S/m .....	263
3.4 Essai 3 – Feutre désaéré puis trempé 1 semaine, $\sigma = 0,2$ S/m .....	266
3.5 Essai 4 – Feutre trempé 1 semaine, $\sigma = 1,2$ S/m.....	269
3.6 Essai 5 – Eaux usées synthétiques + lombricompost, $\sigma = 1,2$ S/m.....	271
3.7 Conclusion .....	274
4 Biotuba avec électrode capillaire émergée en milieu synthétique.....	276
4.1 Conditions opératoires .....	277
4.2 Résultats électrochimiques et performances d'abattement.....	278
4.3 Observations aux microscopes .....	284
4.4 Analyses des populations microbiennes.....	287
4.5 Conclusion .....	293
5 Conclusion du chapitre 5.....	294
<b>Chapitre 6 : Biotuba avec électrode capillaire émergée en eaux usées domestiques</b>	<b>297</b>
1 Objectifs et choix de l'étude .....	299
2 Electrode capillaire en eaux usées.....	299
2.1 Conditions opératoires .....	300
2.2 Résultats .....	300
2.3 Conclusion .....	304
3 Biotuba avec électrode capillaire émergée en eaux usées .....	304
3.1 Conditions opératoires .....	305
3.2 Résultats électrochimiques et performances d'abattement.....	308
3.3 Observations aux microscopes .....	313
3.4 Analyses des populations microbiennes.....	315
3.5 Conclusion .....	320
4 Conclusion du chapitre 6.....	321
<b>Chapitre 7 : Premiers éléments d'étude de la capacité de double couche de l'interface</b>	<b>323</b>
.....	323
1 Objectifs et choix de l'étude .....	325

2 Conditions opératoires .....	327
3 Influence du biofilm sur la capacité de double couche de l'interface .....	328
4 Influence du traitement de surface sur la capacité de double couche de l'interface .....	331
5 Analyses des populations microbiennes.....	334
6 Conclusion .....	337
7 Conclusion du chapitre 7.....	339
<b>Conclusions générales et perspectives.....</b>	<b>341</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>349</b>



# ***Introduction générale***



L'eau est une ressource indispensable dont la consommation croît à mesure que la population mondiale augmente et que la qualité de la vie s'améliore. Cependant, ce n'est pas une ressource inépuisable et il faut donc que l'eau rejetée dans l'environnement après usage soit suffisamment épurée pour maintenir la ressource et protéger le milieu naturel.

D'un point de vue technologique, le traitement des eaux usées doit être abordé selon un axe énergie-eau, c'est-à-dire avec le souci d'optimiser les stations d'épuration afin qu'elles soient les plus neutres possibles en termes de consommation énergétique et d'impact environnemental (Salgot and Folch, 2018).

Au cours du traitement biologique des eaux usées, les bactéries aérobies présentes dans les boues activées oxydent la matière organique en transférant à l'oxygène les électrons issus de cette oxydation. Pour exploiter ce processus d'abattement de la matière organique, il est nécessaire d'aérer l'intégralité du bassin de traitement de façon intensive, ce qui entraîne un coût énergétique important. Depuis une vingtaine d'années, on a observé que de nombreuses espèces bactériennes présentes dans les eaux usées et les boues activées sont capables de transférer vers une électrode les électrons issus de l'oxydation de la matière organique. Elles sont dites électroactives.

Le tuba électro-microbien, ou biotuba, est un procédé qui vise à exploiter la capacité d'électroactivité de certaines bactéries pour diminuer le coût d'aération des procédés de traitement des eaux usées. Un biotuba se présente généralement sous la forme d'un matériau conducteur dont la partie haute est disposée dans la zone aérobie du bassin de traitement et la partie basse dans la zone anaérobie (Hoareau et al., 2019). Les bactéries électroactives oxydent la matière organique en conditions anaérobies sur la partie basse en transférant les électrons à l'électrode (anode). Ces électrons sont évacués au niveau de la partie haute qui assure la réduction de l'oxygène (cathode). Ce dispositif devrait permettre de diminuer le coût d'aération en passant d'une aération intensive de tout le bassin à une aération la plus réduite possible, uniquement de la partie haute.

Les travaux de thèse décrits dans ce mémoire s'intègrent dans le projet BIOTUBA soutenu par l'ANR qui a pour objectif de lever les verrous scientifiques et techniques liés à l'implantation de la technologie biotuba à l'échelle industrielle par le biais d'une approche transdisciplinaire et multi-échelles. Le projet rassemble l'unité PRocédés biOtechnologiques au Service de l'Environnement (PROSE - INRAE) qui en est le coordonnateur, un laboratoire universitaire (LGC), l'entreprise industrielle publique de gestion et traitement des eaux résiduaires urbaines de l'agglomération parisienne (SIAAP) et une PME spécialisée dans le développement de procédés innovants et le transfert de technologie (6TMIC).

Le programme scientifique du projet est organisé en trois tâches : (i) la réalisation d'études à l'échelle laboratoire pour comprendre et optimiser le fonctionnement du biotuba en focalisant sur l'utilisation de matrices réelles et de matériaux recyclés à faible coût (WP1), (ii) le développement et l'utilisation des outils de modélisation pour le dimensionnement et l'implantation du biotuba dans les réacteurs industriels (WP2), (iii) la caractérisation de l'ensemble des impacts énergétiques et environnementaux liés à l'implantation du biotuba par le couplage d'une analyse de cycle de vie et d'expérimentations à l'échelle semi-industrielle (WP3). Les travaux de cette thèse se concentrent sur les tâches du WP1 avec notamment la conception d'électrodes en conditions réelles, les plus proches possibles de celles des réacteurs biologiques de traitement des eaux usées.

La thèse a eu pour objectif d'optimiser un biotuba pour le traitement des eaux usées domestiques en diminuant au maximum le besoin d'aération. Le biotuba a été caractérisé par le suivi de son potentiel, la mesure des abattements de matière organique et l'analyse des populations microbiennes impliquées dans les parties anodique et cathodique.

Le principal verrou qui était à lever au début de cette thèse était le faible transfert de l'oxygène vers la partie cathodique du biotuba car, dans les eaux usées et boues activées, la concentration en oxygène dissous est quasi-nulle. L'oxygène qui se solubilise est directement consommé par les bactéries en solution provenant du milieu et de l'inoculum.

Ce mémoire de thèse est organisé en sept chapitres. Le chapitre 1 propose une mise en contexte, une description des piles à combustible microbiennes et des éléments qui la constituent. En effet, le concept de biotuba est dérivé de celui de pile à combustible microbienne et présente des avantages certains pour ce qui concerne le traitement des effluents. Le chapitre se clôt sur un état de l'art des applications et performances des biotubas.

Le chapitre 2 décrit les matériels et méthodes mis en œuvre. Ce chapitre comprend notamment une description des milieux de culture et inocula, des dispositifs expérimentaux et des techniques d'analyse qui ont été utilisés.

Les quatre chapitres suivants s'articulent selon deux axes d'optimisation du transfert de l'oxygène à la cathode. Les chapitres 3 et 4 ont pour objectif le développement d'un biotuba aéré. L'avantage du biotuba serait alors de diminuer le besoin d'aération par rapport à un traitement aérobique conventionnel. Les chapitres 5 et 6 proposent de développer un nouveau concept de biotuba, basé sur l'utilisation d'une électrode capillaire émergée, qui ne nécessiterait plus aucune aération.

Le chapitre 3 est consacré à l'amélioration de la cinétique cathodique de réduction de l'oxygène, en amont de la mise en œuvre d'un biotuba. Une cathode à air flottante est d'abord développée mais, face à ses faibles performances de réduction de l'oxygène, le choix est fait de s'orienter vers une électrode bidirectionnelle.

Le chapitre 4 tente d'appliquer à la conception d'un biotuba le protocole de formation d'une électrode bidirectionnelle dans les eaux usées domestiques. Il s'attache à optimiser les modes d'aération, en continu ou fréquentiel, sur la totalité du réacteur ou seulement sur la partie haute.

Le chapitre 5 décrit la mise en place d'une l'électrode capillaire émergée, tout d'abord sous forme d'une cathode classique, puis dans le cadre d'un biotuba, dans un milieu constitué d'eaux usées synthétiques et inoculé avec du terreau.

Le chapitre 6 applique le protocole de formation de l'électrode capillaire émergée du chapitre 5, cette fois dans des eaux usées réelles inoculées avec des boues activées.

Enfin, le chapitre 7 ébauche quelques perspectives en explorant l'intérêt de matériaux capacitifs pour la conception d'un biotuba.

Les travaux décrits dans ce mémoire ont été valorisés par :

- 3 articles publiés :
  - « *Oxygen-reducing bidirectional microbial electrodes: A mini-review* » publié dans le journal *Electrochemistry Communications* et inséré dans le chapitre 1,
  - « *Microbial electrochemical snorkels (MESs): A budding technology for multiple applications. A mini review* » publié dans le journal *Electrochemistry Communications* et inséré dans le chapitre 1,
  - « *Oxygen-reducing bidirectional microbial electrodes designed in real domestic wastewater* » publié dans le journal *Bioresource Technology* et inséré dans le chapitre 3,
- un article soumis au journal *Electrochimica Acta* « *Oxygen supply management to intensify wastewater treatment by a microbial electrochemical snorkel* », inséré dans le chapitre 4,
- deux conférences dans des congrès nationaux et internationaux :
  - « *Quelle peut être l'utilité d'une pile à combustible microbienne en court-circuit ?* », Journée Toulousaine d'Electrochimie,
  - « *De l'intérêt d'implanter une électrode microbienne dans le traitement d'eaux usées domestiques* », 13<sup>ème</sup> congrès international du GRUTTEE,

- une conférence courte dans un congrès international : « *Oxygen Supply Management to Intensify Domestic Wastewater Treatment by a Microbial Electrochemical Snorkel (MES)* », *71st Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry*, qui a été récompensée par le *Oral presentation award*,
- une demande de dépôt de brevet sur le concept de biotuba à électrode émergée développé dans les chapitres 5 et 6. Lorsque la décision de déposer ou non le brevet aura été prise, cette partie du travail sera également valorisée par la publication d'un article scientifique actuellement en préparation.

# ***Chapitre 1 : Etude bibliographique***



# 1 Traitement et valorisation des eaux usées domestiques et des boues activées

L'eau étant une ressource indispensable à la vie humaine, sa consommation augmente au même rythme que la population. Afin de pouvoir développer une ville viable sur le long terme, il faut donc assurer un approvisionnement suffisant en eau potable, une bonne gestion des ressources en eau et mettre en place des moyens d'assainissement. En effet, l'eau n'est pas une ressource inépuisable et il est nécessaire que l'eau rejetée dans l'environnement soit suffisamment épurée pour maintenir la ressource et protéger le milieu naturel.

D'un point de vue technologique, il est important d'aborder le traitement des eaux usées selon un axe énergie-eau, avec des stations d'épuration optimisées en amont afin d'être les plus neutres possibles en terme de consommation énergétique et d'impact environnemental (Salgot and Folch, 2018).

## 1.1 Traitement des eaux usées dans les stations d'épurations

Les eaux usées collectées, aussi appelées eaux résiduaires urbaines (ERU), sont traitées dans des usines de dépollution ou stations d'épuration (STEP). L'origine des eaux résiduaires urbaines est principalement domestique mais une part, très variable suivant les agglomérations, est d'origine industrielle. Les capacités et performances des STEP sont définies au moyen de plusieurs paramètres physico-chimiques, biologiques et hydrauliques (Figure 1.1).

### **MES (Matières En Suspension)**

Les MES, exprimées en g/L, sont la concentration de la partie séchée (hors eau) de tous les éléments en suspension dans l'eau dont la taille permet leur rétention sur un filtre de porosité donnée ou leur rassemblement, sous forme de culot, par centrifugation.

### **DBO<sub>5</sub> (Demande Biochimique en Oxygène pour 5 jours)**

La DBO, exprimée en mg d'O<sub>2</sub>/L, est la quantité d'oxygène consommée à 20 °C et à l'obscurité pendant un temps donné pour assurer par voie biologique l'oxydation des matières organiques présentes dans l'eau. On utilise conventionnellement la DBO<sub>5</sub>, c'est-à-dire la quantité d'oxygène consommée durant 5 jours d'incubation.

**DCO (Demande Chimique en Oxygène)**

La DCO est une concentration massique en dioxygène, exprimée en mg d'O<sub>2</sub>/L, équivalente à la quantité de dichromate de potassium consommée par les matières oxydables de la solution. Elle est représentative de la majeure partie des composés organiques ainsi que des sels minéraux oxydables. La DCO totale est constituée de la DCO biodégradable (corrélée à la DBO<sub>5</sub>) et de la DCO inerte ou réfractaire. Chacun des deux types de matière est constitué d'un mélange d'éléments dissouts et particulaires. Le rapport  $\frac{DCO}{DBO_5}$  permet d'évaluer la biodégradabilité de l'effluent. Une valeur de 1 indique des eaux usées hautement biodégradables.

**Charge brute**

La charge brute de pollution organique est définie par l'article R2224-6 du Code général des collectivités territoriales comme la quantité journalière moyenne de DBO<sub>5</sub> de la semaine au cours de laquelle est produite la plus forte charge de substances polluantes dans l'année.

**EH (Equivalent-Habitant)**

La capacité d'une STEP est souvent exprimée en EH car cette unité de mesure permet de comparer facilement des flux de matières polluantes. Elle correspond aux valeurs moyennes rejetées par habitant et par jour dans les eaux usées domestiques. En France, l'EH est défini par l'article R2224-6 du Code général des collectivités territoriales. Un EH correspond à une quantité journalière de 60 g de DBO<sub>5</sub>, 120 à 150 g de DCO, 70 à 90 g de MES. Cela équivaut en moyenne à 120 L d'effluent.

*Figure 1.1 : Définitions des principaux paramètres relatifs au traitement des eaux usées, d'après (SUEZ, 2017).*

En 2018, la France compte, dans la base de données du Portail d'information sur l'assainissement communal, 21 981 STEP (Ministère de la Transition écologique, 2018a). Ces STEP traitent actuellement 79 millions d'EH et ont une capacité épuratoire totale de 105 millions d'EH. Les traitements appliqués aux eaux usées dépendent bien sûr de leur degré de pollution, mais aussi des exigences de qualité du milieu naturel dans lequel l'eau épurée est rejetée (zone de baignade, de pêche, d'aquaculture...). La station d'épuration de Castanet-Tolosan, d'où proviennent les eaux usées utilisées pour les travaux de cette thèse, possède une capacité nominale de 26 667 EH en 2018 (Ministère de la Transition écologique, 2018b). Cela représente une charge brute de 1 600 kg de DBO<sub>5</sub>/j.

Afin de protéger le milieu, les stations d'épurations doivent atteindre des performances épuratoires définies en France par l'arrêté du 22 juin 2007. Ces performances dépendent non seulement de la charge brute de la STEP, mais aussi de la sensibilité du milieu récepteur, notamment vis-à-vis de l'eutrophisation. Les performances légales attendues en DBO<sub>5</sub>, DCO et MES sont présentées dans le Tableau 1.1. En cas de rejet dans une zone sensible à l'eutrophisation, l'azote et le phosphore sont aussi contrôlés.

Tableau 1.1 : Performances épuratoires définies en France dans l'arrêté du 22 juin 2007.

Paramètre	Charge brute (kg de DBO <sub>5</sub> /j)	Concentration maximale à ne pas dépasser (mg/L)	Abattement minimum à atteindre (%)
<b>Charge brute ≤ 120 kg de DBO<sub>5</sub>/j</b>			
<b>DBO<sub>5</sub></b>	Toutes charges	35	60
<b>DCO</b>	Toutes charges	-	60
<b>MES</b>	Toutes charges	-	50
<b>Charge brute &gt; 120 kg de DBO<sub>5</sub>/j</b>			
<b>DBO<sub>5</sub></b>	120 < Charge ≤ 600	25	70
	< 600		80
<b>DCO</b>	Toutes charges	125	75
<b>MES</b>	Toutes charges	35	35
<b>Rejet en zone sensible à l'eutrophisation</b>			
<b>Azote (NGL)</b>	600 < Charge ≤ 6 000	15	70
	< 6000	10	
<b>Phosphore (P<sub>t</sub>)</b>	600 < Charge ≤ 6 000	2	80
	< 6000	1	

Le traitement des ERU est réalisé en France grâce à cinq filières principales de traitement biologique : les réacteurs biologiques séquentiels (SBR), les bioréacteurs à membranes (MBR), les biofiltres, les lits fluidisés sur support et les boues activées (Agence de l'Eau Rhône-Méditerranée-Corse, 2018). Comme la très grande majorité des stations d'épuration en France, la STEP de Castanet-Tolosan est une station de traitement à boues activées (BA). Quel que soit le type de traitement, les eaux usées sont traitées suivant un enchaînement d'étapes comprenant les prétraitements, le traitement biologique et parfois les traitements tertiaires (Figure 1.2).

Le prétraitement se déroule en deux étapes : le dégrilleur retient les déchets solides les plus gros puis le déshuileur-dessableur sépare les huiles, graisses et sables du reste de l'effluent. Le décanteur primaire assure ensuite la sédimentation des particules fines avant l'arrivée dans le bassin de traitement biologique. Ce bassin est un réacteur dans lequel les microorganismes responsables de l'épuration sont maintenus en suspension et aérés. Après le traitement biologique, l'eau est séparée des boues dans le clarificateur, ou décanteur secondaire, avant de passer éventuellement par des traitements tertiaires (filtration membranaire, désinfection chimique ou par rayonnement ultra-violet, etc.) et d'être rejetée dans le milieu récepteur. Les boues provenant du clarificateur sont traitées dans une filière spécifique afin d'être valorisées par la suite (engrais, compostages, incinération couplée à la récupération d'énergie, etc.)

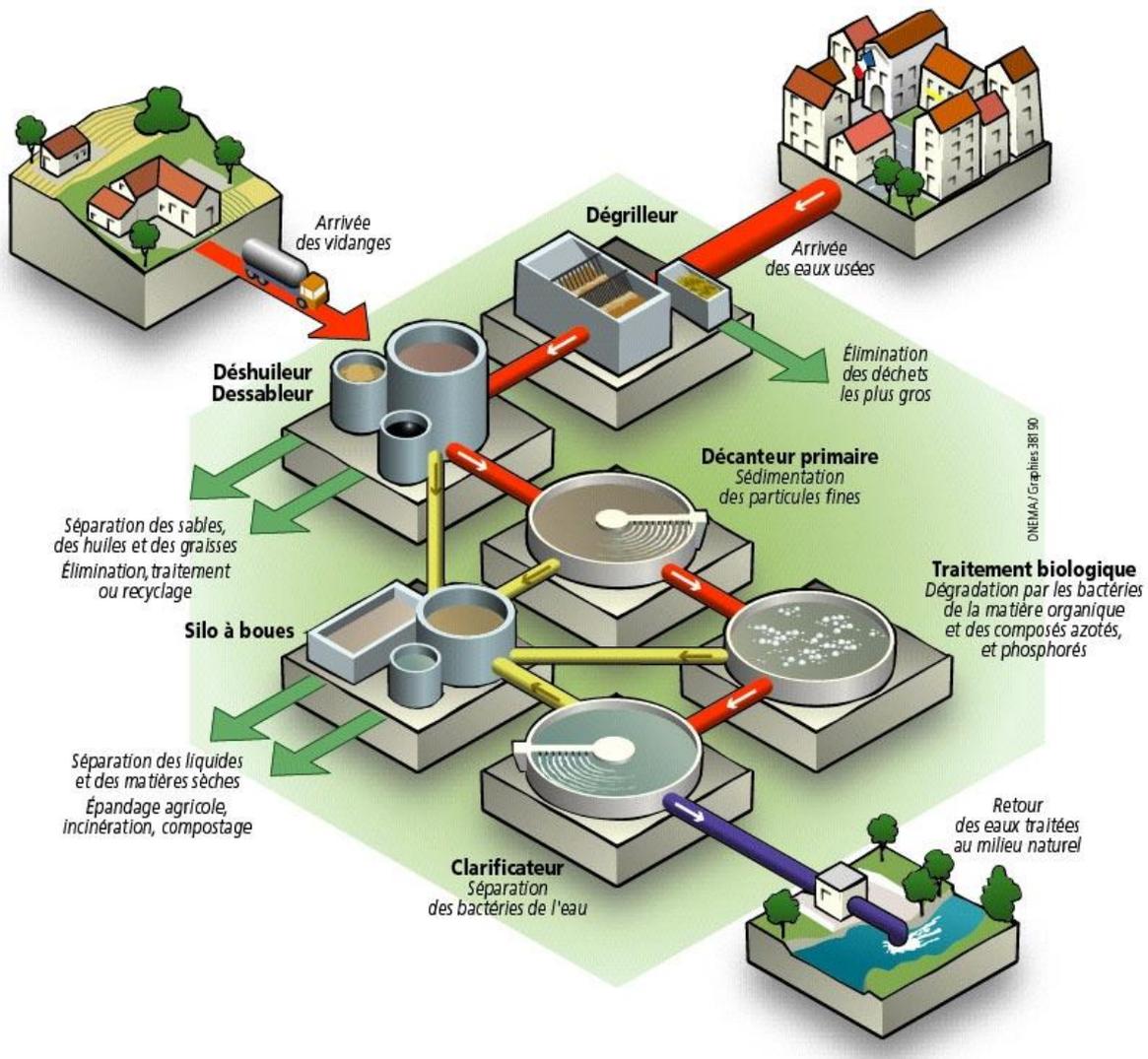


Figure 1.2 : Synoptique du traitement des eaux usées en station d'épuration (Office français pour la biodiversité, 2018).

Le principe du traitement biologique, quel que soit son type, repose sur la capacité des bactéries présentes dans les boues activées à convertir la matière organique biodégradable contenue dans les ERU en CO<sub>2</sub> et en biomasse additionnelle. Cette biomasse, qui constitue les boues, est extraite des STEP au niveau du clarificateur. Les espèces bactériennes présentes dans les eaux usées et les STEP, très variées, sont décrites dans la partie 1.3 de ce chapitre. Les bactéries oxydent la matière organique en transférant des électrons à l'oxygène. C'est ce principe qui est utilisé et détourné pour la mise en place du traitement électro-microbien qui fait l'objet de ce travail de thèse.

## 1.2 Coût énergétique des procédés de traitement

Les stations d'épuration consomment une grande quantité d'énergie afin d'atteindre les performances épuratoires attendues, ce qui représente une partie non négligeable de la consommation électrique des municipalités (Fang and Chen, 2017). Cette proportion atteint 1% de l'énergie totale consommée par l'Allemagne ou l'Italie par exemple (Molinos-Senante et al., 2018). Une étude parue en 2016 compare la consommation énergétique de 317 à 338 stations d'épuration, selon leur taille, le type de traitement et le pays (Longo et al., 2016). Cette étude met en lumière trois éléments importants :

- les STEP de petite taille (< 2k EH) sont en moyenne 2 à 4 fois plus énergivores que les autres, avec une consommation qui baisse avec l'augmentation de la taille (Figure 1.3A),
- le bioréacteur à membrane est 2 à 5 fois plus couteux en énergie que les autres procédés, les BA étant le procédé le moins couteux (Figure 1.3B),
- la France présente une consommation énergétique 2 à 4 fois supérieure aux autres pays étudiés (Figure 1.3C).

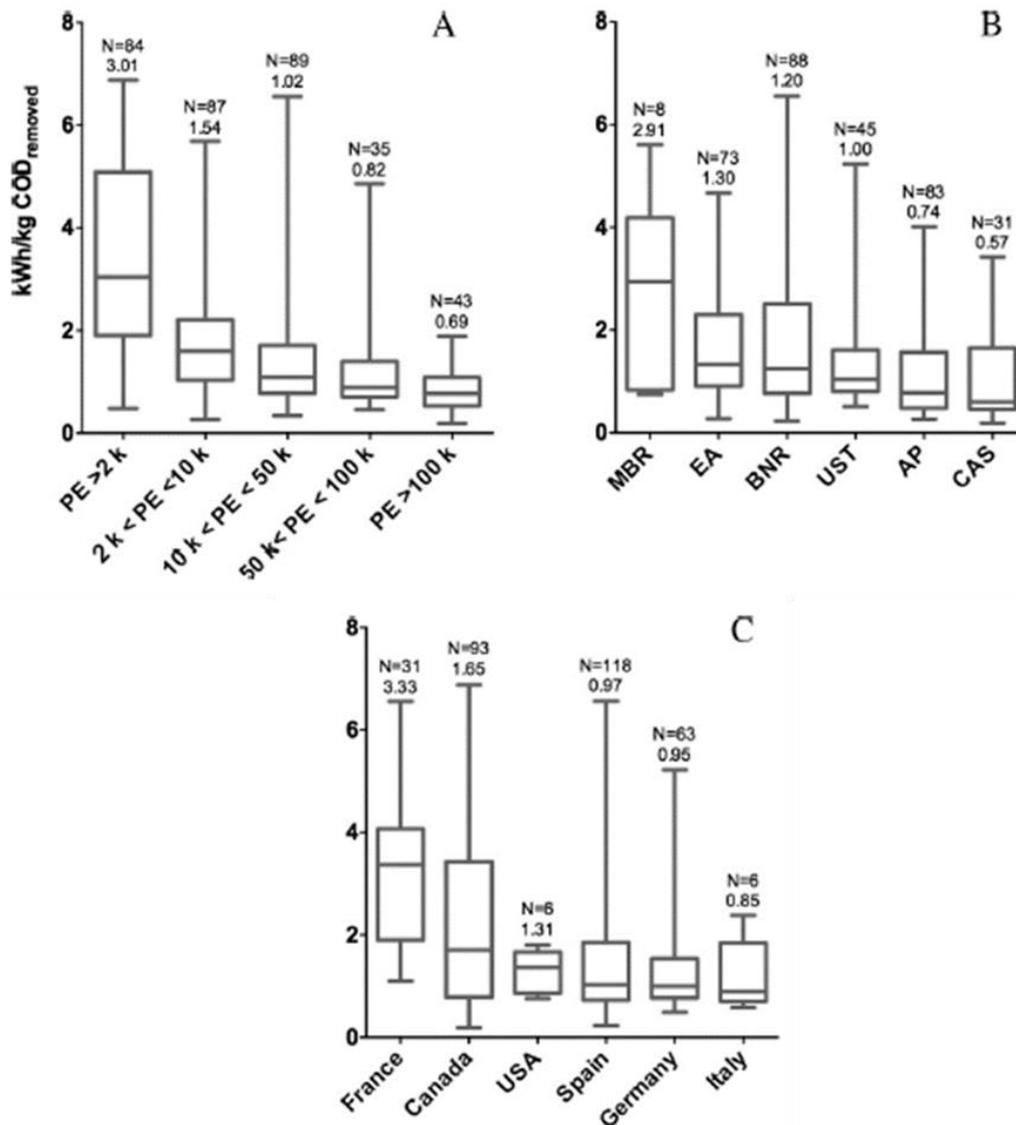


Figure 1.3 : Consommation énergétique totale des STEP par : (A) taille de la STEP, (B) type de traitement et (C) pays (Longo et al., 2016).

NB : les chiffres au-dessus des barres correspondent à la taille de l'échantillon et à la moyenne. Les échantillons dont  $N < 5$  ne sont pas indiqués, c'est la raison pour laquelle la taille totale des échantillons diffère entre les figures 3.A, 3.B et 3.C. MBR = bioréacteur à membrane ; EA = aération prolongée ; BNR = élimination des nutriments biologiques ; UST = traitement secondaire non spécifié ; AP = bassin aérobie ; CAS = boues activées conventionnelles.

Une étude menée de 2013 à 2016 par l'IRSTEA (maintenant INRAE) et cofinancée par l'Agence de l'Eau Rhône Méditerranée Corse, qui dresse un état des lieux de la consommation énergétique des stations d'épuration à partir des données de 310 installations françaises et 1000 installations étrangères (IRSTEA Bordeaux, 2017; Agence de l'Eau Rhône-Méditerranée-Corse, 2018), confirme les conclusions obtenues par Longo et al. (2016). En se

basant sur les données des installations de type BA, les STEP françaises étudiées présentent une consommation énergétique 30% plus importante que le parc étranger (Figure 1.4).

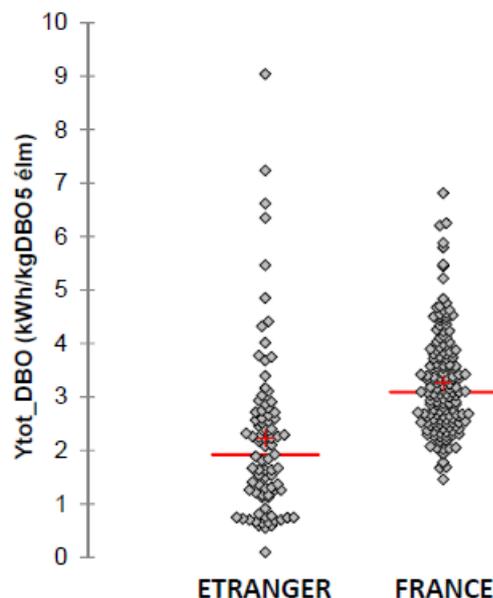


Figure 1.4 : Comparaison de la consommation énergétique des STEP françaises et étrangères sur un procédé de type boues activées (Agence de l'Eau Rhône-Méditerranée-Corse, 2018).

Les stations à BA étrangères ont des capacités et des charges brutes plus importantes que les STEP françaises. De plus, les performances épuratoires exigées sont plus élevées en France. Ces trois facteurs permettent d'expliquer en partie la différence de consommation énergétique entre la France et l'étranger. La présence plus fréquente de digesteur anaérobie dans les STEP étrangères permet aussi de réduire la consommation énergétique, surtout lorsque le biogaz est valorisé sur place (IRSTEA Bordeaux, 2017).

Ces chiffres sont toutefois à considérer avec précaution car ils présentent une grande variabilité. Par exemple, les stations françaises de type boues activées considérées dans ce rapport présentent une consommation moyenne de 3,2 kWh par kg de DBO<sub>5</sub> éliminée, mais cette valeur varie de 1,5 à 6,8 selon les cas (Agence de l'Eau Rhône-Méditerranée-Corse, 2018). La dispersion est encore plus importante dans les STEP étrangères puisque la base de données n'a pas été filtrée. En effet, pour les STEP françaises, les valeurs extrêmes ont été préalablement retirées de la base de données.

Les données des deux études précédentes (Longo et al., 2016; IRSTEA Bordeaux, 2017) sont basées sur la consommation globale des stations d'épuration. Il est difficile d'avoir

une idée exacte de la répartition énergétique par poste. Accéder à ces chiffres requerrait une quantité importante de données journalières dont la collecte est lourde et difficile à standardiser. Il faut d'abord mesurer ou calculer la consommation énergétique de chaque équipement et répartir tous les équipements de la STEP en postes fonctionnels (prétraitement, agitation, aération, etc.). La consommation énergétique par poste doit ensuite être calculée à partir des données précédentes et comparée aux données disponibles dans la bibliographie.

Une étude de ce type a été réalisée sur 8 stations de type boues activées, bioréacteur à membrane ou réacteurs biologiques séquentiels (IRSTEA Bordeaux, 2017). Il y a deux filières distinctes dans une STEP, l'une relative au traitement des eaux et l'autre au traitement des boues. Ici l'étude ne concerne que la filière eau. L'échantillon étudié est insuffisant pour que les valeurs soient considérées comme des valeurs de référence mais il permet d'illustrer la répartition des consommations énergétiques par poste de la filière eau. Les deux postes consommant le plus d'énergie concernent l'aération, que ce soit l'aération du bassin de traitement biologique (BA) ou l'aération des membranes (MBR) (Tableau 1.2). L'agitation dans le cas des BA est aussi un poste important de consommation énergétique. En regroupant les trois sous-postes, la consommation énergétique du poste « aération + agitation » ainsi créé représente 58% à 88% de la consommation énergétique de la filière eau des STEP.

*Tableau 1.2 : Consommations énergétiques annuelles par sous-poste au sein de la filière eau (traitement des eaux usées uniquement et non des boues) sur les 8 cas étudiés, modifié d'après (IRSTEA Bordeaux, 2017).*

<b>Sous-poste</b>	<b>Consommations énergétiques (%)</b>
<b>Relevage</b>	5 – 18
<b>Prétraitement</b>	0,6 – 6
<b>Bassin tampon</b>	5 – 7
<b>Agitation hors BA</b>	1 – 12
<b>Agitation BA</b>	2 – 66
<b>Aération biologique</b>	22 – 80
<b>Aération membranes</b>	23 – 57
<b>Recirculation interne</b>	2 – 3
<b>Recirculation externe</b>	2 – 12
<b>Pompages divers</b>	0,9 – 4

Sous-poste	Consommations énergétiques (%)
Décantation	0,3 – 4

### 1.3 Populations microbiennes dans les eaux usées

Le traitement biologique des eaux usées s'appuyant sur le métabolisme bactérien, la compréhension de la diversité et des interactions des communautés microbiennes présentes dans les boues activées est primordiale pour concevoir des procédés de traitement performants. Jusque dans les années 90, l'étude des communautés était basée sur des techniques de microscopie ou de culture cellulaire. Bien que ces techniques aient permis d'identifier des bactéries modèles, elles demeuraient insuffisantes pour obtenir un modèle représentatif de la diversité des communautés et de leurs interactions (Wagner and Loy, 2002).

Le développement des méthodes de biologie moléculaire et des outils de bio-informatique ces dernières décennies a permis d'obtenir des informations jusque-là inaccessibles (Bitton et al., 2002). Des taxons non cultivables en laboratoire ont ainsi été identifiés. Ces outils ont en outre révélé que les bactéries modèles cultivables et abondantes ne sont pas forcément les plus importantes pour le traitement. D'autres bactéries peu abondantes et/ou non cultivables peuvent avoir un rôle clé dans les processus d'épuration des eaux usées (Xia et al., 2018).

L'étude de Wagner et Loy (2002) dresse un état des lieux des analyses de population réalisées à partir de 1995 grâce au séquençage du gène ARN 16S et aux bases de données associées. Entre 1995 et 2002, c'est l'étude de 750 séquences qui a permis d'évaluer la diversité microbienne dans les procédés de type boues activées (Wagner and Loy, 2002). Ces études ont été menées à différentes échelles allant du bassin d'aération industriel au bioréacteur à membrane de laboratoire.

Les principales classes bactériennes identifiées dans ces études sont les *Bacteroidetes* (14%), les *Actinobacteria* (7%) ainsi que plusieurs classes du phylum des *Proteobacteria* : *Alpha-* (11%), *Beta-* (29%), et *Gammaproteobacteria* (10%) (Tableau 1.3). Ces études ont dénombré entre 17 et 268 OTUs (unité taxonomique opérationnelle correspondant à un regroupement d'individus d'une même espèce dont les séquences d'ARNr 16S présentent une similitude de plus de 97,5%) en fonction des systèmes. Ce nombre semble important mais les données disponibles restent insuffisantes pour l'étude des systèmes à grande échelle. Les banques de données du gène ARN 16S sont insuffisantes pour la description d'un système complexe. Cette méthode doit être couplée avec une

méthode quantitative telle que le FISH quantitatif (*fluorescence in situ hybridisation*) ou la qPCR (*quantitative Polymerase Chain Reaction*).

Tableau 1.3 : Nombres d'OTUs et abondances relatives des principales classes identifiées dans des installations à boues activées, modifié d'après (Wagner and Loy, 2002).

Type d'installation et échelle		Bassin d'aération forte charge – Installation municipale	Nitrification/dénitrification – Installation industrielle	SBBR Nitrification – Echelle pilote	Echelle du laboratoire					Moyenne
					SBR EBPR + acétate	SBR EBPR non supplémenté	Réacteur à flux continu EBPR	SBR EBPR	Réacteur EBPR	
<b>Nombre total d'OTUs</b>		<b>32</b>	<b>83</b>	<b>42</b>	<b>144</b>	<b>268</b>	<b>59</b>	<b>109</b>	<b>17</b>	<b>94</b>
<b>Abondances relatives (%)</b>	<i>Bacteroidia</i>	-	-	2	5	13	6	39	50	14
	<i>Actinobacteria</i>	-	1	1	4	2	37	4	9	7
	<i>Alphaproteobacteria</i>	3	26	5	13	17	16	4	5	11
	<i>Betaproteobacteria</i>	52	31	51	33	25	8	17	14	29
	<i>Gammaproteobacteria</i>	18	-	22	8	10	8	5	7	10

SBBR : Sequencing Biofilm Batch Reactor ;

SBR : Sequencing Batch Reactor ;

EBPR : Enhanced Biological Phosphorous Removal

Les techniques ne cessant d'évoluer, deux équipes se sont intéressées en 2012 aux populations microbiennes dans les eaux usées et les boues activées. La première a étudié les boues activées de 14 installations de traitements des eaux usées en Asie (Chine, Hong-Kong et Singapour) et en Amérique (Canada et Etats-Unis) (T. Zhang et al., 2012). La seconde a, quant à elle, étudié 14 STEP de 4 villes différentes en Chine (X. Wang et al., 2012). Ces deux équipes ont utilisé un séquençage 454 impliquant une amplification de l'ARN 16S par PCR en émulsion suivi d'un pyroséquençage à haut débit.

Le nombre d'OTUs présentes dans les boues activées analysées par Zhang et al. (2012) est impressionnant, puisqu'il se situe entre 1183 et 3567, soit 10 à 100 fois plus que

les valeurs obtenues par Wagner et Loy 10 ans auparavant. Cette étude a aussi mis en lumière des différences de communautés plus importantes entre les échantillons plus éloignés géographiquement. Les différences étaient plus importantes entre l'Asie et l'Amérique qu'entre les échantillons d'un même continent (T. Zhang et al., 2012). Certaines analyses ont aussi permis d'identifier des populations minoritaires difficilement explorables, notamment parce qu'une grande partie des séquences ne pouvaient être attribuées à un taxon bactérien.

L'objectif de la seconde étude était de déterminer s'il existait une population microbienne principale et essentielle dans les 14 STEP étudiées en Chine, en réalisant des analyses de pyroséquençage sur des boues activées (X. Wang et al., 2012). Cette étude a montré que 60 genres bactériens étaient présents dans les 14 échantillons. Les taxons les plus présents sont les mêmes que ceux observés par Wagner et Loy (2002) ou Zhang et al. (2012). L'analyse de la variance (test ANOVA) a permis de déterminer les variables environnementales ayant le plus d'influence sur les communautés microbiennes : 25,7% des variations sont dues aux caractéristiques des eaux usées (température, conductivité, pH, oxygène dissous), 23,9% aux paramètres opérationnels de la STEP et seulement 14,7% à la répartition géographique.

En 2016, grâce au développement du séquençage Illumina de la région V4 de l'ARN 16S, une nouvelle étude a été réalisée portant sur 13 STEP danoises (Saunders et al., 2016). Le séquençage Illumina a amélioré la qualité des analyses de population tout en abaissant leur coût. La conclusion principale de cette étude est que, pour réaliser une analyse fonctionnelle représentative, il faut déterminer à la fois les organismes majoritaires en termes d'abondance mais aussi ceux, moins abondants, ayant un rôle important. De plus, certaines communautés essentielles peuvent varier au cours du temps. Par exemple, *Nitrotoga*, connue pour oxyder les nitrites, peut être abondante à certaines périodes et pas à d'autres.

L'étude la plus conséquente à ce jour sur la diversité mondiale des communautés bactériennes dans les stations d'épuration des eaux usées a été publiée en 2019 (Global Water Microbiome Consortium et al., 2019). Elle a été réalisée par le Global Water Microbiome Consortium (GWMC) sur environ 1 200 échantillons de boues activées provenant de 269 STEP réparties dans 23 pays et 6 continents (Figure 1.5).

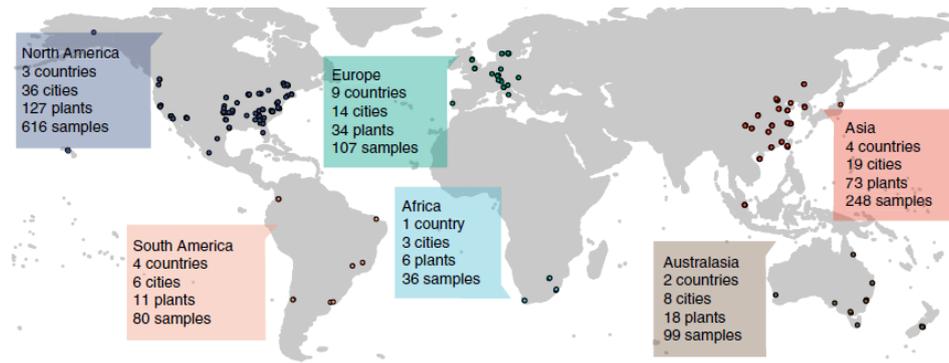


Figure 1.5 : Répartition mondiale des échantillons analysés dans l'étude des microorganismes présents dans les STEP, modifié d'après (Global Water Microbiome Consortium et al., 2019).

Cette étude a tout d'abord révélé l'extraordinaire diversité des communautés bactériennes des boues activées, puisqu'environ un milliard de phylotypes bactériens ont été identifiés. Malgré cette grande diversité, les performances des STEP sont étroitement liées à une communauté bactérienne centrale constituée de 28 OTUs (Figure 1.6). De la même façon que dans les études précédentes, le phylum majoritaire de la communauté centrale, présent à 82%, est celui des *Proteobacteria* (23 OTUs), avec 15 OTUs affiliées à la classe des *Betaproteobacteria*.

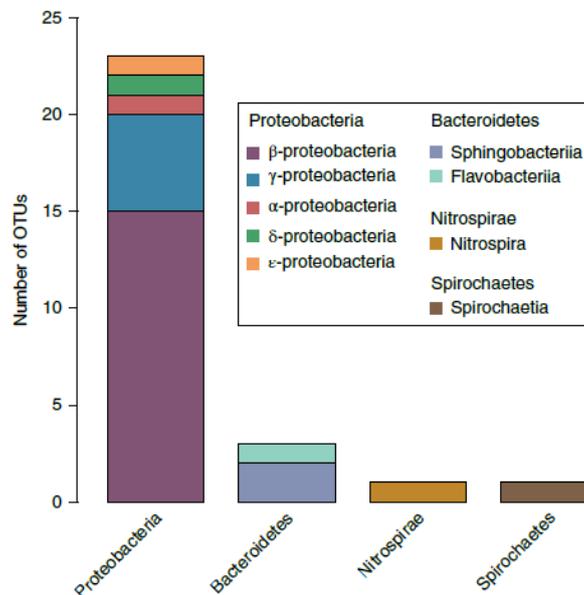


Figure 1.6 : Répartition des 28 OTUs de la population centrale des boues activées par phylum et classe bactérienne (Global Water Microbiome Consortium et al., 2019).

Des investigations semblables ont été réalisées sur les communautés bactériennes d'autres milieux tels que le sol, les fèces humaines ou animales, l'air, l'océan ou l'eau douce

(Global Water Microbiome Consortium et al., 2019). Des communautés centrales ont été retrouvées dans tous les écosystèmes, sauf les fèces animales et l'océan, à cause de la grande variabilité de ces derniers. En revanche, il n'y a pas de chevauchement entre les communautés bactériennes des boues activées et les autres. Cette information suggère que les boues activées possèdent une communauté bactérienne centrale sélectionnée grâce aux conditions particulières de ce milieu.

Certaines des bactéries observées dans les eaux usées et les boues activées présentent une propriété indispensable au développement des procédés électro-microbiens : l'électroactivité. Elles peuvent alors s'auto-organiser en biofilms électroactifs. Le principe de l'électroactivité bactérienne ainsi que les bactéries qui en sont capables sont présentées dans la partie suivante.

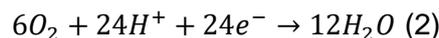
## 2 Biofilms électroactifs

### 2.1 Electroactivité bactérienne

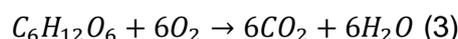
Tout être vivant exploite l'énergie libérée lors de réactions d'oxydation de composés riches en électrons, et donc en énergie (Bennetto, 1990). On peut décrire le principe très général de la production d'énergie en utilisant le glucose comme molécule source d'électrons. Le glucose est oxydé par les cellules, entraînant la production d'électrons :



Ces électrons sont en partie utilisés pour alimenter les réactions nécessaires au maintien et à la croissance cellulaire. De très nombreuses réactions d'oxydo-réduction faisant intervenir des enzymes et des médiateurs tels que le NADH ou les quinones sont impliquées dans ces processus. A la fin de toutes les réactions métaboliques, en bout de chaîne respiratoire, les électrons sont extraits de la cellule grâce à un accepteur final d'électrons, l'oxygène pour les bactéries aérobies (2) :



D'autres accepteur d'électrons sont utilisés par les bactéries anaérobies comme les sulfates, les nitrates ou des composés métalliques oxydés par exemple. En couplant ces deux équations, on arrive à la réaction globale incluant l'oxydation de la matière organique (ici le glucose) et la réduction de l'oxygène, c'est-à-dire l'équation générale de la respiration aérobie :



La majorité des études sur l'électroactivité des bactéries porte sur la substitution de l'équation (2) par une électrode. La bactérie n'évacue plus les électrons vers l'oxygène mais vers une électrode. Il est même couramment dit que la bactérie « respire » l'électrode. Il est maintenant convenu de qualifier ces bactéries d'exoélectrogènes, l'électrode est alors une anode. Il a également été démontré que certaines bactéries sont capables d'accepter des électrons issus d'une électrode. Ces bactéries sont qualifiées d'électrotrophes, l'électrode est alors une cathode. Dans ce cas les études sont moins nombreuses et les mécanismes de transfert d'électrons moins bien identifiés.

En 1911, Michael Cresse Potter, professeur de botanique à l'université de Durham au Royaume-Uni, observe que la désintégration de composés organiques par certaines souches de microorganismes, telles que *Escherichia coli* et *Saccharomyces cerevisiae*, s'accompagne de la création d'une tension entre deux conducteurs qui peut être utilisée pour charger un condensateur. L'auteur démontre que cette production d'énergie est une expression de l'activité des microorganismes car elle est influencée par la température, le milieu réactionnel et le nombre de cellules présentes (Potter, 1911). De très nombreux auteurs citent cette étude dans l'introduction de leurs articles comme le premier exemple de détection électrochimique de la production d'électrons par le métabolisme cellulaire. Il convient cependant de nuancer cet enthousiasme car les mécanismes de transfert d'électrons ne sont pas abordés par Potter et, par la suite, de nombreuses études ont conclu que *E. coli* ne pouvait pas être considérée comme électroactive (Logan et al., 2019).

Avant les années 2000, la détection électrochimique de l'électroactivité des bactéries semblait avoir nécessairement recours à l'ajout de médiateurs en solution par l'expérimentateur. Les microorganismes oxydent le médiateur en solution qui diffuse dans le biofilm bactérien vers la surface de l'électrode où il se réduit (Figure 1.7 – MET).

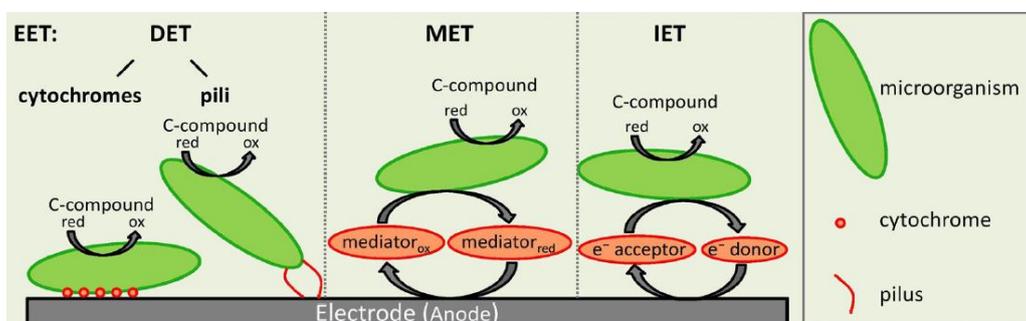


Figure 1.7 : Mécanismes de transfert extracellulaire d'électrons (TEE) : transfert direct via des cytochromes membranaires ou des pili (DET), transfert indirect grâce à des médiateurs en solution (MET) et transfert indirect via des accepteurs d'électrons (hydrogène ou acide formique par exemple) (IET) (Sydow et al., 2014).

La découverte, par des chercheurs coréens (Kim et al., 1999), de la capacité de la bactérie *Shewanella putrefaciens* à transférer des électrons à une électrode sans l'ajout d'aucun médiateur en solution relance les études sur les mécanismes d'électroactivité bactérienne.

En fait, il est sans doute plus exact de dire que ce sont les deux articles de Bond et al et Tender et al., publiés en 2002, qui ont dynamisé ce domaine de recherche en démontrant que des biofilms multi-espèces peuvent développer spontanément des propriétés d'électroactivité. La voie était ainsi ouverte à la conception de piles à combustible microbiennes capables de produire de l'énergie électrique en oxydant la matière organique contenue dans les sédiments marins (Bond et al., 2002; Tender et al., 2002).

Ces deux articles ont en outre induit l'émergence de *Geobacter sulfurreducens* comme bactérie électroactive modèle. Dans le cas de *G. sulfurreducens*, les transferts d'électrons sont directs. Ils peuvent se faire via des protéines membranaires spécifiques, les cytochromes de type C, localisés dans sa membrane externe, qui permettent le passage des électrons par contact direct avec l'électrode (Figure 1.7 – DET). Le deuxième type de transfert électronique direct se fait via la production de *pili* par les bactéries (Figure 1.7 – DET). En effet, certains *pili* possèdent des propriétés de conduction électronique et forment un réseau de nano-fils conducteurs au sein du biofilm (Lovley, 2011, 2017). Cependant, la question du fonctionnement exact des *pili* reste ouverte. Certaines équipes pensent que les *pili* ont seulement un rôle de support sur lequel des cytochromes s'alignent et assurent les transferts électroniques (Strycharz-Glaven et al., 2011). Il semble maintenant accepté que les deux mécanismes existent, la conduction des *pili* étant plutôt le mécanisme de transfert chez *Geobacter* alors que *Shewanella* utiliserait des lignes de cytochromes (Yalcin and Malvankar, 2020).

Il est en outre apparu que de nombreuses bactéries peuvent produire et excréter des médiateurs redox (Figure 1.7 – MET). Ces mécanismes de transfert d'électrons indirect ont notamment été étudiés dans le cas de cultures pures de *Shewanella* (Fredrickson et al., 2008; Hau and Gralnick, 2007) ou de *Pseudomonas* (Bosire and Rosenbaum, 2017; Mavrodi et al., 2006). Il existe aussi des bactéries qui ne sont électroactives qu'en condition de culture mixte. Par exemple *Brevibacillus sp.* PTH1, n'est électroactive qu'en présence de *Pseudomonas sp.* car elle n'est pas capable de produire de médiateur redox mais elle peut utiliser les médiateurs produits par cette dernière (Pham et al., 2008). D'autres bactéries peuvent utiliser un autre type de transfert indirect qui implique un donneur ou un accepteur d'électrons naturel de la cellule (Figure 1.7 – IET) tel que l'hydrogène ou l'acide formique (Sydow et al., 2014).

Plus récemment il a été observé que des bactéries filamenteuses sont capables de transporter des électrons sur des distances de l'ordre du centimètre (Pfeffer et al., 2012). Ces bactéries, présentes dans les zones sédimentaires, utilisent leur électroactivité pour coupler l'oxydation du sulfure, généré par la dégradation de matière organique dans les couches profondes de sédiments, à la réduction de l'oxygène dans les couches supérieures. Ce couplage a lieu grâce au transport d'électrons par les bactéries filamenteuses au travers de zones de quelques centimètres d'épaisseur.

## 2.2 Ubiquité des bactéries électroactives

Une question qui s'est posée dès les premières découvertes de bactéries électroactives est de savoir si elles ne proviennent que de certains écosystèmes particuliers, tels que les sédiments marins, ou si, au contraire, elles sont présentes dans une multitude d'écosystèmes. Deux articles de revue (Chabert et al., 2015; Koch and Harnisch, 2016) montrent que des bactéries électroactives ont été trouvées dans un large éventail d'écosystèmes, même les plus extrêmes.

Des bactéries électroactives ont été identifiées dans divers environnements aquatiques naturels tels que des eaux ou des sédiments de lacs (Karra et al., 2013), de rivières (L. Chen et al., 2018), dans l'océan (Erable et al., 2009b; Matturro et al., 2017) ou encore dans des mangroves (J. Chen et al., 2018). Elles sont aussi présentes dans des milieux terrestres tels que des sols contaminés par des hydrocarbures (Li et al., 2018) ou riches en fer (Su et al., 2020) ou encore du compost (Magotra et al., 2020). En plus des environnements naturels, il est également possible de les trouver dans des écosystèmes d'origine anthropique tels que les eaux usées domestiques ou industrielles (He et al., 2017), issues par exemple de l'industrie laitière (Choudhury et al., 2021) ou papetière (Ketep et al., 2013).

Ces bactéries sont aussi présentes dans des environnements extrêmes tels que les sédiments acides, les eaux acides d'industries métallurgiques, et même au niveau des monts hydrothermaux localisés en eaux profondes ou des volcans sous-marins. Les bactéries électroactives extrêmophiles possèdent en général un grand nombre de cytochromes et ont la faculté de réduire les oxydes métalliques solides (Logan et al., 2019). Parmi les bactéries extrêmophiles électroactives, il est possible de citer *Thermincola carboxydophila*, thermophile, présente au niveau des monts hydrothermaux (Mathis, 2007) ou *Mariprofundus ferrooxydans*, une espèce ferroréductrice identifiée au niveau d'un volcan sous-marin à Hawaii (Emerson et al., 2007).

Une étude récente réalisée par Logan et al. (2019) a confirmé l'ubiquité et la diversité des microorganismes électroactifs (Logan et al., 2019). Comme évoqué plus haut, cette étude les classe en deux catégories : les exoélectrogènes, capables de transférer des électrons à l'électrode et les électrotrophes capables d'utiliser les électrons provenant d'une électrode. Les microorganismes exoélectrogènes peuvent être issus des trois domaines du monde vivant, les bactéries, les archées ou les eucaryotes.

Les exoélectrogènes les plus connues sont les bactéries ferroréductrices telles que *Geobacter sulfurreducens* (Bond and Lovley, 2003; Reguera et al., 2006) ou *Shewanella oneidensis* (Kotloski and Gralnick, 2013; Leung et al., 2020). Mises en œuvre dans des piles à combustible microbiennes, elles peuvent produire de fortes densités de puissance, jusqu'à 3,0 W/m<sup>2</sup> pour *S. oneidensis* (Ringeisen et al., 2006) et 3,9 W/m<sup>2</sup> pour *G. sulfurreducens* (Yi et al., 2009) à des températures modérées. Ici, le qualificatif de « forte » pour les densités de puissance s'entend évidemment dans le contexte des piles microbiennes. En effet, ces valeurs paraîtraient dérisoires dans le domaine des piles à hydrogène conventionnelles qui peuvent atteindre des densités de puissance de 10 000 W/m<sup>2</sup>. Des archées hyperthermophiles (Sekar et al., 2017) ou des levures (Hubenova and Mitov, 2015) peuvent aussi générer des puissances significatives si elles sont placées dans les bonnes conditions expérimentales (milieu de culture, température, etc.) (Logan et al., 2019).

Les microorganismes électrotrophes sont moins divers et assurent des densités de courant moins élevées que les exoélectrogènes, avec un maximum de 1 A/m<sup>2</sup> obtenu à un potentiel imposé de -0,9 V vs Ag/AgCl pour *Clostridium ljungdahlii* (Bajracharya et al., 2015). Ils sont capables d'utiliser différents accepteurs finaux d'électrons pour la respiration cellulaire : oxygène, dioxyde de carbone, sulfates, nitrates..., ce qui permettrait de piloter de nombreuses réactions par une cathode.

L'analyse phylogénétique des séquences de gènes d'ARNr 16S pour les procaryotes et 18S pour les eucaryotes confirme la diversité des organismes exoélectrogènes (Figure 1.8a) et électrotrophes (Figure 1.8b) au sein des communautés microbiennes multi-espèces. Les populations sont dominées dans les deux cas par le phylum des *Proteobacteria* avec, pour les exoélectrogènes une majorité des genres *Shewanella* de la classe des *Gammaproteobacteria* et *Geobacter* de la classe des *Deltaproteobacteria*. Pour les électrotrophes les populations sont plus variées avec tout de même la présence de plusieurs espèces du genre *Clostridium* du phylum des *Firmicutes*.

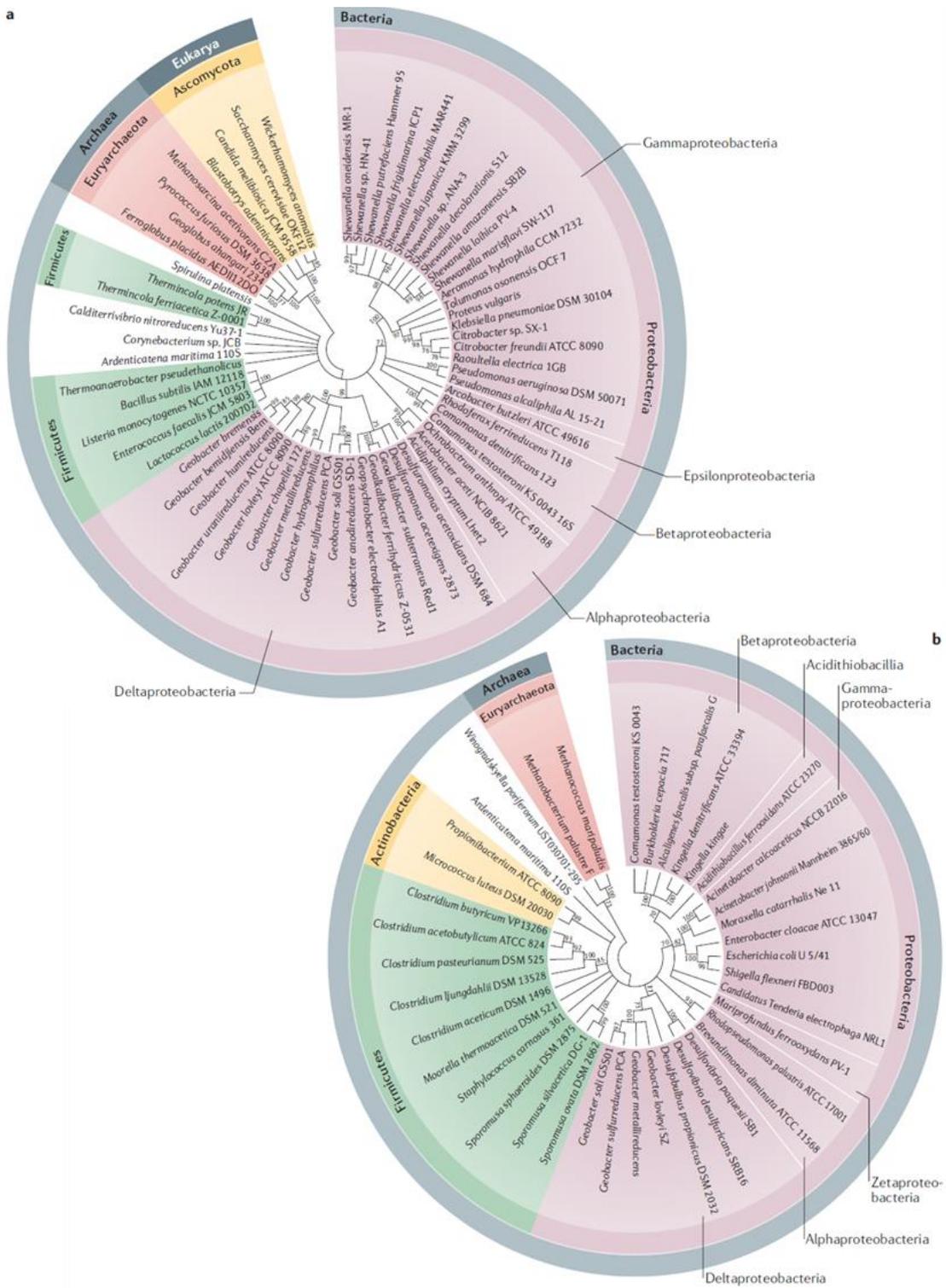


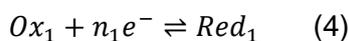
Figure 1.8 : Diversité des microorganismes (a) exoélectrogènes et (b) électrotrophes obtenue par l'analyse phylogénétique des séquences de gènes d'ARNr 16S (procaryote) et 18S (eucaryotes) (Logan et al., 2019).

L'ubiquité des microorganismes électroactifs a laissé présager de très nombreuses applications dans des domaines aussi variés que la production d'énergie électrique, d'hydrogène, de méthane, le traitement des effluents, la synthèse de produits à haute valeur ajoutée ou la conception de biocapteurs (Schröder et al., 2015). Un article de revue avait dénombré en 2013 près d'une cinquantaine d'applications différentes (Wang and Ren, 2013). Parmi tous les procédés électro-microbiens envisagés, la pile à combustible microbienne est certainement le plus étudié. Bien qu'elle ne soit pas le sujet de ces travaux de thèse, il paraît utile de donner quelques éléments bibliographiques relatifs à la pile microbienne dont le principe est très proche de celui du tuba électro-microbien développé dans la thèse.

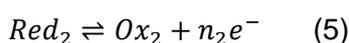
### 3 Pile à combustible microbienne (PCM)

#### 3.1 Principe de la PCM

Le concept de pile repose sur la transformation d'une énergie chimique en énergie électrique par un processus électrochimique. Une pile est composée d'une anode (pôle négatif) où se produit une réaction d'oxydation :



Les électrons produits par cette oxydation circulent dans le circuit électrique externe jusqu'à la cathode (pôle positif) où ils sont impliqués dans la réduction de composés en solution :



Au sein de la solution le transport des ions compense la perte ou la création d'espèces chargées provoquée par les réactions électrochimiques à la surface des électrodes. L'électroneutralité de la solution est ainsi respectée.

Une pile à combustible microbienne (PCM) est une pile à combustible dans laquelle des bactéries électroactives sont utilisées comme catalyseur (Bennetto, 1990) (Figure 1.9). Dans sa signification actuelle, le concept de PCM suppose généralement que les bactéries électroactives forment un biofilm électroactif à la surface d'au moins l'une des électrodes (Kiran and Patil, 2019). L'anode et la cathode peuvent baigner dans le même électrolyte ou être dans des compartiments différents séparés par un séparateur qui doit permettre les transports ioniques. Des membranes échangeuses d'ions sont souvent utilisées (Oliot et al., 2016) mais des séparateurs plus simples ont donné d'excellents résultats (Oliot et al., 2017).

Le substrat riche en matière organique est oxydé par le biofilm électroactif anodique qui utilise l'électrode comme accepteur final d'électrons. Les électrons circulent vers la cathode où ils sont évacués le plus souvent par la réduction de l'oxygène. Il peut aussi exister des compartiments cathodiques anaérobies, ce sont alors des sulfates ou des nitrates qui jouent le rôle d'accepteur final d'électrons (Kumar et al., 2016).

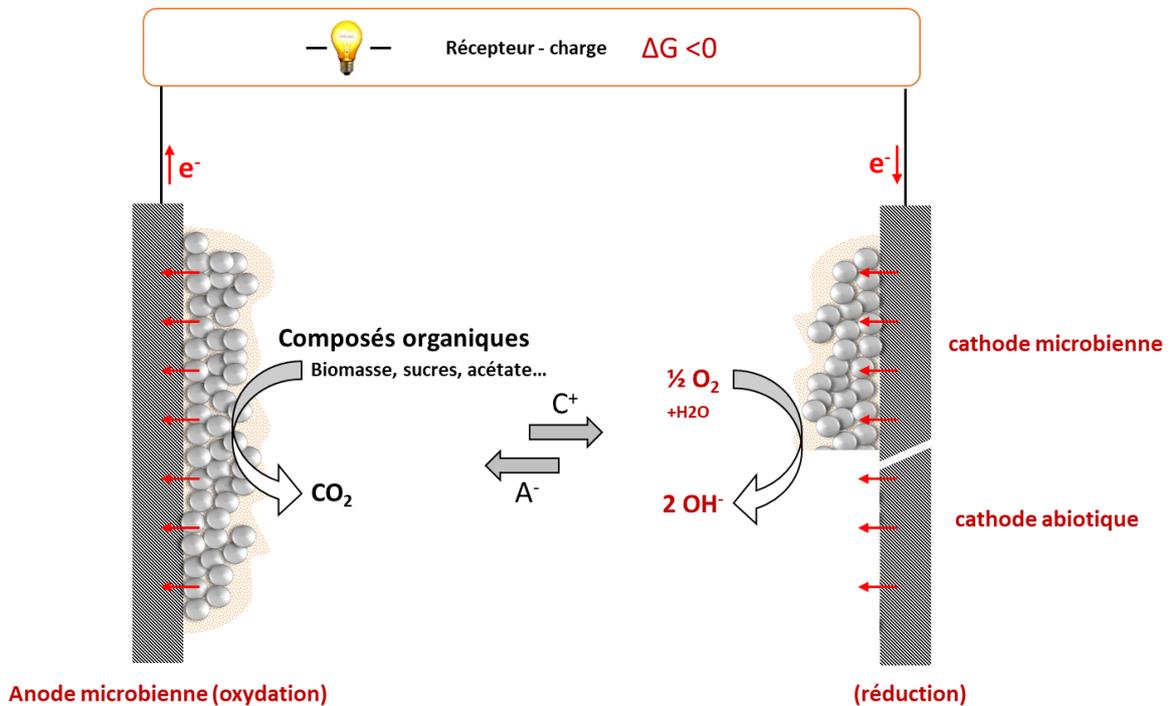
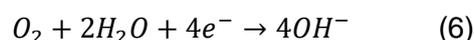


Figure 1.9 : Principe de la pile à combustible microbienne, d'après Benjamin Erable.

Différentes configurations de PCM ont été explorées dans la bibliographie. La forme en H est couramment utilisée, sans doute parce qu'elle est la moins onéreuse (Figure 1.10A). Elle est constituée de deux réacteurs reliés par un tube équipé d'un séparateur, souvent une membrane échangeuse de cations qui permet le passage des ions positifs vers la cathode mais interdit, ou a minima réduit, celui des anions. Il est ainsi possible de minimiser le transport du substrat, qui est souvent sous forme anionique (forme dissociée des acides gras volatils), du compartiment anodique vers le compartiment cathodique.

Une configuration plus sophistiquée met en œuvre une cathode à air. La PCM est alors constituée d'un seul compartiment contenant le milieu et l'anode. La cathode est, elle, placée à l'interface entre le milieu et l'air pour permettre l'accès de l'eau par sa face exposée à l'électrolyte et l'accès de l'oxygène par sa face exposée à l'air, afin de réaliser la réduction de l'oxygène (Figure 1.10B) :



Enfin, des configurations plus complexes sont possibles avec, par exemple, une recirculation de l'électrolyte ou en couplant plusieurs PCM en série dans un réacteur unique (Figure 1.10C). Quelques exemples de performance de ces différents types de PCM sont donnés dans la partie 5 de ce chapitre.

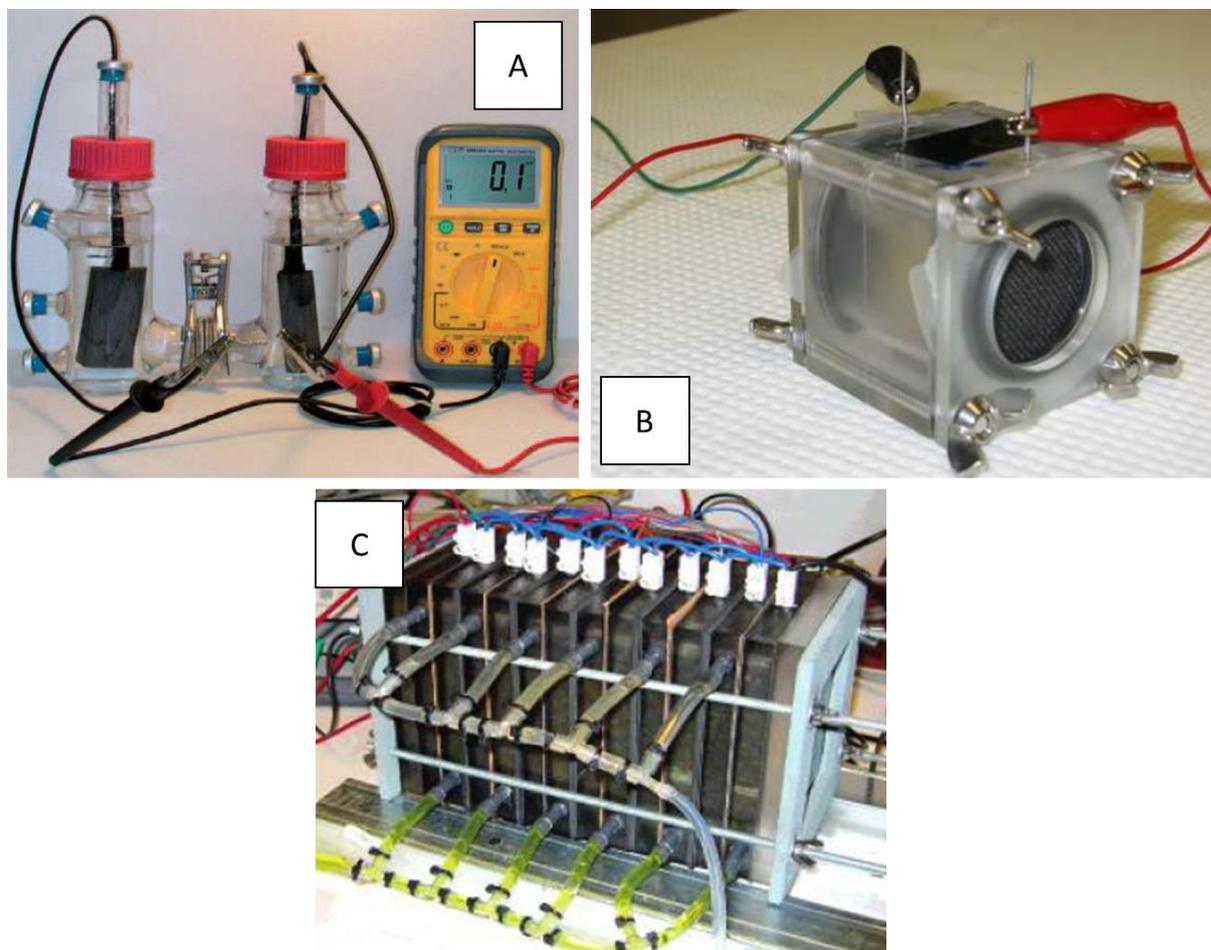


Figure 1.10 : Différentes configurations de PCM. (A) PCM double compartiments, forme en H (Lovley, 2006), (B) PCM simple compartiment avec cathode à air et (C) PCM multi-compartiments dans laquelle 6 PCM sont réunies dans un réacteur en recirculation (Logan et al., 2006).

### 3.2 Caractérisation de la PCM

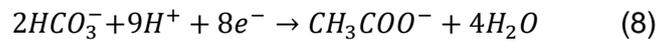
Bruce E. Logan de Penn State University est l'auteur le plus prolifique sur les PCM. L'un de ses anciens articles reprend quelques notions d'énergétique appliquée aux PCM (Logan et al., 2006). Lorsque l'on connaît les couples redox mis en œuvre, les potentiels redox des réactions qui ont lieu à l'anode et à la cathode peuvent être calculés avec la relation de Nernst :

$$E(Ox/Red) = E^0(Ox/Red) + \frac{RT}{nF} \ln \left( \frac{\prod_i a_i(Ox)^\alpha}{\prod_j a_j(Red)^\beta} \right) \quad (7)$$

Avec :

- R : constante des gaz parfait (R=8,314 J/K.mol)
- F : constante de Faraday (F=96 485 C/mol)
- T : température (K)
- n : nombre d'électrons mis en jeu (mol)
- a<sub>i</sub> : activité de l'espèce considérée
- E<sup>0</sup> : potentiel standard du couple

Dans le cas de l'oxydation de l'acétate (ici la réaction est écrite en réduction conformément aux règles de la thermodynamique) :



et le potentiel d'équilibre (V vs Ref) de la réaction anodique est :

$$E'_{ox} = E^0_{ox} - \frac{RT}{8F} \ln \left( \frac{[CH_3COO^-]}{[HCO_3^-]^2[H^+]^9} \right) \quad (9)$$

A la cathode, dans le cas de la réduction de l'oxygène (6), le potentiel d'équilibre (V vs Ref) est :

$$E'_{red} = E^0_{red} - \frac{RT}{4F} \ln \left( \frac{1}{pO_2[H^+]^4} \right) \quad (10)$$

Pour qu'une pile produise de l'énergie, il faut donc que la variation d'enthalpie libre ( $\Delta G$ ) soit inférieure à zéro. La variation d'enthalpie libre relative au couplage de l'oxydation de l'acétate à l'anode avec la réduction de l'oxygène à la cathode est donnée par :

$$\Delta G = -nF(E_{red} - E_{ox}) \quad (11)$$

La différence entre les potentiels de l'anode et de la cathode, ou la variation d'enthalpie libre, permettent de calculer la tension maximale, également appelée force électromotrice  $E_{fem}$  (V), que peut délivrer la pile :

$$E_{fem} = -\frac{\Delta G}{nF} = E_{red} - E_{ox} \quad (12)$$

La force électromotrice est de l'ordre de 1,1 V pour une PCM dont l'anode oxyde de l'acétate ( $HCO_3^-$  5 mM,  $CH_3COO^-$  5 mM, pH 7) et la cathode réduit de l'oxygène ( $pO_2$  0,2 atm, pH 7). En réalité, la tension mesurée aux bornes d'une PCM est bien inférieure en raison de différentes pertes.

La tension de cellule réelle  $E_{cell}$  est donc égale à la force électromotrice moins les pertes :

$$E_{cell} = E_{fem} - (\Sigma\eta_a + |\Sigma\eta_c| + I \cdot R_{\Omega}) \quad (13)$$

Avec :

- $\Sigma\eta_a$  et  $\Sigma\eta_c$  : les surtensions à l'anode et la cathode respectivement (V)
- $I$  : le courant produit (A)
- $R_{\Omega}$  : la résistance ohmique du système ( $\Omega$ )

Notons que les surtensions anodiques et cathodiques incluent ici les surtensions d'activation purement électrochimiques mais également les surtensions dues aux transferts de masse et aux métabolismes microbiens. La résistance ohmique du système comprend la résistance électrique des électrodes, sans oublier d'y inclure les résistances qui peuvent apparaître aux connexions, et la résistance au flux d'ions au travers des électrolytes anodique et cathodique et du séparateur le cas échéant. Les différents facteurs influençant les performances de la PCM sont décrits dans la partie 3.3 ci-après.

La tension de cellule  $E_{cell}$  (V) est mesurée au travers d'une résistance externe et le courant calculé avec la loi d'Ohm :

$$E_{cell} = R_{ext} \cdot I \quad (14)$$

Avec :

- $R_{ext}$  : la résistance externe ( $\Omega$ )
- $I$  : l'intensité (A)

L'un des principaux paramètres utilisés pour définir la performance globale d'une PCM est la puissance  $P$  (W) qu'elle délivre. La puissance est calculée grâce à la mesure de tension aux bornes de la résistance externe :

$$P = E_{cell} \cdot I = E_{cell}^2 \cdot R_{ext} \quad (15)$$

Pour comparer différents systèmes entre eux, la puissance est souvent exprimée en termes de densité de puissance ( $W/m^2$ ) en la rapportant à la surface de l'une des électrodes, souvent la cathode car c'est elle qui limite la puissance délivrée dans la majorité des PCM. Il peut également arriver que la densité de puissance soit exprimée par rapport au volume du réacteur ( $W/m^3$ ), ce qui devrait être évité. En effet, l'intensité, et corolairement la puissance, sont des grandeurs extensives par rapport à la surface des électrodes mais pas par rapport au volume de l'électrolyte. L'expression de densités de puissance par rapport à un volume doit être réservée aux électrodes volumiques.

Le potentiel (E) de l'anode ou de la cathode ne peut être déterminé qu'en mesurant la tension de l'électrode par rapport à une électrode de référence. Par convention, l'origine des potentiels est donnée par l'électrode standard à hydrogène (ESH), cependant, son utilisation n'étant pas très pratique, elle est remplacée dans les expériences par une électrode de référence argent-chlorure d'argent (Ag/AgCl) ou une électrode au calomel saturée (ECS). Pour l'électrode Ag/AgCl, placée dans une solution saturée de chlorure de potassium, le potentiel est de +0,197 V par rapport à ESH, alors qu'il est de +0,242 V par rapport à ESH pour l'ECS.

Les PCM sont caractérisées par leur courbe puissance/intensité, obtenue en faisant varier la résistance externe du circuit et en mesurant la valeur de la tension associée à chaque résistance. Ces courbes se présentent sous la forme d'une cloche (Figure 1.11). Pour des résistances très élevées (ou, à la limite, en circuit ouvert), la tension est maximale mais le courant, et donc la puissance, sont nuls. Lorsque la résistance diminue, le courant et la puissance augmentent jusqu'à un point de puissance maximale. Si l'objectif est de produire une puissance maximale, on cherche à se placer au sommet de la courbe, c'est-à-dire au point (a) de la Figure 1.11. Au-delà de ce point, la diminution de la résistance donne des tensions faibles qui font baisser la puissance, jusqu'à une résistance nulle (condition de court-circuit) qui donne le courant maximal mais une tension nulle (Figure 1.11 - point (b)). Il s'agit là du point de fonctionnement optimal pour un biotuba, comme expliqué par la suite.

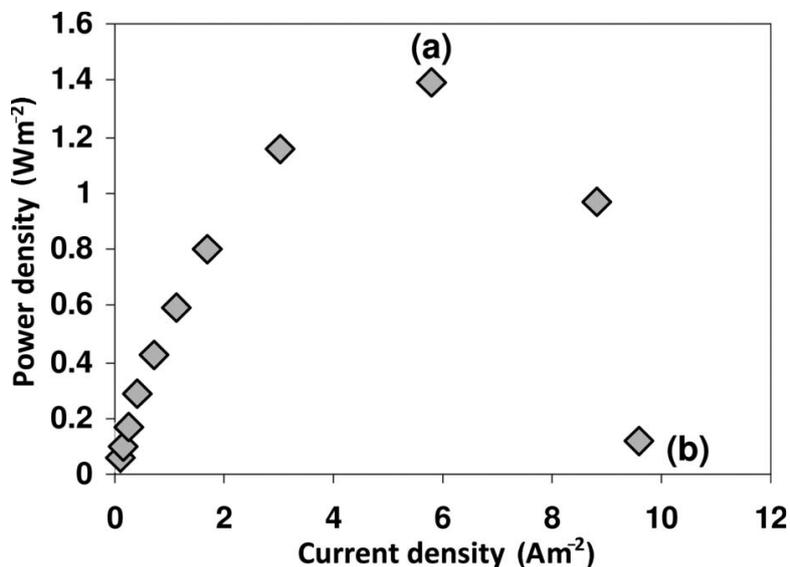


Figure 1.11 : Courbe puissance-intensité d'une PCM avec le point de fonctionnement optimal (a) pour une PCM et (b) pour un biotuba (Erable et al., 2011).

Les PCM ont été largement utilisées pour le traitement d'effluents. Les abattements de matière organique sont alors évalués de façon classique par les mesures de DCO (Demande

Chimique en Oxygène), DBO<sub>5</sub> (Demande Biochimique en Oxygène sur 5 jours) ou COT (Carbone Organique Totale), présentées dans la première partie de ce chapitre.

Afin de comparer le traitement d'effluent par les PCM à des traitements conventionnels, il est important d'évaluer la charge journalière maximale de traitement, exprimée classiquement en kg DCO/m<sup>3</sup>/j. Dans le cas d'une PCM, elle peut être rapportée au volume anodique en m<sup>3</sup> pour la comparer à un procédé de type boues activées, ou à la surface anodique en m<sup>2</sup> pour la comparer à un procédé utilisant un biofilm fixe.

### 3.3 Limitations des PCM

Il y a toujours une différence importante entre les performances théoriques et réelles des PCM, comme cela est résumé par l'équation 13. Cette différence est due à plusieurs facteurs limitants tels que la chute ohmique au sein de(s) électrolyte(s), les surtensions électrochimiques, les pertes dues au métabolisme et celles liés aux transferts de masse. La chute ohmique et les pertes dues aux surtensions d'activation et aux transferts de masse sont communes à tous les procédés électrochimiques.

Les procédés électro-microbiens ajoutent à ces pertes l'énergie détournée par les microorganismes. Les bactéries intègrent des électrons en oxydant un substrat à un niveau énergétique haut (donc potentiel bas) et les transfèrent à un accepteur final d'électrons à un niveau énergétique bas (donc potentiel haut). Cet accepteur final est l'anode dans le cas d'une PCM. Ce flux électronique d'un niveau énergétique élevé à un niveau énergétique plus faible donne son énergie à la cellule bactérienne. Plus la différence est grande entre le potentiel auquel le substrat est oxydé et celui de l'anode, plus le gain énergétique est important pour les bactéries, mais cela diminue d'autant la puissance de la PCM.

Au titre de détail, on notera ici que le biofilm électroactif n'est pas un catalyseur au sens strict du terme, comme on s'accorde à le dire par souci de simplification. En effet, les cellules bactériennes détournent à leur profit une partie de l'énergie issue de l'oxydation du substrat, alors qu'un catalyseur réel abaisse l'énergie d'activation d'une réaction sans consommer d'énergie.

Différents phénomènes spécifiques à la nature microbienne du catalyseur peuvent entraîner des pertes de performance supplémentaires (Oliot et al., 2016; Oliot, 2017). Il est nécessaire de maintenir le pH de l'électrolyte proche de la neutralité pour permettre la croissance bactérienne (Figure 1.12 – 1). Par malheur, il n'existe pas de catalyseur efficace

pour la réduction de l'oxygène à des valeurs de pH proches de la neutralité, même le platine perd son efficacité. La réaction de réduction de l'oxygène à la cathode est donc une étape sévèrement limitante (Figure 1.12 – 3'). De plus, les milieux utilisés (eaux usées, sédiments marins, sols...) présentent une conductivité ionique très faible par rapport aux électrolytes couramment utilisés dans les procédés électrochimiques, ce qui augmente considérablement la chute ohmique ( $R_{\Omega}$ ) (Figure 1.12 – 1' et 1''). Par exemple, la conductivité ionique d'eaux résiduaire urbaines dépasse rarement 1 S/m alors que celle d'une membrane échangeuse de protons utilisée dans les piles à hydrogène conventionnelles est de l'ordre de 15 S/m.

L'anode étant placée en conditions anaérobies, une entrée parasite d'oxygène peut être défavorable à la croissance du biofilm voire même inhiber ou tuer les bactéries exoélectrogènes strictement anaérobies (Figure 1.12 – 2'). Inversement, la présence de substrat et de microorganismes à la surface de la cathode entraîne son *biofouling*, c'est-à-dire un encrassement qui masque une partie de sa surface. (Figure 1.12 – 3'').

Enfin, l'acidification locale de l'anode due à la production de protons par la réaction d'oxydation (8) et l'alcalinisation locale de la cathode (6) sont deux autres processus limitants majeurs. L'acidification de l'anode est nocive pour le biofilm qui perd rapidement ses propriétés électroactives à des pH inférieurs à environ 6 (Gil et al., 2003; Harnisch and Schröder, 2009; Popat and Torres, 2016). Il en est de même pour l'alcalinisation de la cathode, qui défavorise la réduction de l'oxygène d'un point de vue thermodynamique (Figure 1.12 – 2 et 3). En outre, les milieux utilisés dans les PCM contiennent souvent des ions calcium et magnésium et l'alcalinisation de la cathode provoque rapidement des dépôts d'oxydes ou de carbonates de calcium et de magnésium qui masquent progressivement sa surface (Rousseau et al., 2020).

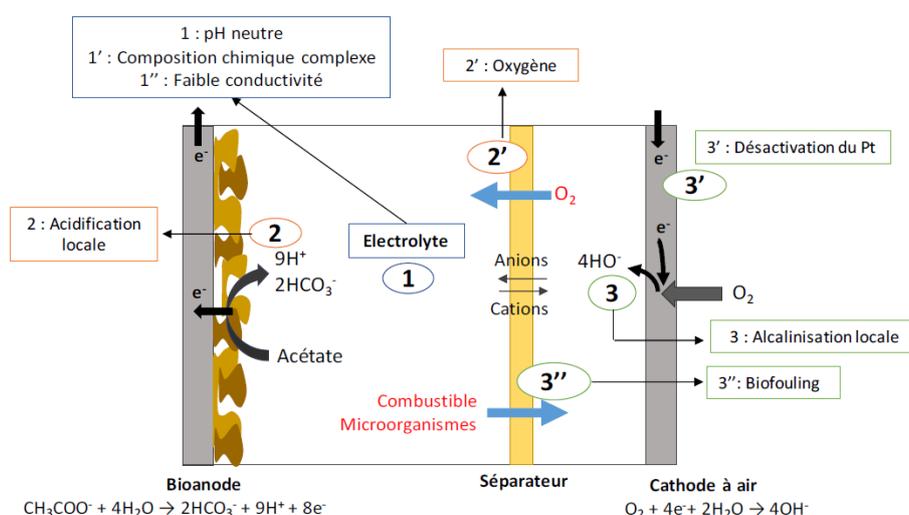


Figure 1.12 : Schéma de fonctionnement d'une PCM et des limitations induites (1) dans l'électrolyte, (2) à la bioanode, (3) à la cathode (Oliot, 2017).

Il est possible de réduire ces différentes sources de pertes de performances (Logan et al., 2006). La chute ohmique peut être réduite en minimisant l'écart entre les électrodes, en utilisant une membrane à faible résistivité, en vérifiant tous les contacts électriques et en augmentant au maximum la conductivité de la solution. Les pertes d'activations peuvent être limitées en améliorant les propriétés catalytiques des électrodes, en augmentant la température de fonctionnement du système ou en développant un biofilm enrichi avec les espèces électroactives les plus efficaces.

Pour les pertes dues au processus métabolique bactérien, certains suggèrent que le potentiel de l'anode doit être maintenu le plus bas possible afin de favoriser la sélection d'espèces électroactives capables de catalyser l'oxydation du substrat en détournant le moins possible d'énergie. La limite basse du potentiel applicable semble être lorsque la fermentation du substrat permet aux bactéries un gain énergétique plus important que le transfert extracellulaire vers l'anode.

## 4 Electrodes dans les systèmes électro-microbiens

### 4.1 Anodes microbiennes

#### 4.1.1 Présentation et caractérisation

Les anodes doivent être colonisées par des microorganismes assurant un flux d'électrons extracellulaire le plus élevé possible. Pour cela il est possible d'agir sur deux paramètres, la surface spécifique de l'électrode ( $m^2/m^3$ ) et la densité surfacique de courant ( $A/m^2$ ) (Xie et al., 2015).

La surface spécifique doit être optimisée afin d'obtenir une macroporosité importante avec une taille et une forme de pores qui augmente l'accessibilité et permette une colonisation interne durable sans colmatage (Chong et al., 2019a).

L'optimisation de la densité surfacique du courant passe par l'optimisation des propriétés de surface de l'électrode afin d'augmenter l'adhésion du biofilm et la vitesse des transferts d'électrons avec les composés redox du biofilm (cf. partie 2.1 de ce chapitre). Pour cela un certain nombre de structurations et de traitements de surface sont possibles afin d'augmenter la conductivité, la rugosité, la microporosité, la biocompatibilité, le caractère hydrophile, et le stockage de charges à l'interface (capacité de double couche) (Cai et al.,

2013; Caizán-Juanarena et al., 2020; Champigneux et al., 2019; Guo et al., 2015; kumar et al., 2013; Lai et al., 2018; Park et al., 2014; Roubaud et al., 2021; Sonawane et al., 2017).

Dans ce contexte, l'évaluation de la porosité revêt une grande importance. Elle est généralement réalisée par une analyse BET (Brunauer-Emmett-Teller) c'est-à-dire en mesurant l'adsorption et la désorption de l'azote sur le matériau. Le problème de cette analyse est qu'elle inclut la surface des pores à l'échelle du nanomètre et du micromètre. Cette mesure donne des informations pertinentes sur la rugosité de surface, mais les pores à l'échelle du nanomètre et du micromètre ne sont pas accessibles aux cellules microbiennes et ils sont rapidement obstrués par le biofilm (Chong et al., 2019b). Les techniques d'imagerie telles que la microscopie électronique à balayage (MEB) permettent d'obtenir des informations plus précises sur la taille des pores et leur éventuel colmatage après colonisation. Il faut toutefois garder en mémoire que cette technique exige une préparation de l'échantillon qui peut affecter la structure du biofilm.

De nombreuses études se basent sur la densité de puissance ( $W/m^2$  voire  $W/m^3$ ) ou la densité de courant ( $A/m^2$ ) délivrée par les PCM pour caractériser les anodes microbiennes. Toutefois les PCM ne sont pas des systèmes électro-analytiques et la mesure des performances de l'anode est fortement affectée par la configuration de la pile, sa résistance interne, la position, la géométrie et le matériau de la contre-électrode et d'autres paramètres opératoires (Rimboud et al., 2014). Par exemple, les densités de puissance ou de courant anodiques obtenues avec une PCM peuvent être biaisées si la cinétique de la cathode est limitante. Il faudrait donc se concentrer sur les densités de courant ( $A/m^2$ ) obtenues avec des systèmes à 3 électrodes spécifiquement configurés pour les approches analytiques. De plus, il est nécessaire de mener des études à long terme afin d'évaluer la stabilité des densités de courant et la tenue de l'électrode face aux conditions du milieu et au colmatage.

#### 4.1.2 Matériaux et structure des électrodes

Les anodes microbiennes peuvent être conçues avec de nombreux matériaux et sous diverses formes. Il peut par exemple s'agir de matériaux monolithiques poreux ou non poreux, de matériaux fibreux (feutres ou tissus de carbone) ou encore d'électrodes sous forme de lits (granules de graphite conducteurs par exemple) (Xie et al., 2015). Trois grandes catégories de matériaux sont utilisées : des matériaux carbonés, des métaux tels que l'acier inoxydable ou des matériaux composites plus complexes impliquant par exemple des nanotubes de carbone ou des polymères (Sonawane et al., 2017).

Les anodes microbiennes les plus performantes atteignent des densités de courant de l'ordre de la centaine d'A/m<sup>2</sup>. Par exemple, une densité de courant de 200 A/m<sup>2</sup> a été obtenue avec une anode microbienne en carbone stratifié ondulé dans un milieu constitué d'eaux usées synthétiques (Chen et al., 2012). Cependant, ces électrodes microbiennes complexes ne sont pas souvent utilisées pour le traitement des eaux usées, domaine dans lequel sont privilégiés des matériaux plus faciles à mettre en œuvre et moins susceptibles de colmatage à long terme. Le développement d'électrodes poreuses avec un bon rapport coût-efficacité semble être une priorité à l'heure actuelle pour les applications dédiées au traitement d'effluents (Xie et al., 2015).

Pour concevoir une électrode microbienne poreuse, il faut prendre en compte la taille des bactéries, de quelques centaines de nanomètres à quelques micromètres (Richter et al., 2008; Xing et al., 2008; Zuo et al., 2008), et l'épaisseur des biofilms électroactifs qui varie de quelques dizaines à quelques centaines de micromètres (Baudler et al., 2015; Richter et al., 2008). Les micropores doivent donc au moins faire quelques micromètres pour être accessibles à la colonisation. En fait, la taille de pores doit être de l'ordre de quelques centaines de micromètres (Chong et al., 2019b) pour ne pas être colmatés lors du vieillissement du biofilm et permettre l'alimentation du biofilm en substrat et l'élimination des produits (Champigneux et al., 2019).

Les matériaux les plus couramment utilisés pour la formation d'anodes microbiennes ainsi que leurs avantages et leurs inconvénients sont résumés ci-dessous (Tableau 1.4). Dans les eaux usées domestiques, la plupart des études mettent en œuvre des matériaux carbonés sous forme de tissus, feutres ou papiers, ou encore les brosses, tiges ou plaques en graphite. Ces électrodes présentent une porosité importante, une bonne conductivité et sont pour la plupart relativement peu coûteuses et faciles à mettre en œuvre (Do et al., 2018).

*Tableau 1.4 : Avantages et inconvénients des principaux matériaux utilisés pour la construction d'anodes microbiennes, modifié d'après (Do et al., 2018).*

<b>Matériau anodique</b>	<b>Avantages</b>	<b>Inconvénients</b>	<b>Référence</b>
<b>Tissu de carbone</b>	Surface spécifique et résistance mécanique élevées	Relativement coûteux	(Ishii et al., 2008)
<b>Papier de carbone</b>	Porosité importante	Fragile, coûteux	(Kim et al., 2007)

Matériau anodique	Avantages	Inconvénients	Référence
<b>Feutre de carbone</b>	Haute porosité, coût relativement faible, surface importante	Grande résistance, hydrophobicité	(Kim et al., 2002)
<b>Acier inoxydable</b>	Haute conductivité électrique, relativement peu coûteux, accessibilité aisée	Faible surface spécifique, problèmes de biocompatibilité et de corrosion	(Dumas et al., 2007)
<b>Tige / plaque en graphite</b>	Bonne conductivité électrique et stabilité chimique, relativement peu coûteux, accessibilité aisée	Surface difficilement augmentable	(Liu et al., 2005)
<b>Brosse en graphite</b>	Grande surface	Colmatage Fragilité	(Ahn and Logan, 2010)

Les brosses en graphite assurent un bon contact électrique grâce au fil central métallique mais leur taille reste limitée à cause de la fragilité des fibres. De plus, le faible espacement entre les fibres peut être colmaté par le biofilm (Do et al., 2018). Les plus hautes densités de courants obtenues dans les eaux usées domestiques avec une brosse en graphite sont de  $1,7 \text{ A/m}^2$  (Choi and Ahn, 2013) et  $2,0 \text{ A/m}^2$  (Ahn and Logan, 2010). Il est aussi possible, dans un même système, de multiplier les brosses afin d'augmenter la surface anodique. Ainsi, des systèmes avec 3 brosses ont permis d'obtenir des densités de courant de l'ordre de  $1,0 \text{ A/m}^2$  (Kim et al., 2015; Ren et al., 2014). Un système avec 32 brosses a même été testé, mais la densité de courant n'était alors que de  $0,4 \text{ A/m}^2$  (Feng et al., 2014). Il faut noter que ces densités de courant sont obtenues dans des PCM et la cathode limite le plus souvent la production d'électricité. Les densités de courants sont d'ailleurs calculées dans ce cas par rapport à la surface cathodique, limitante.

Des électrodes poreuses fabriquées à base de fibres tels que les papiers ou tissus de carbone sous forme bidimensionnelle (2D), ou le feutre de carbone sous forme tridimensionnelle (3D), sont couramment utilisées, notamment dans les eaux usées (Wei et al., 2011). Dans le cas du feutre de carbone, l'électrode présente une structure poreuse ouverte mais l'espacement entre les fibres n'est pas uniforme et peut être colmaté relativement rapidement. Il a été montré que dans un milieu riche, constitué d'eaux usées, de boues activées et de biodéchets, seule la surface du feutre était colonisée par le biofilm. Ainsi, une

structure 2D constituée de tissu de carbone produisait une densité de courant similaire à une structure 3D en feutre de carbone, de l'ordre de  $3,5 \text{ A/m}^2$  (potentiel de  $-0,15 \text{ V}$  vs ECS) (Blanchet et al., 2016). Des densités de courant jusqu'à  $2,0 \text{ A/m}^2$  à un potentiel de  $-0,10 \text{ V}$  vs ECS ont été obtenues avec ce type de matériau dans les eaux usées domestiques (Roubaud et al., 2019).

Les performances du feutre de carbone peuvent être limitées par une résistivité près de 200 fois plus importante que celle du graphite (González-García et al., 1999) et une forte hydrophobicité (Guo et al., 2013). Les faibles résistivité et hydrophobicité des électrodes en graphite semblent permettre une meilleure colonisation par les bactéries électroactives. Des densités de courant maximales de  $2,4 \text{ A/m}^2$  sont obtenues dans les eaux usées domestiques avec une anode microbienne en graphite (Roubaud et al., 2019).

Ces valeurs restant relativement faibles, une des voies d'amélioration des anodes microbiennes passe par les traitements de surface. Dans le cas d'une anode microbienne en graphite par exemple, des traitements chimiques ou électrochimiques peuvent permettre un transfert d'électron plus efficace. Les traitements chimiques consistent en des bains d'acides nitrique et sulfurique (B. Li et al., 2014). Un traitement électrochimique basé sur des cycles comprenant 2 minutes de polarisation à  $+1,5 \text{ V}$  vs SCE suivis de voltammétries cycliques entre  $-1,0$  et  $+1,0 \text{ V}$  vs ECS a conduit à une augmentation significative des densités de courant (Cercado-Quezada et al., 2011). Des anodes microbiennes en graphite formées dans des eaux usées domestiques ont produit des densités de courant de  $2,1 \text{ A/m}^2$  avec ce traitement chimique,  $2,8 \text{ A/m}^2$  avec ce traitement électrochimique et  $2,1 \text{ A/m}^2$  en couplant les deux (Roubaud et al., 2021), alors que la densité de courant n'est que de  $1,8 \text{ A/m}^2$  sans aucun traitement.

#### 4.1.3 Populations microbiennes anodiques

Comme nous l'avons vu dans la partie 2.2 de ce chapitre, les bactéries anodiques doivent être exoélectrogènes, c'est-à-dire assurer un transfert d'électrons extracellulaire vers l'anode. Ces bactéries sont ubiquitaires et très variées (Logan et al., 2019). Certaines, telles que *Geobacter sulfurreducens* ou *Shewanella oneidensis* sont maintenant considérées comme des modèles (Santoro et al., 2017a) mais d'autres genres tels que *Pseudomonas* et *Citrobacter* sont aussi des sources de bactéries électroactives.

Dans le cas du traitement des eaux usées domestiques, les systèmes sont souvent inoculés avec des boues activées, des biofilms multi-espèces provenant d'une PCM

précédente ou encore avec les eaux usées seules, qui servent alors à la fois de substrat et d'inoculum (He et al., 2017). Les populations initiales sont très variées, comme cela a été commenté dans la partie 1.3 de ce chapitre. Une sélection se fait en fonction des conditions expérimentales et de l'électroactivité de chaque espèce.

Les analyses des anodes formées dans des eaux usées domestiques ont montré deux types de populations. Dans certains cas, la population est dominée par un nombre très limité de bactéries, notamment par la famille des *Geobacteraceae* à laquelle appartient le genre *Geobacter* (Blanchet et al., 2015; Bond et al., 2002; Roubaud et al., 2019). Dans d'autres cas, les populations sont diverses mais appartiennent malgré tout à un nombre limité de genres bactériens. Ainsi, l'étude de communautés microbiennes de 6 anodes alimentées avec des eaux usées et provenant de 4 laboratoires chinois différents ont montré une population centrale constituée de six genres : *Azospira*, *Azospirillum*, *Acinetobacter*, *Bacteroides*, *Geobacter*, *Pseudomonas*, et *Rhodopseudomonas* (Xiao et al., 2015).

## 4.2 Cathodes microbiennes de réduction de l'oxygène

### 4.2.1 Présentation

La réduction de l'oxygène est l'étape limitante des PCM car il n'existe pas de catalyseur métallique ou organique efficace aux valeurs de pH proches de la neutralité qui sont nécessaires pour le bon fonctionnement des anodes microbiennes (Oliot et al., 2016). Même le platine perd la majorité de ses propriétés catalytiques aux pH proches de 7. Des cathodes microbiennes ont été proposées dans l'espoir de pallier ce problème (Erable et al., 2012; Rusli et al., 2018). Leurs avantages sont un faible coût, la capacité de fonctionner aux valeurs de pH neutres et une grande durabilité. Il même été envisagé d'exploiter ces cathodes en valorisant le peroxyde d'hydrogène qu'elles peuvent produire en réduisant l'oxygène (Ma et al., 2018; Milner and Yu, 2018).

Au-delà de la réduction de l'oxygène, les cathodes microbiennes peuvent également réduire des nitrates, des sulfates ou des phosphates (Palanisamy et al., 2019). Elles peuvent aussi produire des molécules d'intérêts tel que l'hydrogène dans les cellules d'électrolyse microbienne (Kadier et al., 2016) ou divers autres composés en réduisant le dioxyde de carbone dans les cellules d'électrosynthèse microbienne (Jiang and Jianxiong Zeng, 2018; Karthikeyan et al., 2019; Rabaey and Rozendal, 2010). Nous ne décrivons ici que les cathodes microbiennes de réduction de l'oxygène, car ce type de catalyse est susceptible d'intervenir dans la partie cathodique des biotubas.

#### 4.2.2 Performances des cathodes microbiennes de réduction de l'oxygène

Les mécanismes de catalyse mis en œuvre par les cathodes microbiennes sont moins bien connus que ceux des anodes microbiennes. Il peut s'agir de transfert d'électrons extracellulaires, comme pour les anodes, ou non. L'article de revue bibliographique de Erable et al. dénombre 7 mécanismes possibles (Erable et al., 2012) : la catalyse directe par des enzymes extracellulaires (Scotto et al., 1985), ou des porphyrines et des composés organométalliques piégés dans le biofilm (Iken et al., 2008), la catalyse indirecte utilisant le peroxyde d'hydrogène produit par les bactéries comme médiateur (Chandrasekaran et al., 1993) ou encore la catalyse indirecte utilisant le manganèse ou des oxydes de fer (Olesen et al., 2000). D'autres mécanismes sont liés à la modification des propriétés catalytiques des oxydes de fer dans les biofilms marins (Poleunis et al., 2002), à l'acidification des biofilms (Little et al., 1991) ou à l'influence de la lumière (Bardal et al., 1993).

Les principaux matériaux utilisés pour la réalisation de cathodes microbiennes sont l'acier inoxydable ou les matériaux carbonés, déjà décrits ci-dessus, tels que les feutres ou les brosses en graphite (Rusli et al., 2018). Comme pour les anodes microbiennes, les matériaux carbonés sont privilégiés car ils possèdent une surface et une porosité importante. Les densités de courant obtenues sont généralement situées dans la gamme 300 - 600 mA/m<sup>2</sup>, quel que soit le système, par exemple avec des cathodes en acier inoxydable inoculées avec de l'eau de mer (Bergel et al., 2005), avec des cathodes en graphite inoculées avec des échantillons de sol (Zhang et al., 2011) ou encore des cathodes en feutre de carbone (Rabaey et al., 2008) ou en granules de graphites inoculées avec des sédiments de rivière (A. Wang et al., 2012). Pour ce qui concerne le traitement des eaux usées, des cathodes en carbone ou constituées d'une brosse en graphite et inoculées avec des boues activées ont permis d'obtenir des densités de courants de 159 et 325 mA/m<sup>2</sup>, respectivement (Aldrovandi et al., 2009; You et al., 2009).

Le Tableau 1.5 présente des études récentes dédiées aux cathodes microbiennes de réduction de l'oxygène. Sans prétendre à l'exhaustivité, il montre la diversité des inocula utilisés avec des sources aussi variées que des boues activées (Milner et al., 2016; Xia et al., 2012), du compost (Desmond-Le Quéméner et al., 2016; Rimboud et al., 2017, 2016), des cultures pures (Debuy et al., 2015) ou des effluents de précédents systèmes électro-microbiens (Milner et al., 2016). La plupart des cathodes sont constituées de matériaux carbonés sous forme de feutre (Milner et al., 2016), papier (Cristiani et al., 2013) ou tissu (Cristiani et al., 2013; Desmond-Le Quéméner et al., 2016; Rimboud et al., 2017, 2016). A partir de 2010, toutes les études atteignent des courants supérieurs à la centaine de mA/m<sup>2</sup>,

mais seules deux atteignent des courants de l'ordre de l'A/m<sup>2</sup> (Cristiani et al., 2013; Milner et al., 2016).

Pour la première étude (Cristiani et al., 2013), l'objectif était de former simultanément une cathode microbienne et une anode microbienne dans une PCM alimentée par des eaux usées supplémentées avec de l'acétate (0,03 M). La cathode microbienne (5 cm<sup>2</sup>) est constituée de tissu ou papier de carbone recouvert d'une couche microporeuse et de platine. L'anode microbienne est constituée de tissu de carbone non modifié. Les densités de courant obtenues varient entre 1000 et 5000 mA/m<sup>2</sup> pour des potentiels variant entre 50 et 200 mV vs ESH. Les meilleures performances sont obtenues en présence à la fois d'un biofilm anodique et cathodique. Cependant une augmentation du pH a limité les performances de la PCM.

Dans la seconde étude (Milner et al., 2016), c'est un montage à trois électrodes qui est utilisé avec un milieu synthétique. La cathode microbienne (12,2 cm<sup>2</sup>) est en feutre de carbone et l'anode est une grille de platine. Lorsque la cathode microbienne est inoculée avec des effluents d'une cathode microbienne précédente, la densité de courant est maximale et atteint une valeur de 2120 ±640 mA/m<sup>2</sup> au potentiel imposé de -100 mV vs Ag/AgCl. Le biofilm cathodique est dominé par des bactéries encore non décrites de la classe des *Gammaproteobacteria*, qui sont supposées être responsables de la catalyse.

La plupart des études reportées dans le Tableau 1.5 utilisent des milieux synthétiques. Quelques-unes mettent en œuvre des milieux réels tels que l'eau de mer (Bergel et al., 2005; Debuy et al., 2015) ou le lixiviat de terreau (Desmond-Le Quéméner et al., 2016; Rimboud et al., 2016, 2017).

Un article de revue récent consacré aux cathodes microbiennes formées dans les eaux usées (Rusli et al., 2018) a montré que la grande majorité des cathodes développées dans ce milieu ne portent pas sur la réduction de l'oxygène mais plutôt sur la réduction des sulfates dans des eaux usées acides (Blázquez et al., 2016; Teng et al., 2016), des nitrates dans des eaux usées industrielles (cokerie) (Tang et al., 2017).

Tableau 1.5 : Performances de cathodes microbiennes de réduction de l'oxygène.

Objectif	Réacteur	Anode	Cathode	Milieu et Inoculum	J (mA/m <sup>2</sup> )	E (mV vs Ref)	Référence
Effet du potentiel	Montage à 3 électrodes	Tige en graphite et feutre de carbone	Tige en graphite et papier de carbone 100 cm <sup>2</sup>	Milieu synthétique + boues anaérobies + consortium issu de cathode microbienne	232	200 mV vs ECS	(Xia et al., 2012)
					353	60 mV vs ECS	
					339	-100 mV vs ECS	
Cathode microbienne et anode microbienne simultanées	PCM	Tissu de carbone	Tissu ou papier de carbone + couche microporeuse + platine 5 cm <sup>2</sup>	Eaux usées + acétate (0,03M)	1000-5000	50–200 mV vs ESH	(Cristiani et al., 2013)
Inoculation avec des cultures pures	Montage à 3 électrodes	Grille de platine 23,5cm <sup>2</sup>	Acier inoxydable 10 cm <sup>2</sup>	Eau de mer synthétique + <i>Pseudoalteromonas sp.</i> , <i>Marinobacter sp.</i> , <i>Roseobacter sp.</i> , <i>Bacillus sp.</i> + glucose (1g/L)	40	-300 mV vs ECS	(Debuy et al., 2015)
					800	-600 mV vs ECS	
Impact du potentiel sur les populations microbiennes	Montage à 3 électrodes	Grille de platine 10 cm <sup>2</sup>	Tissu de carbone 2cm <sup>2</sup>	Lixiviat de terreau + compost	220	-400 mV vs ECS	(Desmond-Le Quémener et al., 2016)
					400	+100 mV vs ECS	
Mécanismes de transferts d'électrons	Montage à 3 électrodes	Grille de platine 10 cm <sup>2</sup>	Tissu de carbone 6 cm <sup>2</sup>	Lixiviat de terreau + compost	310 ±20	-200 mV vs ECS	(Rimboud et al., 2016)
Cathode microbienne avec une forte activité catalytique	Montage à 3 électrodes	Grille de platine 35 cm <sup>2</sup>	Feutre de carbone 12,2 cm <sup>2</sup>	Milieu synthétique + boues activées	2120 ±640	-100 mV vs Ag/AgCl	(Milner et al., 2016)
				Milieu synthétique + effluent d'une cathode microbienne précédente	2080 ±420	-100 mV vs Ag/AgCl	
					1300 ±660	+200 mV vs Ag/AgCl	
Différentes méthodes de formation	Montage à 3 électrodes	Grille de platine 10 cm <sup>2</sup>	Tissu de carbone 6 cm <sup>2</sup>	Lixiviat de terreau + compost + acétate 20 mM	170 ±20	-200 mV vs ECS	(Rimboud et al., 2017)
				Lixiviat de terreau + compost	390		
Traitement d'eaux usées pétrolières	Montage à 3 électrodes	Cylindre en graphite	Cylindre en graphite	Milieu synthétique + eaux usées pétrolières + acétate	511	1000 mV <sup>1</sup>	(Mohanakrishna et al., 2018)

<sup>1</sup> Pour ces deux études le potentiel n'est pas connu, c'est la tension entre les électrodes qui est indiquée.

Deux études décrivent toutefois des cathodes microbiennes de réduction de l'oxygène dans les eaux usées (Liu et al., 2009; Zuo et al., 2018). La première permet d'atteindre une densité de courant de 1,1 A/m<sup>2</sup> avec une cathode en graphite flottante, c'est-à-dire placée à l'interface air-solution (Liu et al., 2009). Pour la seconde, l'anode et la cathode sont constituées de granules de charbon actif à la surface desquels il y avait déjà un biofilm électroactif formé dans une PCM précédente (Zuo et al., 2018). Le système alimenté avec des eaux usées domestiques a été maintenu pendant 105 jours. Le compartiment cathodique, séparé du compartiment anodique par une membrane, est constitué de 3 zones, deux lits fixes de granules contenus dans une grille en titane, séparés par une zone d'aération et de filtration. La densité de courant maximale était dans ce cas de 1,2 A/m<sup>2</sup>.

### 4.2.3 Populations microbiennes cathodiques

Les bactéries présentes à la cathode sont des bactéries dites électrotrophes, c'est-à-dire capables d'utiliser les électrons issus de la cathode. D'après Logan et al., les phyla les plus courants sont les *Proteobacteria* et les *Firmicutes* (Logan et al., 2019). Le phylum des *Bacteroidetes* est cependant aussi identifié dans plusieurs études, en plus des deux précédents (Erable et al., 2012; Li et al., 2017; Wang et al., 2013).

Dans les eaux usées inoculées avec des boues activées, il semble que la classe des *Gammaproteobacteria* soit la plus abondante et soit associée à la réduction de l'oxygène ou des nitrates (Chen et al., 2010). Cette classe a notamment été identifiée comme majoritaire et potentiellement responsable de la catalyse de la réduction de l'oxygène dans des cathodes microbiennes formées dans un milieu synthétique inoculé avec des boues activées (Milner et al., 2016).

Parmi les genres les plus couramment retrouvés dans les populations cathodiques, certains tels que *Comamonas*, *Acidovorax*, *Desulfuromonas*, *Desulfovibrio*, *Clostridium*, *Geobacter*, permettent la réduction des nitrates, des sulfates ou encore des métaux. Ces genres ont été identifiés dans des eaux usées inoculées avec des boues mais ces études se déroulaient en conditions anaérobies et ne concernaient pas la réduction de l'oxygène (Croese et al., 2011; Leininger et al., 2021; Rago et al., 2018, 2017; Sun et al., 2012).

Peu de genres sont associés aux cathodes microbiennes de réduction de l'oxygène. Les genres majoritaires sont *Acinetobacter* et *Pseudomonas*. Le genre *Acinetobacter* a été identifié à la fois dans des bassins de traitement aérobie des eaux usées (Shaohua Chen et al., 2019; Liu et al., 2017), dans des systèmes électro-microbiens (Sathishkumar et al., 2019) mais aussi, plus particulièrement, dans des populations microbiennes d'électrodes

bidirectionnelles de réduction de l'oxygène (Blanchet et al., 2014; Yun et al., 2018). Le genre *Pseudomonas* est, lui, connu tout d'abord pour sa capacité à favoriser la nitrification et dénitrification (Shaohua Chen et al., 2019) mais est aussi suspecté d'avoir la capacité de catalyser la réduction de l'oxygène (Blanchet et al., 2014).

### 4.3 Cathodes capillaires

Dans le cours de ce travail de thèse, des cathodes capillaires tridimensionnelles (3D) ont été développées pour la réduction de l'oxygène. Un état de l'art rapide a été réalisé pour évaluer l'inventivité de cette technologie. Deux types de cathodes utilisent la capillarité, certaines cathodes intégrées dans des microsystemes et les cathodes à air. Les paragraphes suivants ont pour but d'évaluer si ces cathodes peuvent être assimilées aux cathodes capillaires 3D développées dans le cadre de cette thèse.

La capillarité des électrodes est souvent exploitée dans les microsystemes électrochimiques qui sont généralement utilisés comme outils analytiques pour le dosage de différents composés tels que le glucose (Wang, 2005) ou les acides gras (Amorim et al., 2021). Ces systemes ont aussi été utilisés dans le cadre de procédés de désalinisation (Knust et al., 2013) ou d'électrodéposition pour la formation d'objets dissymétriques, afin par exemple d'augmenter leur contraste au microscope (Bouffier et al., 2017; Warakulwit et al., 2008). Cependant, la capillarité ne sert ici qu'à acheminer le substrat jusqu'à la cathode. Il ne s'agit donc pas réellement de cathode capillaire 3D de réduction de l'oxygène.

Dans le cas des cathodes à air, l'électrode, constituée d'une superposition de couches, voit une de ses faces exposées à l'électrolyte et l'autre à l'air. Cette superposition de couches comprend un catalyseur, généralement du platine, une membrane (Nafion, PTFE, PDMS) et une couche dite de diffusion, le plus souvent en PTFE (Wang et al., 2017). La couche contenant le catalyseur est généralement au contact de l'électrolyte alors que la couche de diffusion est exposée à l'air et destinée à faciliter l'accès de l'oxygène vers le catalyseur. Les deux couches sont séparées par une membrane qui évite le transport de l'eau vers l'extérieur. Dans certaines de ces cathodes le PDMS joue à la fois le rôle de membrane et de couche de diffusion. Souvent une grille en acier inoxydable ou en cuivre est plaquée contre la cathode pour collecter le courant. Des densités de courant élevées, de l'ordre de  $-14 \text{ A/m}^2$  à un potentiel de  $-0,05 \text{ V vs ESH}$  ont été obtenues (F. Zhang et al., 2012).

La capillarité est nécessaire dans ce cas pour transporter l'oxygène et l'eau vers le catalyseur d'une part et évacuer les ions hydroxydes formés d'autre part. Toutefois la capillarité n'est exploitée ici qu'au-travers de couches dont l'ensemble ne constitue qu'une

électrode bidimensionnelle (2D). En outre, l'objectif est ici d'avoir des électrodes les plus fines possibles afin de ne pas limiter la vitesse des transports de masse. Le principe de ces électrodes est donc bien différent de celui de nos cathodes capillaires 3D qui tirent parti d'exposer à l'air la plus grande hauteur possible de structure capillaire.

Certaines cathodes à air sont mises en œuvre en les plaçant à la surface libre de la solution. Elles sont appelées cathodes flottantes. Ces électrodes peuvent avoir des structures très diverses : du graphite (Liu et al., 2009), du feutre de carbone (Zhou et al., 2018), du tissu de carbone recouvert de platine (Song et al., 2010), des granules de graphite (A. Wang et al., 2012), une superposition de couches identiques aux cathodes à air décrites ci-dessus (Tatinclaux et al., 2018) ou même une éponge recouverte de PTFE et de noir de carbone (Zhang et al., 2019).

Certaines de ces cathodes flottantes sont des cathodes microbiennes de réduction de l'oxygène. Elles ont déjà été décrites plus en détail dans la partie 4.2.2 de ce chapitre (Liu et al., 2009; A. Wang et al., 2012) et permettent d'atteindre des densités de courant maximales de  $1,1 \text{ A/m}^2$ . Les autres cathodes flottantes sont abiotiques. Certaines sont mises en place dans des milieux abiotiques dans le but de produire du peroxyde d'hydrogène (Zhang et al., 2019; Zhou et al., 2018). D'autres cathodes à air flottantes abiotiques ont été mises en œuvre dans les eaux usées réelles (Tatinclaux et al., 2018) ou synthétiques (Song et al., 2010). L'objectif est alors de diminuer au maximum le contact entre le milieu et la cathode pour éviter le développement du biofilm et la perte des propriétés catalytiques de l'électrode, tout en maximisant l'accès à l'oxygène. Elles permettent d'atteindre dans les eaux usées réelles des densités de courant de l'ordre de 250 à  $500 \text{ mA/m}^2$  à un potentiel de  $-0,2 \text{ V vs Ag/AgCl}$ . Cependant, tout comme les cathodes à air classique, il s'agit ici d'électrodes 2D, qui ne sont pas assimilables à une cathode capillaire 3D.

#### 4.4 Electrodes bidirectionnelles (Article 1)

Comme évoqué dans les parties précédentes, la présence d'oxygène peut être défavorable, voire rédhibitoire, au développement d'une anode microbienne (Oliot et al., 2016). C'est ce que pensaient la plupart des auteurs, jusqu'à la découverte des électrodes microbiennes dites bidirectionnelles. Ces électrodes permettent à la fois l'oxydation de la matière organique lorsqu'elles sont en conditions anodiques (apport de substrat, pas d'oxygène) et la réduction de l'oxygène, ou d'autres molécules tels que les sulfates ou les

nitrate, en conditions cathodiques (apport de l'accepteur d'électrons, pas de substrat) (Jiang and Zeng, 2019).

L'objectif de la thèse portant sur le traitement des eaux usées couplée à la réduction de l'oxygène, l'analyse bibliographique des électrodes bidirectionnelles s'est limitée aux électrodes réduisant l'oxygène dans leur mode cathodique. Cette analyse a donné lieu à un article publié dans le journal *Electrochemistry Communications* et intitulé « *Oxygen-reducing bidirectional microbial electrodes: A mini-review* ».

Cette étude bibliographique présente une synthèse des conditions expérimentales utilisées pour la formation de ces électrodes bidirectionnelles (réacteur, milieu, substrat, inoculum, polarisation), de leurs performances électrochimiques et des populations microbiennes associées. Les principales conclusions sont :

- Jusqu'à présent il y a peu d'exemples d'électrodes bidirectionnelles capables de réduire l'oxygène. Elles sont constituées de matériaux carbonés et ont été développées dans divers milieux : milieux synthétiques (Cheng et al., 2010; B. Li et al., 2014; Strik et al., 2010; Sun et al., 2015), eaux usées (Shuiliang Chen et al., 2019), lixiviat de terreau (Blanchet et al., 2014), toujours supplémentés avec du glucose (Chen et al., 2017; W. Li et al., 2014; Sun et al., 2015) ou de l'acétate (Blanchet et al., 2014; Shuiliang Chen et al., 2019; Cheng et al., 2010; Strik et al., 2010; Yu et al., 2015).
- Dans la majorité des cas, le système est démarré en phase anodique (anaérobiose, substrat) et l'électrode est ensuite basculée en cathode par la mise en place d'une aération lorsque le substrat est épuisé (Blanchet et al., 2014; Cheng et al., 2010). Dans le cas d'un biofilm bactéries-algues, l'alternance de phases peut être provoquée par l'absence de lumière, qui correspond à la phase anodique, et l'illumination qui induit la production d'oxygène par les algues et donc la phase cathodique (Sun et al., 2015).
- Ces électrodes ont été développées majoritairement dans l'objectif de stabiliser le pH dans les PCM (Cheng et al., 2010; Freguia et al., 2008; W. Li et al., 2014; Sun et al., 2015). L'acidification de l'anode et l'alcalinisation de la cathode sont des limites sévères au fonctionnement des PCM sur de longues périodes (Oliot et al., 2016). L'alternance de phases anodiques et cathodiques que permettent les électrodes bidirectionnelles assure un pH constamment proche de la neutralité et maintient les performances de la PCM sur le long terme, jusqu'à plusieurs mois (W. Li et al., 2014; Strik et al., 2010; Sun et al., 2015).

- La plus haute densité de courant anodique est de 16 A/m<sup>2</sup> obtenue avec un système à trois électrodes et une polarisation à -0,2 V vs ECS (Blanchet et al., 2014). Dans les PCM, le courant est limité par la cinétique cathodique.
- L'électrode la plus performante pour la réduction de l'oxygène, avec un courant cathodique de 2 A/m<sup>2</sup> au potentiel de -0,2 V vs Ag/AgCl, est un système particulier mis en place dans les eaux usées domestiques supplémentés avec de l'acétate (Shuiliang Chen et al., 2019). L'électrode est une brosse en graphite rotative placée à l'interface milieu-air. Ce dispositif assure une aération continue de l'électrode en la faisant tourner avec une moitié exposée à l'air.
- Les populations microbiennes présentent une majorité de genres des phyla *Proteobacteria* et *Firmicutes* (Chen et al., 2017; Yun et al., 2018). Certaines populations sont dominées par un genre spécifique tel que *Chloroflexi* dans un milieu inoculé avec du compost (Blanchet et al., 2014) ou *Ignavibacterium* dans le cas du biofilm algues-bactéries (Sun et al., 2015).
- Pour l'électrode rotative, un modèle a été proposé selon lequel le biofilm aérobic, dominé par *Neomegalonema* (40% ±5%), croit en premier. Lorsqu'il est assez épais pour bloquer la diffusion de l'oxygène, le biofilm exoélectrogène, dominé par *Arcobacter* (15% ±4%), se développe, formant ainsi un biofilm avec deux couches fonctionnelles (Shuiliang Chen et al., 2019).
- Très peu d'études se sont intéressées aux mécanismes de transfert d'électrons dans le cas des électrodes bidirectionnelles de réduction de l'oxygène, mais deux études ont utilisé *Shewanella oneidensis* (Rowe et al., 2018) et *Comamonas testoteroni* (Yu et al., 2015) comme microorganismes modèles dans cet objectif. Pour le premier, le flux d'électrons bidirectionnel résulte de l'inversion des voies de transport extracellulaire, alors que pour le second les flux empruntent des chemins différents en modes anodique et cathodique.

# Oxygen-reducing bidirectional microbial electrodes: A mini-review

Morgane Hoareau, Benjamin Erable, Alain Bergel

Laboratoire de Génie Chimique, Université de Toulouse, CNRS, INP, UPS, Toulouse, France

Corresponding author: [alain.bergel@toulouse-inp.fr](mailto:alain.bergel@toulouse-inp.fr) (A. Bergel)

## Highlights

- Aerobic bidirectional electrodes (ABME) oxidize organic matter and reduce oxygen.
- ABMEs ensure pH control and long-term stability of MFCs.
- Current densities of O<sub>2</sub> reduction are at the level of the best microbial cathodes.
- Dominance of various phyla: *Proteobacteria* and also *Chlorobi* and *Chloroflexi*.
- Aerobic rotating electrode is a promising ABME set-up for wastewater treatment.

## Abstract

Aerobic bidirectional microbial electrodes (ABME) oxidize matter in anodic conditions (substrate supply, no oxygen) and reduce oxygen in cathodic conditions (oxygen supply, no substrate). The different experimental protocols used to design them, their electrochemical performance and the microbial populations involved are reviewed here. In spite of a limited number of studies, ABMEs have already shown promising capabilities to solve the issues of oxygen crossover and pH control in microbial fuel cells. They may also broaden the field of efficient electroactive bacteria to phyla other than *Proteobacteria*.

## Keywords

Microbial fuel cell; microbial electrochemical snorkel; bioelectrochemical system; microbial electrochemical technology; microbial population; wastewater treatment.

## 1. Introduction

At the beginning of the microbial fuel cell (MFC) story, things seemed clear: the microbial anode had to be anaerobic. The truth of this statement has become less obvious with the demonstration that some microbial anodes can tolerate oxic environments [1] and can even benefit from micro-aeration [2,3]. The initial rule has also been challenged by a recent study reporting an MFC that produces higher power density ( $6.4 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$ ) than ever reported before, with an air-cathode only a few millimetres from the microbial anode and without any separator between them [4].

Finally, microbial anodes have been fully reconciled with oxygen by the advent of aerobic bidirectional microbial electrodes (ABME). ABMEs are able to oxidize organic matter when implemented in anodic conditions (supply of electron donor(s), no oxygen) and to reduce oxygen in cathodic conditions (oxygen supply, no electron donor). Actually, the principle of bidirectional microbial electrodes has been known for a long time but it has generally been developed in fully anaerobic conditions, i.e. by using electron acceptors other than oxygen, such as nitrate, sulfate, fumarate or carbon dioxide [5–7].

Aerobic bidirectional microbial electrodes may offer elegant alternatives to improve MFC performance. They should also be at the core of microbial electrochemical snorkels, which are to be implemented in the fuzzy oxic/anoxic zone of wastewater treatment tanks [8]. Here, the state of the art of ABMEs is reviewed in order to reveal their specific advantages and to point out the directions in which there is an urgent need for research development.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Material, medium, inoculum and reactors

All the ABME reported so far have been designed on carbon-based electrode materials (Table 1). Most studies have used synthetic media [9–12], only two have used natural media: compost leachate [13] or wastewater [14]. All the media, synthetic or natural, were supplemented with acetate (in the range of 1 to 20 mM) [11–15] or glucose (around 0.5 g/L) [9,10,16] as the carbon source.

**Table 1: Characteristics and electrochemical performance of ABMEs reported in the literature; EAB: electroactive biofilm from previous MFC; SM: synthetic medium; WW wastewater**

Purpose	Reactor	Electrode	Medium & inoculum	Polarity reversal	$J_{\text{anode}}$ (mA.m <sup>-2</sup> )	$J_{\text{cathode}}$ (mA.m <sup>-2</sup> )	$E_{\text{anode}}$ (V/ref)	$E_{\text{cathode}}$ (V/ref)	Ref
Design O <sub>2</sub> -reducing biocathode	3- electrode	Carbon cloth 8 cm <sup>2</sup>	Compost leachate, acetate	Alternating supply of acetate and oxygen	16 000	-400	-0.2 V/ECS (imposed)		(Blanchet et al., 2014)
		Granular graphite 156 cm <sup>3</sup>	SM, acetate EAB		1 231	-513	-0.3 V vs Ag/AgCl (imposed)		(Cheng et al., 2010)
Design O <sub>2</sub> -reducing biocathode & pH control			SM, glucose EAB, sludge	Anode chamber becomes cathode one and vice versa	No significant current		+0.2 V vs Ag/AgCl (imposed)		
					150	-150	-0.35 V/SCE	-0.15 V/ECS	(W. Li et al., 2014)
Azo dye treatment & pH control	Reversible MFC	Carbon felt 30 cm <sup>2</sup>	SM, Congo red, glucose Pre- acclimated algal- bacterial biofilm with <i>Chlorella vulgaris</i> and sludge	Dark anode chamber becomes cathode under illumination and vice versa	200	-200	-0.45 V/SCE	-0.2 V/ECS	(Sun et al., 2015)
			SM, glucose and graphene oxide Activated sludge	Anode becomes the cathode and vice versa	230 vs 200 (w/o graphene)	-230 vs -200 (w/o graphene)	-0.4 V/SCE	+0.1 V/ECS	(Chen et al., 2017)

Purpose	Reactor	Electrode	Medium & inoculum	Polarity reversal	$J_{\text{anode}}$ (mA.m <sup>-2</sup> )	$J_{\text{cathode}}$ (mA.m <sup>-2</sup> )	$E_{\text{anode}}$ (V /ref)	$E_{\text{cathode}}$ (V /ref)	Ref
pH control	MFC with one abiotic chamber	Graphite felt 290 cm <sup>2</sup>	SM, acetate Effluent from previous MFC (anode) and WW sludge (cathode)	Aerobic biocathode becomes the ABME with an abiotic anode	10	-3.3	-0.45 V vs Ag/AgCl	+0.12 V vs Ag/AgCl	(Strik et al., 2010)
Mechanisms of <i>C. testosteroni</i>	MFC & 3-electrode	Carbon cloth 12 cm <sup>2</sup>	SM, acetate <i>Comamonas testosteroni</i>	Anaerobic conditions, 10 min aeration at the end only	-	-41.6	-	-0.7 V/SCE (voltammetry)	(Yu et al., 2015)
Aerobic rotating electrode for WW treatment	Single rotating electrode & 3-electrode	Graphite fibre brushes 10.9 cm <sup>2</sup>	Real WW, acetate	Anode and cathode reactions on the same rotating electrode	1 600 vs 400 (w/o modification) 6 500	-2 000 vs -500 (w/o modification) -	-0.2 V vs Ag/AgCl (imposed) -0.55 V vs Ag/AgCl (OCP)	-	(Shuiliang Chen et al., 2019)

## 1.1. Fundamental studies

Two types of inoculum were used: raw ones – compost [13] or wastewater [14] – and mature ones, such as electroactive biofilms coming from a previous MFC [9,11,12], or a pre-acclimated algal-bacterial biofilm with *Chlorella vulgaris* mixed with sludge [10]. Only one study implemented a pure culture (*Comamonas testosteroni*) [15].

Most studies used double-chamber MFCs [9,10,12,15,16]. One study also used a single-chamber MFC, for comparison [15]. A few studies implemented 3-electrode set-ups to control the potential applied to the electrode [11,13,14]. The values of the applied potential are grouped in a narrow range: -0.2 V/SCE [13], -0.3 V vs Ag/AgCl [11], -0.2 V vs Ag/AgCl [14]. An attempt to use +0.2 V vs Ag/AgCl [11] did not give any encouraging result. A specific system has recently been designed and consists of a circular rotating electrode with one half immersed in the solution and the other half exposed to air [14].

## 1.2. Biofilm growth protocols and polarity reversal

The design of ABMEs is generally articulated in two phases. The first phase is most often anodic with the objective of favouring the development of a robust electroactive biofilm. When the substrate (electron donor) is fully depleted, the bioanode is reversed to the cathodic condition by supplying oxygen. Anodic and cathodic phases can then be alternated: oxygen supply is stopped and substrate is added to launch the anode phase, while oxygen is supplied again to drive the cathode phase when the substrate is depleted.

Many variations of this core protocol are possible depending on the systems. For instance, when a potential is applied, depletion of the substrate can be easily detected by the current dropping to zero [11,13]. The duration of the alternate anode–cathode periods can be a few hours to several days. In the study that implemented *C. testosteroni* as a pure culture, aeration was only performed for 10 min at the end of the experiment [15]. In solar powered MFCs, which implement algae, the cathode phase is driven by illumination of the algae, which produce oxygen.

In one case, the ABME was designed by starting in cathodic conditions [12]. The ABME was formed as the biocathode of an MFC that contained algae, firstly with oxygen supply and then under periodic illumination. The rotating electrode bioreactor is a recent, original set-up that runs simultaneously in both anodic and cathodic conditions (Fig. 1). There is no polarity

reversal and the ABME is continuously polarized at -0.2 V vs Ag/AgCl [14]. The biofilm is organized in two layers, catalysing the anodic and cathodic reactions simultaneously: the internal exoelectrogen layer, in contact with the electrode surface, and the external aerobic layer.

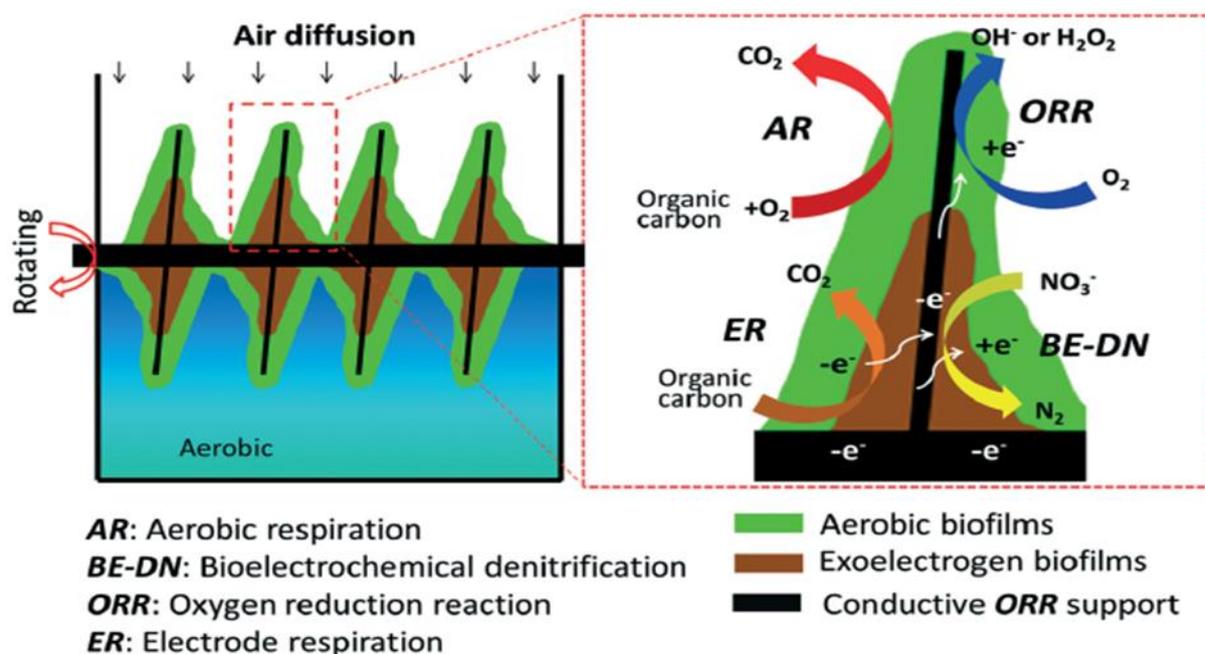
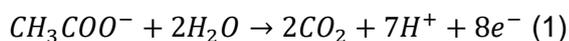


Fig. 1. Schemes of the aerobic rotating electrode and the possible biological and bioelectrochemical biofilm-catalysed reactions; from [14].

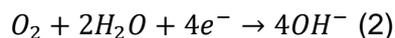
## 2. Applications

### 2.1. pH management in MFC

In an MFC, protons are produced at the anode by oxidation of the organic matter (e.g. acetate):



and hydroxide anions are produced at the cathode by the reduction of oxygen:



These reactions result in anode acidification and cathode alkalization, which are both strongly detrimental to MFC performance [17].

Prior to the development of real bidirectional electrodes, in 2008, the team of S. Freguia proposed a precursor system, where the anolyte outlet was used to feed the cathode

compartment. The protons produced at the anode were thus removed from the anode compartment and used to mitigate cathode alkalization [18]. After this seminal study, other teams tackled the pH control issue in microbial electrochemical systems by designing ABME.

The first MFC using ABME in sequential anode–cathode configuration, reported in 2010, succeeded in stabilizing the pH at 7 without addition of buffer, by using aeration periods of 30 min every 2.5 h [11]. Other studies clearly confirmed the beneficial action against pH drift. In a double-chamber MFC, the pH of the anode compartment decreased from 7 to 5 and was corrected back to 7.0–7.5 by 10 days of cathodic phase. Conversely, the pH of the cathode, which rose to 7.6–7.7, was decreased to 5.2–5.4 by polarity reversal [9]. Similar success was confirmed later [10]. This pH self-neutralization promoted long-term stability. Up to 125 days of operation was ensured with a polarity reversal every 10 days [9,10]. In the same way, an MFC using algae to produce oxygen showed a pH varying from 6.2 at the end of the anode phase to 7.2 at the end of cathode phase, which lasted 14 h per day. The pH was kept between these two values for 141 days [12].

## 2.2. Effluent treatment

The use of ABMEs has been contemplated for anaerobic–aerobic azo dye treatment, based on dark/light reactions alternating in a solar MFC equipped with an algal-bacterial biofilm. In the dark, anodic phases, respiration of the algae maintained the anaerobiosis and improved the treatment of Congo Red. Conversely, during the cathode phases under illumination, the oxygen produced by the algae was used by the bacteria to aerobically degrade the by-products resulting from the Congo Red degradation. This sequential decolourization process with the alga *Chlorella vulgaris* resulted in a 93% increase in decolourization rate and an 8% increase in mineralization [10], compared to the same system without algae.

The recent concept of an aerobic rotating electrode (Fig. 1) has shown promising capability for the treatment of domestic wastewater [14]. It ensured a COD removal rate of  $103.6 \pm 11.9 \text{ g O}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$ , in contrast with the  $11\text{--}47 \text{ g O}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$  obtained with traditional non-conductive rotating contactor. This comparison shows how the electrical conductivity of the support is essential to enhance the performance of the treatment. When the potential of  $-0.2 \text{ V vs Ag/AgCl}$  was applied to the rotating electrode, removal of  $1400 \pm 124 \text{ mg O}_2 \cdot \text{L}^{-1} \text{ COD}$  took less than 0.7 days (i.e. removal rate was around  $1300 \text{ g O}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$ ).

### 2.3. Fundamental studies

Several studies devoted to ABME have had the specific objective of designing oxygen-reducing biocathodes and increasing the current they produce [11,13]. In this context, one original approach consisted of using the bidirectional capacity to integrate graphene into the biofilm during its formation [16]. Basic investigation of the bidirectional electron transfer mechanisms has also been carried out with a pure culture of *Comamonas testosteroni* [15]. Actually, in this case the aerobic conditions were approached only in the last part of the study, by 10 min of aeration.

## 3. Electrochemical performance

The values of the maximum current density reached by ABMEs and the related potentials, in anode and cathode conditions, are reported in Table 1. These values were extracted from studies performed in 3-electrode cells or in MFCs. The 3-electrode cells allow the anode and cathode performance to be compared at the same value of applied potential. In contrast, in an MFC, the current is the same for the anode and the cathode but the potential of the anode is lower than that of the cathode. The performance of the anode is thus reported at a lower potential than that of the cathode. This situation is detrimental to both electrodes in comparison to characterization performed at the same potential by using 3-electrode cells. Consequently, the values extracted from MFC studies underestimate the capabilities of ABMEs, as can be observed in Table 1.

Logically, the highest values of current density were obtained in 3-cell set-ups for both anode and cathode conditions. The highest current density reported in anode operation was  $16 \pm 1.7 \text{ A/m}^2$  [13]. Table 1 shows that, in MFCs, the current densities recorded for the bioanodes were clearly limited by the low current provided by the biocathodes. As discussed elsewhere [19], MFCs are not appropriate systems to characterize the intrinsic kinetics of an electrode.

In cathode operation, the highest current densities, of  $2 \text{ A/m}^2$  (Table 1), have been obtained by applying the potential of  $-0.2 \text{ V}$  vs Ag/AgCl at the rotating electrode [14]. This system had the great advantage of ensuring continuous aeration of the electrode by rotating it with one half exposed to air (Fig. 1). Actually, one major issue of oxygen reduction is the low solubility of oxygen in aqueous solution ( $0.28 \text{ mM}$  at  $20^\circ\text{C}$ ), which severely limits its mass transport to the biocathode. If the (modest) cost of the energy required to rotate the system is

considered acceptable, this issue can be alleviated by implementing a rotating electrode. It should be noted that the N, P co-doped coating of the graphite brush also had a great effect as, without this surface modification, the current was only  $0.5 \text{ A}\cdot\text{m}^{-2}$ .

When no potential was applied to the rotating electrode, and after adding 10 mM acetate, the potential dropped from 0 to  $-0.55 \text{ V}$  vs Ag/AgCl while the current increased in the anodic direction from 0 to  $6.5 \text{ A}\cdot\text{m}^{-2}$ . The ABME left at open circuit thus showed a globally anodic behaviour while the electrode was continuously exposed to air by the rotation. This means that this system was able to develop efficient exoelectrogen capabilities although continuously exposed to aerobic conditions.

With stationary electrodes, the highest current densities obtained for oxygen reduction were  $0.4$  [13] and  $0.513 \text{ A}/\text{m}^2$  [11]. Both studies explain that these high values were due to the accumulation of protons during the anode phase (Eq. 1), which promoted oxygen reduction when the electrode was turned to the cathode phase (Eq. 2).

Integrating graphene into the biofilm led to a small increase of the current density, from  $200 \text{ mA}/\text{m}^2$  without graphene to  $230 \text{ mA}/\text{m}^2$  with graphene, at potentials of  $+0.1 \text{ V}/\text{ECS}$  for the cathode and  $-0.4 \text{ V}/\text{ECS}$  for the anode [16]. Li et al., comparing a reversible MFC with a conventional one, noted a 36% increase of the power density due to the reversible operation [9]. The maximum power density was  $38 \text{ W}/\text{m}^2$  (current density of  $0.15 \text{ A}/\text{m}^2$ ) compared to  $28 \text{ W}/\text{m}^2$  for the conventional MFC.

The two solar powered ABMEs gave disparate results. In one case, current density remained very low. During the illumination phase the cathode produced  $-3.3 \text{ mA}/\text{m}^2$  at the potential of  $+0.12 \text{ V}$  vs Ag/AgCl. During the dark phase, the current was  $10 \text{ mA}/\text{m}^2$  with a potential of  $-0.45 \text{ V}$  vs Ag/AgCl [12]. This was the only case where the ABME was initially formed in cathodic conditions. It could be feared that forming an ABME from a biocathode may not be a great solution. Nevertheless, other studies will be necessary before drawing firm conclusions. The second study dealing with a solar powered ABME implemented a reversible MFC and commonly obtained values of current density up to  $200 \text{ mA}/\text{m}^2$ , for potential values of  $-0.45$  and  $-0.2 \text{ V}/\text{SCE}$  for the anode and the cathode, respectively [10].

## 4. Microbial population and mechanisms

### 4.1. Microbial populations

In the case of solar powered MFCs, different groups of microorganisms, such as unicellular green algae, cyanobacteria or protozoa, such as *Trinema enchelys*, have been identified, without it being possible to determine which contributed to the anodic or cathodic reactions [12].

Two ABMEs, which produced among the highest values of current intensity for oxygen reduction, showed the selection of a given dominant genus or phylum. The genus *Ignavibacterium* was dominant in the photo-ABME designed with *C. vulgaris* algae. This genus, from the *Chlorobi* phylum, is known to include electroactive bacteria. Similarly, the ABMEs formed from compost leachate were strongly dominated by the *Chloroflexi* phylum (49 ±1%), frequently found in bioelectrochemical systems. The species from this phylum can use a large number of electron acceptors and are aero-facultative bacteria.

The graphene-modified ABME showed a large abundance of *Proteobacteria*, the most usual phylum in electroactive biofilms [16]. The abundance of *Proteobacteria* was 24% before the polarity reversal and 63% after. In contrast, the abundance of *Firmicutes*, another phylum often enriched in electroactive biofilms [25], decreased from 49% to 15% after the polarity reversal. The presence of graphene in the ABME increased the abundance of anaerobic bacteria such as *Geobacter* (2% with graphene vs 0.04% without). It was speculated that some bacteria may have been coated by graphene, which protected them from oxygen.

A model of growth was proposed by Chen et al. to explain the selforganization of the ABME on the aerobic rotating electrode [14]. At the beginning, an aerobe biofilm, dominated by *Neomegalonema* (40% ±5%) grew on the fibres of the carbon brush alongside a few exoelectrogens dominated by *Arcobacter* (15% ±4%). These two genera belong to the *Proteobacteria* phylum. When the aerobe biofilm was thick enough to block oxygen diffusion, the exoelectrogen biofilm could develop, leading to a two-layer biofilm, with an internal anaerobic layer and an aerobic surface layer (Fig. 1).

### 4.2. Mechanisms

The molecular mechanisms of bidirectional extracellular electron transfers have been intensively investigated and have been reviewed in several recent articles [5–7]. It would be

useless to plagiarize these extensive review works here. Nevertheless, almost all studies deal with fully anaerobic bidirectional electron transfer, i.e. using electron acceptors other than oxygen, for example nitrate, sulfate, fumarate, or carbon dioxide [6,7]. It is not yet known whether or not electron transfer follows the same molecular pathways as those already described in anaerobic conditions when oxygen is the electron acceptor.

So far, very few studies have tried to unravel the molecular pathway of ABME. *Shewanella oneidensis* [26] and *Comamonas testoteroni* [15] have been used as model microorganisms in this objective. In the first case, the cathodic electron flow is speculated to result from reversal of multiple extracellular electron transport routes driven by proton gradients. In the second case, in contrast, two redox species have been identified. One, bound to the outer membrane, is involved in anodic electron transfer, while the other is soluble and catalyses oxygen reduction. The two redox species are speculated to have totally different behaviours for “inward” and “outward” electron transfer.

## 5. Concluding remarks and perspectives

Despite the limited number of studies, some clear conclusions can be extracted. First of all, ABMEs have definitely demonstrated that some efficient microbial anodes can accept regular expositions to air. The anodic current densities reported to date are smaller than the highest values reached with conventional microbial anodes, but they probably suffer from being evaluated in MFCs, i.e. under limitation by the cathode kinetics. Further studies in 3-electrode set-ups are advisable to characterize the kinetics of ABME over large ranges of potential.

Several studies have confirmed very interesting capacity for pH control in MFCs, resulting in long-term stability for up to several months. ABME may thus be the absolute weapon to solve the problems of oxygen crossover and pH control in MFCs. Nevertheless, these weapons must be handled with care. In particular, the two phases, of substrate addition on the one hand and aeration on the other, must be well separated in time, otherwise heterotrophic aerobic bacteria could develop and compete for oxygen reduction with the electrotroph bacteria on the cathode [11]. The balance between anodic and cathodic reactions must also be regulated accurately. It has already been observed that the anode acidification can be higher than the cathode alkalization, sometimes leading to acidification of the cathode [9].

In a general framework, beyond the scope of ABMEs, the most efficient biocathodes for oxygen reduction have reached current densities above 2 A/m<sup>2</sup>. For example, current densities up to 2120 ±64 mA/m<sup>2</sup> have been reached with a carbon felt electrode polarized at -0.1 V/ECS [20], 2200 mA/m<sup>2</sup> at +0.2 V/SCE in hypersaline media [21] and up to 3000 mA/m<sup>2</sup> at +0.4 V vs Ag/AgCl with forced aeration at 1.2 L/min air flow rate [22]. In the scope of ABMEs, the rotating electrode produced cathodic currents at the same level, thanks to the improved mass transport. The other ABMEs were slightly behind but many ensured current densities of several hundreds of mA/m<sup>2</sup> [9–11,13], similarly to many conventional O<sub>2</sub>-reducing biocathodes [23,24].

Analyses of the microbial populations involved in ABMEs are still rare but they have already identified various dominant genera, with suspected electroactivity. Some of them belong to phyla different from the *Proteobacteria*, which are a ubiquitous source of anaerobic electroactive species. ABMEs should consequently broaden the field of microorganisms of high interest for microbial electrochemical technologies.

Most studies have been conducted in synthetic media and always with the addition of acetate or glucose. Further efforts must now be made to use real wastewater if the objective is an application for wastewater treatment. Obviously, the question about a single reversible or multiple extracellular electron pathway(s) remains a key basic issue to be dealt with.

## Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

## Acknowledgements

This work was supported by the French Agence Nationale de la Recherche (ANR), within the framework of the Biotuba project (ANR-17-CE06-0015).

## References

- [1] B. Erable, A. Bergel, *Bioresour. Technol.* 100 (2009) 3302–3307.

- [2] X.-Y. Yong, Z.-Y. Yan, H.-B. Shen, J. Zhou, X.-Y. Wu, L.-J. Zhang, T. Zheng, M. Jiang, P. Wei, H.-H. Jia, Y.-C. Yong, *Bioresour. Technol.* 241 (2017) 1191–1196.
- [3] L.-H. Yang, T.-T. Zhu, W.-W. Cai, M.R. Haider, H.-C. Wang, H.-Y. Cheng, A.- J. Wang, *Bioresour. Technol.* 268 (2018) 176–182.
- [4] M. Oliot, L. Etcheverry, A. Mosdale, R. Basseguy, M.-L. D'elia, A. Bergel, *J. Power Sources* 356 (2017) 389–399.
- [5] Y. Jiang, R.J. Zeng, *Bioresour. Technol.* 271 (2019) 439–448.
- [6] S. Kalathil, D. Pant, *RSC Adv.* 6 (2016) 30582–30597.
- [7] Q. Xie, Y. Lu, L. Tang, G. Zeng, Z. Yang, C. Fan, J. Wang, S. Atashgahi, *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* (2020) 1–46.
- [8] M. Hoareau, B. Erable, A. Bergel, *Electrochem. Commun.* 104 (2019), 106473.
- [9] W. Li, J. Sun, Y. Hu, Y. Zhang, F. Deng, J. Chen, *J. Power Sources* 268 (2014) 287–293.
- [10] J. Sun, Y. Hu, W. Li, Y. Zhang, J. Chen, F. Deng, *J. Hazard. Mater.* 289 (2015) 108–117.
- [11] K.Y. Cheng, G. Ho, R. Cord-Ruwisch, *Environ. Sci. Technol.* 44 (2010) 518–525.
- [12] D.P.B.T.B. Strik, H.V.M. Hamelers, C.J.N. Buisman, *Environ. Sci. Technol.* 44 (2010) 532–537.
- [13] E. Blanchet, S. Pécastaings, B. Erable, C. Roques, A. Bergel, *Bioresour. Technol.* 173 (2014) 224–230.
- [14] S. Chen, R.K. Brown, S.A. Patil, K.J. Huber, J. Overmann, U. Schröder, *Environ. Sci.* (2019) 10.
- [15] Y. Yu, Y. Wu, B. Cao, Y.-G. Gao, X. Yan, *Electrochem. Commun.* 59 (2015) 43–47.
- [16] J. Chen, Y. Hu, W. Huang, L. Zhang, *Int. J. Hydrog. Energy* 42 (2017) 12574–12582.
- [17] M. Oliot, S. Galier, H. Roux de Balmann, A. Bergel, *Appl. Energy* 183 (2016) 1682–1704.
- [18] S. Freguia, K. Rabaey, Z. Yuan, J. Keller, *Water Res.* 42 (2008) 1387–1396.
- [19] M. Rimboud, D. Pocaznoi, B. Erable, A. Bergel, *Phys Chem Chem Phys* 16 (2014) 16349–16366.
- [20] E.M. Milner, D. Popescu, T. Curtis, I.M. Head, K. Scott, E.H. Yu, *J. Power Sources* 324 (2016) 8–16.
- [21] M. Rimboud, M. Barakat, W. Achouak, A. Bergel, M.-L. D'elia, *Bioresour. Technol.* 319 (2021), 124165.
- [22] E.M. Milner, E.H. Yu, *Fuel Cells* 18 (2018) 4–12.
- [23] M. Rimboud, M. Barakat, A. Bergel, B. Erable, *Bioelectrochemistry* 116 (2017) 24–32.

- [24] E. Desmond-Le Qu'ém'ener, M. Rimboud, A. Bridier, C. Madigou, B. Erable, A. Bergel, T. Bouchez, *Bioresour. Technol.* 214 (2016) 55–62.
- [25] H. Yun, B. Liang, D. Kong, A. Wang, *Chemosphere* 194 (2018) 553–561.
- [26] A.R. Rowe, P. Rajeev, A. Jain, S. Pirbadian, A. Okamoto, J.A. Gralnick, M.Y. El-Naggar, K.H. Nealson, *MBio* 9 (2018).

## 5 Performances et applications des PCM

### 5.1 Développement des PCM

La première PCM, qui utilisait des hydrocarbures comme substrat, a été proposée par deux chercheurs de la Socony Mobil Oil Company au Texas (Davis and Yarbrough, 1962). Les publications sur les PCM restent cependant très limitées dans les années qui suivent car, avant les années 2000, le concept de PCM repose sur deux processus antagonistes : la culture microbienne et la catalyse électrochimique. La culture microbienne requiert des conditions particulières (température, pH, salinité, etc.) et l'utilisation de milieux de culture riches et complexes. La catalyse électrochimique, elle, s'appuie sur des électrodes recouvertes de catalyseurs très chers qui exigent l'utilisation d'électrolytes à la composition chimique élémentaire afin d'éviter toute pollution. Le milieu de culture nécessaire à la croissance des bactéries entraîne des dépôts et salissures sur la surface des électrodes recouvertes de catalyseur et donc une baisse de l'efficacité des catalyseurs et des performances de la pile (Bergel et al., 2013).

A partir des années 2002, la découverte que le biofilm lui-même peut jouer le rôle de catalyseur (selon les mécanismes décrits dans la partie 2.1 de ce chapitre) relance les études sur les PCM. On observe alors une augmentation exponentielle des publications (Figure 1.13), approchant même le millier de publications pour l'année 2015 (Santoro et al., 2017a).

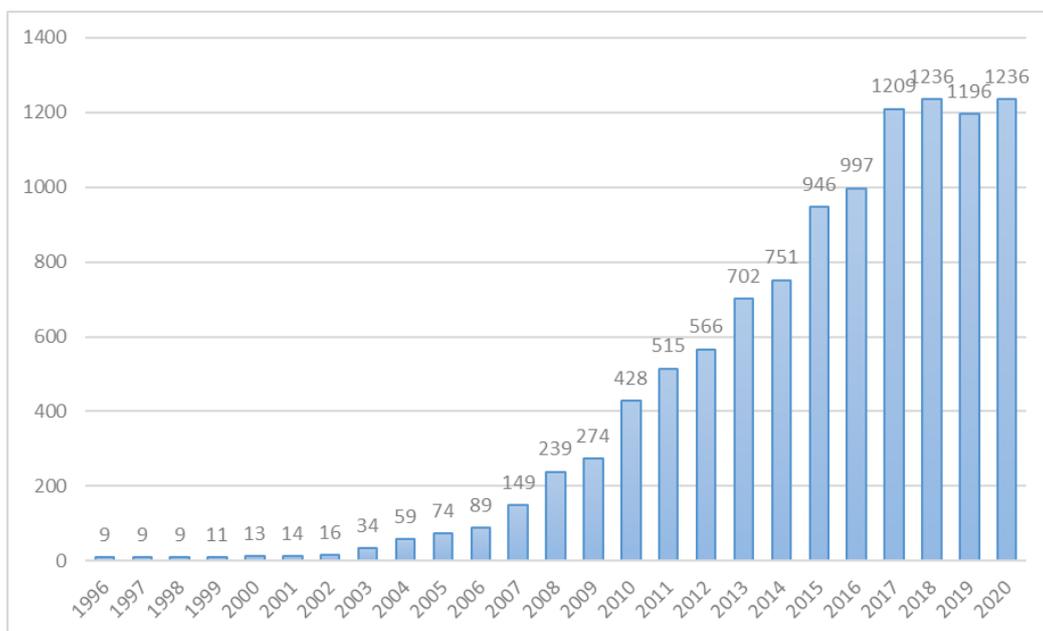


Figure 1.13 : Evolution des publications concernant les piles à combustible microbiennes (Microbial Fuel Cell) de 1996 à 2020 d'après Web of Science (Consulté le : 16 mars 2021).

Les PCM ont offert aux chercheurs un outil permettant d'avancer dans la compréhension de l'écologie microbienne et de déchiffrer un nouvel aspect de la biologie cellulaire (Santoro et al., 2017a). Les PCM sont aussi une technologie innovante balbutiante pour la production d'énergie. Les espoirs initiaux de production massive d'énergie électrique ayant été largement déçus, les chercheurs se sont tournés vers l'application des PCM pour minimiser le coût des traitements d'effluents (Aelterman et al., 2006; Guadarrama-Pérez et al., 2019; He et al., 2017; Lefebvre et al., 2011).

## 5.2 PCM pour le traitement des eaux usées

De nombreux substrats peuvent être dégradés à l'anode des PCM. Ils peuvent être issus de biodéchets, de molécules polluantes à dégrader, de différents types d'eaux usées, etc. (Pandey et al., 2016; Pant et al., 2010). Compte tenu des objectifs de la thèse, nous focalisons ici les performances des PCM appliquées au traitement des eaux usées.

Plusieurs équipes ont tenté de concevoir des pilotes allant de moins d'un litre à un millier de litres. On peut classer les PCM pour le traitement des eaux usées en quatre types suivant qu'elles sont optimisées pour le traitement de la DCO, de l'azote, des phosphates ou des sulfates (Palanisamy et al., 2019). Le principe est le même mais les réactions sont différentes.

Pour l'abattement de la DCO, c'est la matière organique oxydée à l'anode qui importe. Pour le traitement des matières azotées, trois étapes successives s'opèrent avec tout d'abord la migration des ions  $\text{NH}_4^+$  vers le compartiment cathodique suivi de la nitrification et de la dénitrification comme dans un système classique. Pour le traitement des phosphates et des sulfates, les ions  $\text{PO}_4^{2-}$  et  $\text{SO}_4^{2-}$  sont réduits à la cathode.

Les PCM ont tenté d'exploiter des eaux usées industrielles très variées incluant des effluents d'industries agroalimentaires (laiteries, sucreries, brasseries...), d'industries textiles ou papetières par exemple (Palanisamy et al., 2019). Des densités de puissance de l'ordre du  $\text{W/m}^2$  ont été obtenues avec un maximum de  $6 \text{ W/m}^2$  pour des eaux usées issues de la production d'huiles végétales (Firdous et al., 2018) ou encore  $1,8 \text{ W/m}^2$  pour des eaux usées de moulin à manioc (Kaewkannetra et al., 2011).

Dans ce travail de thèse l'abattement de DCO d'eaux usées domestiques sera couplé à la réduction de l'oxygène à la partie cathodique. Même s'il ne s'agit pas de mettre en œuvre une PCM mais un biotuba, le principe est identique. Il a donc paru utile de se pencher sur les

caractéristiques et les performances des PCM associant l'oxydation des matières organiques avec la réduction de l'oxygène (Tableau 1.6). Certains des articles concernés ont déjà été cités dans les parties précédentes dans le cadre de la présentation des anodes ou cathodes, mais il paraît utile de regrouper brièvement ici les caractéristiques de ce type de PCM. Ces PCM ont été surtout conçues à l'échelle de laboratoire. Seuls quelques systèmes ont un volume qui dépasse le litre (Rodrigo et al., 2007; Yang et al., 2018; Yu et al., 2012; Estrada-Arriaga et al., 2018), et deux seulement sont appliqués à grande échelle avec des volumes de 250 L (Feng et al., 2014) et 1000 L (Liang et al., 2018). Les temps de rétention varient de 20 minutes (Ahn and Logan, 2010) à 12 jours (Yang et al., 2018).

Pour la majorité de ces PCM, l'anode est constituée d'une brosse en graphite (Ahn and Logan, 2010, 2010; Choi and Ahn, 2013; Feng et al., 2014; Kim et al., 2015; Ren et al., 2014; Sciarria et al., 2013), une configuration qui présente une surface accessible importante et permet donc de former une grande surface de biofilm électroactif. Certains systèmes peuvent compter jusqu'à 32 brosses en graphites (Feng et al., 2014) afin d'augmenter la surface anodique. La plupart des cathodes sont des cathodes à air, situées à l'interface air-liquide et constituées de tissu de carbone recouvert de platine (Ahn et al., 2014; Ahn and Logan, 2010; Cheng et al., 2006a; Choi and Ahn, 2013; Min and Logan, 2004; Puig et al., 2011; Ren et al., 2014; Sciarria et al., 2013; You et al., 2006; Yu et al., 2012), une configuration considérée optimale pour la réduction de l'oxygène.

Les inocula sont des boues (Ahn and Logan, 2010; Estrada-Arriaga et al., 2018; Feng et al., 2014; You et al., 2006; Yu et al., 2012), des effluents provenant d'une PCM précédente (Liang et al., 2018; Puig et al., 2011) ou, pour la majorité, seulement les eaux usées (Ahn et al., 2014; Ali et al., 2015; Cheng et al., 2006a; Corbella and Puigagut, 2018; Kim et al., 2015; Min and Logan, 2004; Ren et al., 2014; Rodrigo et al., 2007). Il n'y a pas alors d'inoculum spécifique mais les eaux usées servent à la fois de substrat et d'inoculum. Pour certaines études spécifiques, la PCM peut être inoculée avec des micro-algues ou des eaux usées de moulin à huile.

L'abattement de la DCO varie de 0,25 (Rodrigo et al., 2007) à 94% (Ahn et al., 2014) et la majorité des études d'atteignent un abattement conséquent supérieur à 70% (Ahn et al., 2014; Corbella and Puigagut, 2018; Estrada-Arriaga et al., 2018; Feng et al., 2014; Liang et al., 2018; Liu et al., 2004; Min and Logan, 2004; Puig et al., 2011; Ren et al., 2014; Yang et al., 2018; You et al., 2006; Yu et al., 2012).

Tableau 1.6 : Performances de PCM alimentées par des eaux usées domestiques.

PCM	HRT (h)	Anode	Cathode	Inoculum	Abattement de DCO (%)	P (mW.m <sup>2</sup> )	Référence
PCM tubulaire 22 cm <sup>3</sup>	1,1	Feuille de carbone 100 cm <sup>2</sup>	Tissu de carbone recouvert de platine 100 cm <sup>2</sup>	EU	42	72 ±1	(Min and Logan, 2004)
	4				79	43 ±1	
PCM avec cathode à air 52 cm <sup>3</sup>	2	Feuille de carbone 13 cm <sup>2</sup>	Tissu de carbone recouvert de platine 13 cm <sup>2</sup>	Boues anaérobies	71	103 ±2	(You et al., 2006)
PCM avec cathode à air 28 cm <sup>3</sup>	3,4	Tissu de carbone 7 cm <sup>2</sup>	Tissu de carbone recouvert de platine 7 cm <sup>2</sup>	EU	40 à 50	464	(Cheng et al., 2006b)
PCM double compartiment 1100 cm <sup>3</sup>	3	Tige en graphite 20 cm <sup>2</sup>	Tige en graphite 20 cm <sup>2</sup>	EU	0,25	25	(Rodrigo et al., 2007)
PCM avec cathode à air 28 cm <sup>3</sup>	0,2	Brosse en graphite 2200 cm <sup>2</sup>	Tissu de carbone recouvert de platine 7 cm <sup>2</sup>	Boues anaérobies	26	422	(Ahn and Logan, 2010)
PCM avec cathode à air 242 cm <sup>3</sup>	4,2	Granules de graphite 153 cm <sup>3</sup>	Tissu de carbone recouvert de platine 9,8 cm <sup>2</sup>	Effluent d'une PCM	80	1420	(Puig et al., 2011)
3 PCM avec cathode à air 5700 cm <sup>3</sup>	6	5 feutres de carbone successifs 12, 9,5, 7, 4,5, et 2 cm <sup>2</sup>	Tissu de carbone recouvert de platine 108 cm <sup>2</sup>	Boues anaérobies	65 ±2	149 ±23	(Yu et al., 2012)
	8				80 ±4	115 ±26	
2 PCM avec cathode à air 56 cm <sup>3</sup>	0,33	Brosse en graphite 2200 cm <sup>2</sup>	Tissu de carbone recouvert de platine 7 cm <sup>2</sup>	Culture provenant d'EU	44	420	(Choi and Ahn, 2013)
PCM avec cathode à air 28 cm <sup>3</sup>	-	Brosse en graphite 2200 cm <sup>2</sup>	Tissu de carbone recouvert de platine 7 cm <sup>2</sup>	EU + EU de moulin à huile	60	125	(Sciarria et al., 2013)
PCM avec cathode à air 130 cm <sup>3</sup>	36	Brosse en graphite 2200 cm <sup>2</sup>	Tissu de carbone recouvert de platine 7 cm <sup>2</sup>	EU	62 ±4 à 94 ±1	328 ±11	(Ahn et al., 2014)
	12				81 ±5 à 93 ±3	282 ±29	

PCM	HRT (h)	Anode	Cathode	Inoculum	Abattement de DCO (%)	P (mW.m <sup>2</sup> )	Référence
SHMFC 250 L	144	32 brosses en graphite	Grille en carbone recouverte de platine 1 m <sup>2</sup>	Boues anaérobies granulaires	79 ±7	116	(Feng et al., 2014)
MFC-AFMBR 130 cm <sup>3</sup>	9	3 brosses en graphite	Tissu de carbone recouvert de platine 35 cm <sup>2</sup>	EU	92,5	366	(Ren et al., 2014)
PCM double compartiment	24	Plaque en argent 55 cm <sup>2</sup>	Plaque en argent 55 cm <sup>2</sup>	EU	17,8 8,5	209 117	(Ali et al., 2015)
PCM avec cathode à air (N1C) 100 cm <sup>3</sup>	8,8	3 brosses en graphite coupés proches de la cathode	PVDF, charbon actif et noir de carbone 40 cm <sup>2</sup>	EU	69,0 ±0,4	213	(Kim et al., 2015)
	4,4				54,2 ±2,3	253	
	2,2				40,7 ±2,7	305	
PCM avec cathode à air (S2C) 140 cm <sup>3</sup>	8,8	3 brosses en graphite entières entre 2 cathodes	PVDF, charbon actif et noir de carbone 80 cm <sup>2</sup>	EU	64,8 ±1,7	143	(Kim et al., 2015)
	4,4				48,3 ±1,0	170	
	2,2				32,8 ±1,9	163	
ABFMC 1600 cm <sup>3</sup>	288	Tissu de carbone 2,5 cm <sup>2</sup>	Tissu de carbone 2,5 cm <sup>2</sup>	Microalgues + EU	80,2	63	(Yang et al., 2018)
Stack de 40 PCM avec cathode à air 16 L	72	Feutre de carbone 0,3 m <sup>2</sup>	Tissu de carbone recouvert de PbO <sub>2</sub>	Boues anaérobies granulaires	78	4,8	(Estrada-Arriaga et al., 2018)
PCM lagunaire 850 cm <sup>3</sup>	168	Granules de graphite 450 cm <sup>3</sup>	Feutre de carbone 61 cm <sup>2</sup>	EU	82,7	4,8	(Corbella and Puigagut, 2018)
PCM avec 50 modules parallèles 1000 L	2	Charbon activé 200 cm <sup>3</sup>	Charbon activé 200 cm <sup>3</sup>	Effluent d'une PCM	70-80	0,4-3,6	(Liang et al., 2018)

MEP : Membrane échangeuse de protons, EU : eaux usées, SHMFC : Stackable horizontal plug flow MFC, AFMBR : Anaerobic Fluidized Bed

Membrane Bioreactor, PVDF : PolyVinylidene Fluoride

Les densités de puissance sont de l'ordre de la centaine de  $\text{mW/m}^2$  (Ahn et al., 2014, 2014; Ali et al., 2015; Cheng et al., 2006a; Choi and Ahn, 2013; Feng et al., 2014; Kim et al., 2015; Ren et al., 2014; Sciarria et al., 2013; You et al., 2006; Yu et al., 2012), une seule étude atteint une puissance de l'ordre du  $\text{W/m}^2$ , avec une valeur de  $1,4 \text{ W/m}^2$  (Puig et al., 2011), dans une PCM lagunaire utilisant une anode constituée de granules de graphite et une cathode en feutre de carbone. Cette configuration semble prometteuse puisqu'elle permet d'abattre 80% de la DCO avec un temps de rétention de 4,2 jours.

Il semble difficile d'obtenir des densités de puissance significatives en conditions réelles, notamment sans ajout d'acétate qui est le substrat qui donne les meilleures performances en conditions de laboratoire. A titre de comparaison, on peut noter qu'une production d'électricité au moyen de panneaux photovoltaïques permet d'obtenir une densité de puissance de l'ordre de  $100 \text{ W/m}^2$  (Boitier and Alonso, 2005). Pour une pile à hydrogène classique, cette densité de puissance peut même atteindre  $10\,000 \text{ W/m}^2$ . La faible densité de puissance délivrée par les PCM est évidemment le frein majeur à leur déploiement à grande échelle (He et al., 2017).

## 6 De la PCM au biotuba

### 6.1 Principe du biotuba

La production d'énergie des PCM étant insuffisante pour être compétitive, il a paru judicieux d'abandonner cet objectif et de tenter de maximiser les capacités de traitement du système en le configurant pour qu'il délivre une intensité maximale, plutôt qu'une puissance maximale. Une intensité élevée signifie que les vitesses d'oxydation à l'anode et donc d'abattement de la matière organique sont également élevées.

Comme développé plus haut, l'intensité maximale d'une PCM est atteinte lorsque l'anode et la cathode sont en court-circuit, c'est-à-dire lorsque la résistance externe est nulle. Cela correspond au point de fonctionnement (b) de la Figure 1.11 (Erable et al., 2011). La PCM étant en court-circuit, le système peut être réduit à sa forme la plus simple, une électrode unique avec une partie basse anodique en conditions permettant l'oxydation de la matière organique et une partie haute cathodique permettant la réduction de l'oxygène ou de nitrates (Figure 1.14). C'est sous cette forme qu'en 2008, soit un siècle après la découverte de l'électroactivité bactérienne par Potter, qu'a été proposé le concept de biotuba au Laboratoire de Génie Chimique de Toulouse (Bergel et al., 2008; Erable et al., 2011).

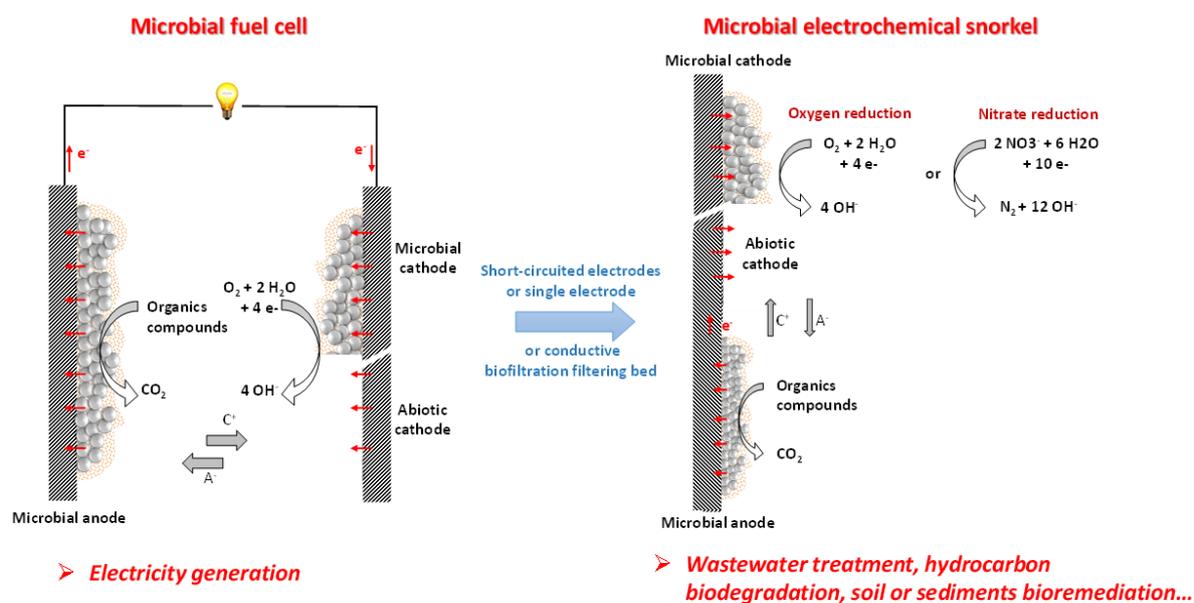


Figure 1.14 : De la PCM au biotuba (Hoareau et al., 2019).

## 6.2 Applications et performances des biotubas (Article 2)

Bien que les biotubas n'aient pas fait l'objet de nombreuses études dans les années qui ont suivi leur découverte, ils ont tout de même été testés avec succès pour une large gamme d'applications. La revue bibliographique sur les biotubas réalisée dans le cadre de cette thèse a donné lieu à un article publié dans le journal *Electrochemistry Communications* et intitulé « *Microbial electrochemical snorkels (MESs): A budding technology for multiple applications. A mini review* ».

Les principales conclusions de l'analyse bibliographique sont :

- Plusieurs groupes ont récemment mis en œuvre différentes versions de biotubas, incluant la réduction de nitrates, l'élimination d'hydrocarbures et le traitement d'eaux usées, une contribution aux cycles biogéochimiques a même été envisagée.
- L'avantage majeur du biotuba est la simplicité de sa configuration. Une seule tige conductrice implantée dans deux zones ayant des compositions chimiques différentes peut être suffisante, par exemple une tige en carbone partiellement plantée dans des sédiments anaérobies avec la partie supérieure exposée à l'eau aérobie. Un biofilm électroactif se développe dans la zone anaérobie, oxyde la matière organique en transférant les électrons au matériau. Les électrons sont évacués par la réduction de

l'oxygène dans la partie aérobie. Une telle simplicité garantit des systèmes peu coûteux et nécessitant peu d'entretien.

- La première publication portant sur les biotubas pour le traitement des eaux usées compare une PCM classique équipée d'une résistance de 1000  $\Omega$ , un biotuba et un contrôle sans électrode (Erable et al., 2011). L'abattement de DCO est de seulement 15% dans le contrôle, alors qu'il est de 40 à 50% avec la PCM et atteint 60 à 75% avec le biotuba.
- Les résultats les plus impressionnants pour le traitement des eaux usées sont obtenus avec les systèmes de type METland ou EABB-CW (Electroactive Biofilm-Based Constructed Wetland) (Ramírez-Vargas et al., 2018a). Ces systèmes intègrent un lit de matériau conducteur (correspondant au biotuba) dans des bassins de traitement lagunaire classiques (Prado et al., 2019; Ramírez-Vargas et al., 2018b). Par rapport à une lagune classique équipée de gravier, le biotuba utilisant des granules de coke conducteurs a assuré des abattements de DCO et DBO<sub>5</sub> respectivement 3 et 4,5 fois plus importants (Aguirre-Sierra et al., 2016). Le biotuba a permis d'atteindre les valeurs limites de rejet de 125 mg O<sub>2</sub>/L pour la DCO et 25 mg O<sub>2</sub>/L pour la DBO<sub>5</sub> avec un temps de rétention de 0,5 jour, alors que le contrôle équipé de gravier n'a atteint ces limites légales qu'avec des temps de rétention de 3,4 jours.
- Le biotuba utilisé pour réduire les nitrates était sous la forme d'une électrode unique avec une partie basse en matériau carboné placée dans des sédiments et permettant l'oxydation de la matière organique et une partie haute en fer assurant la réduction des nitrates (Yang et al., 2015). Le système a permis d'abattre 98% des nitrates en 16 jours mais la présence de rouille à la surface de la partie cathodique en fer suggère que la réduction des nitrates ait pu impliquer des réactions chimiques avec le fer et non un mécanisme électrochimique simple.
- Plusieurs études se sont intéressées au traitement des hydrocarbures et aux cycles biogéochimiques associés (Cruz Viggì et al., 2017, 2015; Mapelli et al., 2017; Maturro et al., 2017). Le biotuba consistait en une simple tige de graphite dont la partie inférieure était enfouie dans des sédiments contaminés par du pétrole brut et la partie supérieure placée dans l'eau aérobie au-dessus. Au bout de 200 jours les réacteurs équipés d'un et de trois tubas ont montré une diminution des hydrocarbures pétroliers de 12 et 21%, respectivement, alors qu'aucun abattement n'était observé pour les contrôles (Cruz Viggì et al., 2015). Après 417 jours, il n'y avait pas de différence significative entre les contrôles et les biotubas. Dans ce cas, les biotubas ont accéléré

la biodégradation. L'article souligne leur faible coût par rapport aux traitements conventionnels.

- La surface de l'électrode du biotuba précédent (Cruz Viggi et al., 2015) présentait une majorité d'*Alphaproteobacteria* comprenant des bactéries exoélectrogènes oxydant le soufre et les sulfures. Les sédiments contenaient une majorité de *Deltaproteobacteria*. Le biotuba est soupçonné d'avoir un impact sur les communautés microbiennes et de stimuler la biodégradation des composés organiques par des bactéries sulfato-réductrices, même loin de sa surface.
- Les systèmes de type METland ou EABB-CW (Ramírez-Vargas et al., 2018a), mis en place pour le traitement lagunaire des eaux usées, ont révélé des capacités prometteuses qui les rapprochent d'applications concrètes à court terme. Ce succès peut être relié au rapport surface/volume (A/V) élevé pour les biotubas mis en œuvre sous forme de lit de granules conducteurs. La plupart des autres études ont montré des rapports A/V faibles. Il serait donc nécessaire de travailler avec les rapports A/V les plus élevés possibles pour évaluer les performances maximales des biotubas.
- En général, le potentiel de fonctionnement du biotuba n'est pas mentionné dans la bibliographie. Il s'agit d'une omission gênante car le potentiel est le principal paramètre par lequel le biotuba peut affecter les réactions électrochimiques qui se produisent à sa surface. En outre, le potentiel de travail du biotuba peut être contrôlé en choisissant le rapport entre les surfaces de sa partie anodique et de sa partie cathodique.
- Les biotubas sont généralement constitués d'un seul matériau conducteur exposé à deux zones de compositions chimiques différentes qui déterminent ses parties cathodique et anodique. Les deux zones ne sont souvent pas délimitées avec précision mais correspondent au gradient de concentration en accepteur d'électrons, généralement l'oxygène, en fonction de la hauteur. Si le profil de concentration varie, en raison d'un remplissage variable du réacteur ou de vagues dans un environnement naturel par exemple, le biofilm doit être alternativement exoélectrogénique (anode) et électrotrophique (cathode). Les recherches récentes sur les électrodes microbiennes réversibles, également appelées bidirectionnelles, pourraient fournir des données utiles pour le développement des biotubas.

# Microbial electrochemical snorkels (MESs): A budding technology for multiple applications. A mini review

Morgane Hoareau, Benjamin Erable, Alain Bergel

Laboratoire de Génie Chimique, Université de Toulouse, CNRS, INP, UPS, Toulouse, France

Corresponding author: [morgane.hoareau@ensiacet.fr](mailto:morgane.hoareau@ensiacet.fr) (M. Hoareau)

## Highlights

- A microbial electrochemical snorkel (MES) is a short-circuited microbial fuel cell.
- MESs ensure the highest possible electro-microbial reaction rates.
- A multitude of various applications have emerged in the last few years.
- Studies should now give more attention to controlling the operating potential.
- Performance could be still improved, notably by working on the nature of the materials.

## Abstract

A microbial electrochemical snorkel (MES) is formed by the direct coupling of a microbial anode with a cathode, which may or may not be biotic. It can be considered as a short-circuited microbial fuel cell. In comparison with a microbial fuel cell, an MES does not produce power but it ensures the highest possible electrochemical reaction rates that the system can support. Although MESs have recently received little research attention, a multitude of possible applications have emerged in the last few years. MESs have recently been shown to be effective for organic matter abatement in wastewater, nitrate removal, decontamination of hydrocarbon-polluted sediments, and soil bioremediation. Other applications are foreseen. Thanks to its extreme simplicity, the MES could offer a real opportunity for short-term scale-up. This mini-review seeks to attract the attention of the research community to the potential of this technology and to propose research to develop it.

## Keywords

Microbial fuel cell; electroactive biofilm; wastewater treatment; bioremediation; conductive biofilter; METland.

## 1. Introduction

The discovery of the electrocatalytic properties of microbial biofilms has raised great hopes for the emergence of microbial electrochemical technologies in various fields [1]. The microbial electrochemical snorkel (MES) is a very simple, probably the simplest, example of microbial electrochemical technology. It consists of the direct coupling of a microbial anode with a cathode, which may or may not be biotic [2]. In other words, it can be considered as a short-circuited microbial fuel cell (MFC) [3].

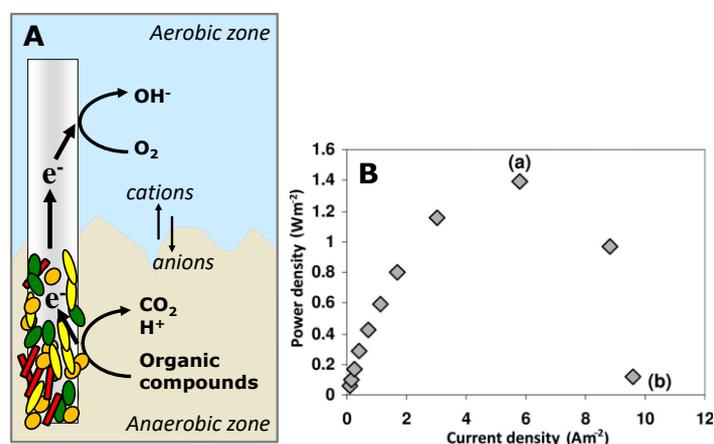
MESs were not the subject of much research in the years following their discovery in 2008 [4] and the first paper devoted to them [2], which was published in 2011. In contrast, several groups have recently implemented different versions of MESs and achieved success in a wide range of applications, including nitrate reduction [5], hydrocarbon removal [6,7] and wastewater treatment [8], and even relating to biogeochemical cycles [9]. Thanks to their extreme simplicity, the use of MESs is one of the microbial electrochemical technologies that could offer the opportunity of large-scale development in the short term. This review is intended to attract the attention of the research community to this technology and to propose lines of action to boost short-term MES scale-up.

## 2. MES principle, benefits and expectations

Basically, an MES is a short-circuited MFC. MFCs are characterized by a bell-shaped power–current curve (Fig. 1). When short-circuited, an MFC no longer produces any power, because the voltage between anode and cathode is zero, but it works at the maximum possible current. The main advantage of an MES is thus to sustain the maximum current between cathode and anode that an MFC can produce. The reaction rates are raised to the maximum that the system can support. This way of operating is ideal when the objective is to raise electrochemical reaction rates rather than to produce electrical power. This is the case when the primary objective is the abatement of organic matter in wastewater [3], the decontamination of sediments or soils [10], the cleansing of effluents [11], the recovery of metals [12], etc. Actually, to be pragmatic, the power density produced so far by MFCs is so low that working in MES configuration should be the most suitable solution for many applications.

Another major advantage of an MES is the simplicity of the configuration it allows. A single conductive rod that spans two zones with different chemical compositions can be sufficient, for example, a carbon rod partially planted in anaerobic sediments with the upper

part exposed to aerobic water (Fig. 1). An electroactive biofilm develops on the surface embedded in the anaerobic zone and releases electrons to the material. Electrons flow to the aerobic part, where they are transferred to oxygen. Such simplicity ensures low-cost and low-maintenance systems.



**Fig. 1: Principle of the microbial electrochemical snorkel. A) Scheme that justifies the name snorkel: microbial cells in the anaerobic sublayers use the snorkel to respire thanks to the oxygen contained in the aerobic upper layers. B) Power-current curve of a microbial fuel cell from [2]: the optimal operating point for an MFC is located at the maximum power (a), while the operating point of an MES is located at the highest possible current (b).**

It has been noted that an MES can be seen as a process that mimics cable bacteria [7,13]. Cable bacteria are filamentous bacteria contained in marine and freshwater sediments, which can transport electrons over centimetre-long distances, for instance from anoxic sediments where sulfide is oxidized to the aerobic layers above where oxygen is reduced. The fact that MESs operate in a similar way to a natural process is an additional reason to be optimistic about their capacity for adaptation to large-scale applications.

A very wide range of applications is anticipated. The capacity of MESs to enhance wastewater treatment [2,8], remediation of hydrocarbon-contaminated sediments [6], and nitrate [5] or sulfate [9] removal have already been demonstrated experimentally. It has also been speculated that using MESs in landfills or wetlands may divert electron flow from methane production in the anaerobic zone and thus offer a strategy for preventing methane emission [14]. Benthic MESs may be able to shift microbial respiration patterns in soils and sediments. The increase in redox potential associated with electron transfer via MESs may be a way to mitigate other environmental concerns, such as the production of sulfide and mercury methylation, and to improve the cultivation of crops such as rice [14].

### 3. MES applications

**Table 1: Characteristics of MESs reported in the literature. WW: wastewater; COD chemical oxygen demand.**

Application	Medium	Snorkel		S/V cm <sup>2</sup> /cm <sup>3</sup>	Result vs. control	Ref
		Anode	Cathode			
WW treatment (organic matter)	WW, activated sludge, acetate 120 mL	Graphite felt 40 cm <sup>2</sup>	Platinum 20 cm <sup>2</sup>	0.50	60 to 75% COD removal vs. 15%	(Erable et al., 2011)
	WW 11 L	Coke granules vs. gravel 0.034 m <sup>3</sup>		23.6	91% COD removal vs. 73% 96% BOD <sub>5</sub> removal vs. 86%	(Aguirre- Sierra et al., 2016)
	Pig manure, starch, molasses 2.5 L	Petroleum coke vs. sand 0.01 m <sup>3</sup>		12.0	88% COD removal vs. 76% 90% COD removal vs. 81%	(Ramírez- Vargas et al., 2018a) (Ramírez- Vargas et al., 2019)
	WW 100 mL	Graphite Coke Biochar 170 cm <sup>3</sup>		5.7	39% COD removal 47% COD removal 56% COD removal	(Prado et al., 2019)
Basic	Synthetic medium inoc. with <i>S.</i> <i>decolorationis</i> 20 mL	Graphite rod 11.8 cm <sup>2</sup>		0.6	Rapid cell growth and substrate consumption	(Yang et al., 2013)
WW treatment (nitrate)	NaNO <sub>3</sub> solution, sediments 2 L	Carbon felt 38.5 cm <sup>2</sup>	Iron rod 80.1 cm <sup>2</sup>	0.05	98% nitrate removal	(Yang et al., 2015)
Marine decontamination (hydrocarbons)	Seawater 40 mL, Contaminated sediment 50 g	Graphite rod 14.7 cm <sup>2</sup>		0.37	12% hydrocarbon removal (1 snorkel) 21% (3 snorkels) vs. no removal (control)	(Cruz Viggi et al., 2015)
					Identification of microbial communities	(Matturro et al., 2017)
					85% sulfate reduction vs. no reduction	(Cruz Viggi et al., 2017)

Application	Medium	Snorkel		S/V cm <sup>2</sup> /cm <sup>3</sup>	Result vs. control	Ref
		Anode	Cathode			
Soil remediation	Water 50 mL Soil 50 g	Graphite felt 64 cm <sup>2</sup>		1.28	20% remaining soil toxicity vs. 45%	(Domínguez- Garay et al., 2017)

### 3.1. Abatement of organic matter in wastewater treatment

The seminal paper demonstrated the efficiency of an MES in reducing organic matter in wastewater [2]. An MES was compared with a 1000  $\Omega$ -connected MFC and a control without electrodes. COD decreased by only 15% in the control, while the abatement was 40 to 50% with the MFC and reached 60 to 75% with the MES.

The most impressive successes have been obtained by implementing MESs in a constructed wetland, resulting in a so-called Electroactive Biofilm-Based Constructed Wetland (EABB-CW) [15]. In this case, MES is used as a kind of conductive biofiltration bed integrated in an artificial lagoon. Compared with a conventional lagoon equipped with gravel, an MES using conductive coke granules ensured COD and BOD<sub>5</sub> reductions up to 3 times and 4.5 times higher, respectively [8]. The MES made it possible to reach the discharge limit values of 125 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup> for COD and 25 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup> for BOD<sub>5</sub> after the very low retention time of 0.5 day, while the control equipped with gravel only reached this legal limit after a retention time of 3.4 days. Further studies on EABB-CW have shown the impact of the nature of the conductive material on the capacity of the MES to remove pollutants [17,20]. For the treatment of pig manure, COD removal of up to 90% was attained, while the control equipped with a sand biofilter gave 81% [16]. EABB-CW was also efficient for ammonium and phosphate removal [16].

### 3.2. Denitrification

An MES was used to reduce nitrates. The anodic part, made of carbon felt, was set in sediments and the cathodic part, an iron cylinder, was in the solution above, which contained sodium nitrate. The anode oxidized organic matter, while the cathode reduced nitrate to N<sub>2</sub> [5].

This MES was compared with two control reactors, one containing only sediments with no electrode, and the other only the electrode without sediment. From the 5th day, a rapid

decrease in nitrate was observed with the MES, whereas its concentration did not vary in the control reactor without sediment and decreased only slightly from the 10th day in the reactor with no electrode. After 16 days, the nitrate removal efficiency in the MES reactor reached 98%. However, a green rust-like surface coating was observed on the iron rod (cathode part), so the mechanism of nitrate reduction may not be a simple electrochemical reduction on the cathode, but could also involve chemical reactions with iron.

### 3.3. Hydrocarbon biodegradation

Several studies have proposed the use of MESs to decontaminate marine sediments polluted with hydrocarbons. Experiments were conducted over 400 days with reactors containing one or three snorkels. Control experiments were performed without a snorkel or with a snorkel but in an autoclaved medium [6]. The snorkel consisted of a simple graphite rod with the lower part immersed in crude-oil-contaminated sediments and the upper part in the aerobic water above.

No change was observed after 200 days for the control without snorkel. The reactors equipped with one and three snorkels showed a decrease of 12 and 21%, respectively, in the total petroleum hydrocarbons. After 417 days, there was no significant difference between controls and snorkels. In this case, the snorkels accelerated the biodegradation and were less expensive than conventional treatments.

A similar experiment conducted on hydrocarbon-contaminated sediments from a river led to the modelling of the chemical and biological reactions involved in MES process [9]. The MES mainly accelerated sulfate reduction driven by the oxidation of the organic contaminants.

The bacterial populations on the MES surface had a configuration similar to those found in marine sediments, with a majority of Proteobacteria (85% for the electrode, 61% for sediments) [7]. However, Alphaproteobacteria, including sulfur- and sulfide-oxidizing bacteria which may be capable of transmitting the electrons resulting from sulfide oxidation, were mainly present on the electrode surface, while the sediments contained a majority of Deltaproteobacteria. The snorkel has been suspected of having an impact on microbial communities, even those far from its surface, and of stimulating biodegradation by sulfate-reducing bacteria in the surrounding area [21].

### 3.4. Soil bioremediation

In flooded soils, a deficiency of suitable electron acceptors can limit the efficiency of microbial remediation of organic pollutants. Conventional bioremediation techniques overcome this constraint by supplying additional electron acceptors like oxygen (bioventing) or nitrates [22]. This process can raise some concerns in terms of cost and secondary pollution, e.g. by nitrite [23]. Alternatively, electrons can also be supplied by using electrodes in so-called microbial electro-remediating cells [24] or a bioelectroventing process [19].

A recent paper has compared a bioelectroventing process with other electro-microbial processes, including MES, for  $^{14}\text{C}$ -ATR mineralization, i.e. complete degradation of  $^{14}\text{C}$ -atrazine to  $^{14}\text{CO}_2$  [19]. The snorkel consisted of a graphite felt electrode placed vertically, partially buried in soil and partially surrounded by the water above. A control experiment was performed with one electrode buried in soil and another in the water above, but not connected. After 20 days, the toxicity of soils treated (measured by the inhibition of *Pseudokirchneriella subcapitata* algal growth) was 20% in the snorkel and 45% in the control. Nevertheless, zero toxicity was obtained only when the anode was polarized at 600 mV vs. Ag/AgCl using a 3-electrode set-up.

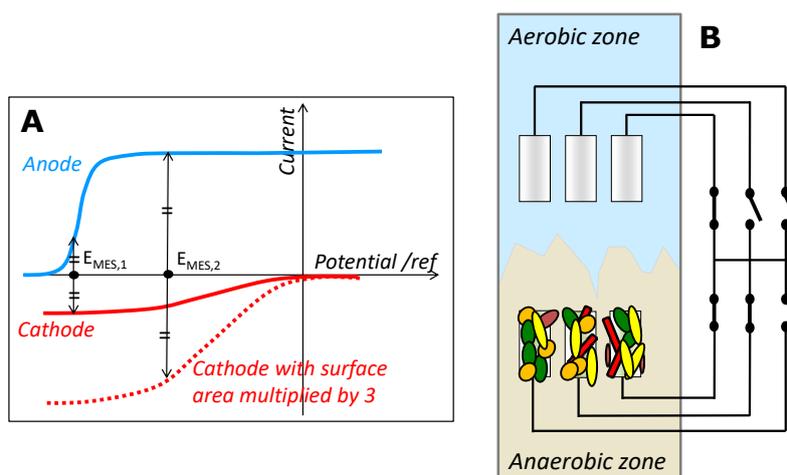
## 4. Perspectives

Several possible application domains of MESs have been considered, mainly relating to waste treatment and environmental remediation. The application horizon is already wide but could be further extended to other sectors, such as metal recovery.

EABB-CWs have revealed promising capabilities, not far from practical applications in the short term. This success may be linked to the high surface area-to-volume ( $A/V$ ) ratio (Table 1), which resulted from implementing the snorkels in the form of a packing bed. In contrast, most other studies found low  $A/V$  ratios. Consequently, it would be advisable to work with the highest possible  $A/V$  ratios in future research to assess the full capabilities of MESs.

Generally, the potential at which an MES works is not reported in the literature. This is a serious omission because the potential is the main parameter by which the snorkel can affect the electrochemical reactions that happen on its surface. As a first simple approach, the distribution of the electrostatic potential in solution can be neglected, assuming thus that the snorkel works at a uniform Nernst potential value. If the kinetics of the anode and cathode parts are known, the Nernst potential of the snorkel can be calculated by determining the value

at which the anode current is equal to the cathode current (Fig. 2A). Moreover, the working potential of the snorkel can be controlled by choosing the ratio of anode to cathode surface areas. Increasing the cathode surface area will move this potential towards higher values, while, conversely, increasing the anode surface area will decrease it. Practically, the snorkel potential could thus be controlled dynamically by designing a system with several anode and cathode parts, connected together through simple on/off switches (Fig. 2.B). The relative surface areas of the anode and cathode could thus be adjusted by simple connection/disconnection of the various parts.



**Fig. 2: A) Current-potential curves of the anode and cathode parts that allow the MES potential to be predicted. If the cathode surface area is multiplied (dotted line) the potential increases from  $E_{MES,1}$  to  $E_{MES,2}$ . B) Scheme of an MES with different anode and cathode parts that can be connected together, or not, to control the working potential.**

To advance the snorkel design, ion transport in the vicinity of the snorkel should be modelled numerically in order to assess the potential distribution along the snorkel surface [25,26]. Such a calculation will help in the design of the optimal snorkel architecture. It can be anticipated that the snorkel will mainly be efficient in the vicinity of the interface between the anode and cathode zones [11]. Ion transport modelling should consequently be primarily helpful in determining the required snorkel length and the appropriate configuration on both sides of the interface. In combination with numerical modelling, fundamental studies with pure cultures should be helpful to decipher the MES mechanisms [11].

Snorkels can be made of a single conductive material, which is exposed to two zones that determine the cathode and anode areas (Fig. 1) [6–9,15–19]. In this case, the two zones are often not accurately delimited but correspond to the oxygen concentration gradient with depth. The biofilm must consequently catalyse organic matter oxidation when close to the

oxygenated zone. The emerging research on air-tolerant or aerobic microbial anodes [27,28] should be very helpful in optimizing such an MES. If the interface between the two zones varies, due to variable reactor filling or waves in a natural environment, the biofilm should be alternately electrogenic (anode) and electrotrophic (cathode). Recent research on reversible, also called bidirectional, microbial electrodes [29,30] should provide useful basic inputs.

MESs can also be designed by combining two materials, one promoting the formation of an anode and the other the formation of a cathode (Fig. 2) [2,5]. Nevertheless, so far, it has been necessary to locate each electrode in a zone with different chemical composition. This situation may be overcome, according to a recent study that has demonstrated that anodic or cathodic electroactive biofilms can be formed in exactly the same medium, at exactly the same potential, depending only on the electrode material [31]. On this basis, a new kind of MES can be imagined, which would be able to work in a single phase. This monophasic MES would have to couple two different conductive materials able to promote the development of an anode and a cathode in the same medium.

## 5. Conclusion

MESs have given rise to great expectations in many important application areas and real successes have started to appear. Despite this, the number of studies still remains very small. These early successes emphasise the urgent need for research endeavours in this field. The similarity of the concept with self-organized cable bacteria further adds to the belief that the guiding idea is solid and should lead to basic discoveries beyond the scope of the practical applications contemplated so far.

## Acknowledgements

This work was supported by the French Agence Nationale de la Recherche (ANR), within the framework of the Biotuba project (ANR-17-CE06-0015).

## References

- [1] H. Wang, Z.J. Ren, A comprehensive review of microbial electrochemical systems as a platform technology, *Biotechnol. Adv.* 31 (2013) 1796–1807, <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.10.001>.

- [2] B. Erable, L. Etcheverry, A. Bergel, From microbial fuel cell (MFC) to microbial electrochemical snorkel (MES): maximizing chemical oxygen demand (COD) removal from wastewater, *Biofouling* 27 (2011) 319–326, <https://doi.org/10.1080/08927014.2011.564615>.
- [3] C. Santoro, C. Arbizzani, B. Erable, I. Ieropoulos, Microbial fuel cells: from fundamentals to applications. A review, *J. Power Sources* 356 (2017) 225–244, <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2017.03.109>.
- [4] A. Bergel, L. Etcheverry, B. Erable, Procédé et équipement pour l'oxydation de matières organiques, FR 0850833 (2008).
- [5] Q. Yang, H. Zhao, H. Liang, Denitrification of overlying water by microbial electrochemical snorkel, *Bioresour. Technol.* 197 (2015) 512–514, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.127>.
- [6] C. Cruz Viggi, E. Presta, M. Bellagamba, S. Kaciulis, S.K. Balijepalli, G. Zanaroli, M. Petrangeli Papini, S. Rossetti, F. Aulenta, The “Oil-Spill Snorkel”: an innovative bioelectrochemical approach to accelerate hydrocarbons biodegradation in marine sediments, *Front. Microbiol.* 6 (2015) 881, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00881>.
- [7] B. Matturro, C. Cruz Viggi, F. Aulenta, S. Rossetti, Cable bacteria and the bioelectrochemical snorkel: the natural and engineered facets playing a role in hydrocarbons degradation in marine sediments, *Front. Microbiol.* 8 (2017) 952, , <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00952>.
- [8] A. Aguirre-Sierra, T. Bacchetti-De Gregoris, A. Berná, J.J. Salas, C. Aragón, A. Esteve-Núñez, Microbial electrochemical systems outperform fixed-bed biofilters in cleaning up urban wastewater, *Environ. Sci. Water Res. Technol.* 2 (2016) 984–993, <https://doi.org/10.1039/C6EW00172F>.
- [9] C. Cruz Viggi, B. Matturro, E. Frascadore, S. Insogna, A. Mezzi, S. Kaciulis, A. Sherry, O.K. Mejeha, I.M. Head, E. Vaiopoulou, K. Rabaey, S. Rossetti, F. Aulenta, Bridging spatially segregated redox zones with a microbial electrochemical snorkel triggers biogeochemical cycles in oil-contaminated River Tyne (UK) sediments, *Water Res.* 127 (2017) 11–21, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.10.002>.
- [10] Y. Wu, X. Jing, C. Gao, Q. Huang, P. Cai, Recent advances in microbial electrochemical system for soil bioremediation, *Chemosphere* 211 (2018) 156–163, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.07.089>.
- [11] W. Yan, Y. Xiao, W. Yan, R. Ding, S. Wang, F. Zhao, The effect of bioelectrochemical systems on antibiotics removal and antibiotic resistance genes: a review, *Chem. Eng. J.* 358 (2019) 1421–1437, <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.10.128>.
- [12] X. Dominguez-Benetton, J.C. Varia, G. Pozo, O. Modin, A. Ter Heijne, J. Fransaer, K. Rabaey, Metal recovery by microbial electro-metallurgy, *Prog. Mater. Sci.* 94 (2018) 435–461, <https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2018.01.007>.
- [13] C. Pfeffer, S. Larsen, J. Song, M. Dong, F. Besenbacher, R.L. Meyer, K.U. Kjeldsen, L. Schreiber, Y.A. Gorby, M.Y. El-Naggar, K.M. Leung, A. Schramm, N. Risgaard-Petersen, L.P. Nielsen, Filamentous bacteria transport electrons over centimetre distances, *Nature* 491 (2012) 218–221, <https://doi.org/10.1038/nature11586>.

- [14] D.R. Lovley, Live wires: direct extracellular electron exchange for bioenergy and the bioremediation of energy-related contamination, *Energy Environ. Sci.* 4 (2011) 4896–4906, <https://doi.org/10.1039/c1ee02229f>.
- [15] C.A. Ramírez-Vargas, C.A. Arias, L. Zhang, H. Brix, Microbial community function in electroactive biofilm-based constructed wetlands, *Biogeosci. Discuss.* (2018) 1–28, <https://doi.org/10.5194/bg-2018-428>.
- [16] C.A. Ramírez-Vargas, C.A. Arias, P. Carvalho, L. Zhang, A. Esteve-Núñez, H. Brix, Electroactive biofilm-based constructed wetland (EABB-CW): a mesocosm-scale test of an innovative setup for wastewater treatment, *Sci. Total Environ.* 659 (2019) 796–806, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.12.432>.
- [17] A. Prado, R. Berenguer, A. Esteve-Núñez, Electroactive biochar outperforms highly conductive carbon materials for biodegrading pollutants by enhancing microbial extracellular electron transfer, *Carbon* 146 (2019) 597–609, <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2019.02.038>.
- [18] Y. Yang, J. Guo, G. Sun, M. Xu, Characterizing the snorkeling respiration and growth of *Shewanella decolorationis* S12, *Bioresour. Technol.* 128 (2013) 472–478, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.103>.
- [19] A. Domínguez-Garay, J.R. Quejigo, U. Dörfler, R. Schroll, A. Esteve-Núñez, Bioelectroventing: an electrochemical-assisted bioremediation strategy for cleaning-up atrazine-polluted soils, *Microb. Biotechnol.* 11 (2017) 50–62, <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12687>.
- [20] C. Ramírez-Vargas, A. Prado, C. Arias, P. Carvalho, A. Esteve-Núñez, H. Brix, Microbial electrochemical technologies for wastewater treatment: principles and evolution from microbial fuel cells to bioelectrochemical-based constructed wetlands, *Water* 10 (2018) 1128, <https://doi.org/10.3390/w10091128>.
- [21] F. Mapelli, A. Scoma, G. Michoud, F. Aulenta, N. Boon, S. Borin, N. Kalogerakis, D. Daffonchio, Biotechnologies for marine oil spill cleanup: indissoluble ties with microorganisms, *Trends Biotechnol.* 35 (2017) 860–870, <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.04.003>.
- [22] H.-Y. Yu, Y. Wang, P. Chen, F. Li, M. Chen, M. Hu, X. Ouyang, Effect of nitrate addition on reductive transformation of pentachlorophenol in paddy soil in relation to iron(III) reduction, *J. Environ. Manag.* 132 (2014) 42–48, <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2013.10.020>.
- [23] B. Pandey, M. Fulekar, Bioremediation technology: a new horizon for environmental clean-up, *Biol. Med.* 4 (2012) 51–59.
- [24] J.R. Quejigo, U. Dörfler, R. Schroll, A. Esteve-Núñez, Stimulating soil microorganisms for mineralizing the herbicide isoproturon by means of microbial electroremediating cells, *Microb. Biotechnol.* 9 (2016) 369–380, <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12351>.
- [25] R. Lacroix, S. Da Silva, M.V. Gaig, R. Rousseau, M.-L. Délia, A. Bergel, Modelling potential/current distribution in microbial electrochemical systems shows how the optimal bioanode architecture depends on electrolyte conductivity, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 16 (2014) 22892–22902, <https://doi.org/10.1039/C4CP02177K>.

- [26] M. Olliot, S. Galier, H. Roux de Balman, A. Bergel, Ion transport in microbial fuel cells: key roles, theory and critical review, *Appl. Energy* 183 (2016) 1682–1704, <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2016.09.043>.
- [27] B. Erable, A. Bergel, First air-tolerant effective stainless steel microbial anode obtained from a natural marine biofilm, *Bioresour. Technol.* 100 (2009) 3302–3307, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.02.025>.
- [28] S. Chen, R.K. Brown, S.A. Patil, K.J. Huber, J. Overmann, U. Schröder, Aerobic microbial electrochemical technology based on the coexistence and interactions of aerobes and exoelectrogens for synergistic pollutant removal from wastewater, *Environ. Sci.* 5 (2019) 60–69.
- [29] E. Blanchet, S. Pécastaings, B. Erable, C. Roques, A. Bergel, Protons accumulation during anodic phase turned to advantage for oxygen reduction during cathodic phase in reversible bioelectrodes, *Bioresour. Technol.* 173 (2014) 224–230, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.09.076>.
- [30] Y. Jiang, R.J. Zeng, Bidirectional extracellular electron transfers of electrodebiofilm: mechanism and application, *Bioresour. Technol.* 271 (2019) 439–448, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.133>.
- [31] B. Erable, N. Byrne, L. Etcheverry, W. Achouak, A. Bergel, Single medium microbial fuel cell: stainless steel and graphite electrode materials select bacterial communities resulting in opposite electrocatalytic activities, *Int. J. Hydrog. Energy* 42 (2017) 26059–26067, <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.08.178>.



## ***Chapitre 2 : Matériels et méthodes***



# 1 Inocula et milieux de culture

## 1.1 Inocula

### 1.1.1 Boues activées

Pour les expériences réalisées dans des eaux usées naturelles, le milieu est inoculé avec 5% (v/v) de boues activées. Les boues activées sont prélevées dans le bassin d'aération de la station d'épuration de Castanet-Tolosan (31). Le taux de matière en suspension (MES) des boues est de  $10 \pm 1$  g/L, le taux de matières volatiles sèches (MVS) est de  $8,7 \pm 0,1$  g/L. Le rapport MES/MVS est de 0,85. Sauf précision contraire, l'inoculation n'a lieu qu'une fois en début d'expérience.

### 1.1.2 Lombricompost

Le lombricompost est un amendement organique issu de la transformation de compost par des vers de terre. Il a été utilisé comme inoculum à la suite des travaux de thèse de Diana Pocaznoi (Pocaznoi, 2012). Deux lombricomposts (Or Brun) ont été utilisés (Tableau 2.1) car le format et les caractéristiques ont changé au cours de la thèse. Ils sont définis comme « lombricompost 2018 » et « lombricompost 2020 ».

Le lombricompost 2018 est utilisé dans la préparation de lixiviat de terreau comme décrit dans la partie 1.1.2.

Le lombricompost 2020 est utilisé comme inoculum de la même façon que les boues activées. L'inoculum est alors un mélange composé d'un volume du lombricompost 2020 pour 15 volumes de terreau de jardin (Or brun), suivant les conseils du fournisseur. Les réacteurs contiennent 5% (v/v) d'inoculum pour reproduire les conditions d'inoculation avec les boues activées.

Tableau 2.1 : Composition et caractéristiques des lombricompost Or Brun achetés en 2018 et 2020.

Date d'achat	Composition	Caractéristiques (*en% massique de produit brut)
2018	Fumiers de bovin lombricompostés	Matière sèche : 44* Matière organique : 26* Azote total : 0,65* Azote organique non uréique : 0,6* Rapport C/N total : 20
2020	Fumiers de bovin et/ou fumiers de cheval lombricompostés	Matière sèche : 55* Matière organique : 20* Azote total : 1,1* Azote organique non uréique : 1* Rapport C/N total : 9

## 1.2 Milieux de culture

### 1.2.1 Lixiviat de terreau

Le lixiviat de terreau est une préparation servant à la fois de milieu de culture et d'inoculum. Sa méthode de préparation est décrite dans la thèse de Manon Oliot (2017). Un mélange composé de 1,5 L de lombricompost 2018 (Tableau 2.1) de la marque Or brun et de 2,25 L d'une solution de KCl 60 mM est mis en agitation pendant une nuit à température ambiante. Il est ensuite filtré à l'aide d'un textile en coton à large maille (serpillère). Le lixiviat de terreau préparé a une conductivité de 0,8 à 1 S/m et un pH d'environ 7.6. Le milieu lixiviat de terreau est supplémenté de 20 mM d'acétate servant de substrat.

### 1.2.2 Eaux usées naturelles

L'objectif de la thèse étant de traiter des eaux usées domestiques, la majorité des expériences est réalisée à partir d'eaux résiduaires urbaines (ERU) provenant de la station

d'épuration (STEP) de Castanet-Tolosan (31). Les ERU sont collectées directement après le poste de prétraitements. La matière organique est donc apportée directement par les eaux usées. Aucun apport de substrat synthétique n'est effectué au cours des expériences. Les eaux usées sont stockées à 4 °C jusqu'à leur utilisation. Dans les eaux usées de la STEP de Castanet, la DCO totale moyenne est de  $760 \pm 100$  mg d'O<sub>2</sub>/L et la DCO soluble moyenne est de  $180 \pm 20$  mg d'O<sub>2</sub>/L. Le pH moyen des eaux usées est de  $7,2 \pm 0,8$  et leur conductivité est de 0,14 S/m. La concentration en oxygène dissous dans les eaux usées est proche de 0 car l'oxygène qui se solubilise est consommé instantanément par les bactéries aérobies en solution.

Lorsque c'est indiqué, les eaux usées sont hydrolysées avant leur utilisation. L'hydrolyse de la matière organique augmente la proportion de DCO soluble (DCO<sub>s</sub>). Pour cela, les eaux usées sont placées dans des flacons en verre de 2 L, le milieu et le ciel gazeux des flacons sont désoxygénés par un bullage d'azote de 10 minutes et les flacons sont fermés hermétiquement. La réaction d'hydrolyse consiste en la rupture de liaisons covalentes des molécules organiques par les molécules d'eau. Cette réaction spontanée conduit à la formation de plus petites molécules augmentant ainsi la DCO<sub>s</sub> du milieu. Après une semaine d'hydrolyse les DCO<sub>s</sub> sont de  $400 \pm 40$  mg d'O<sub>2</sub>/L.

### 1.2.3 Eaux usées synthétiques

Des eaux usées synthétiques ont été utilisées pour deux raisons, la première étant d'opérer dans un milieu contrôlé pour mieux caractériser le système, la deuxième est liée à la pandémie de la COVID-19 qui n'a pas permis de réaliser toutes les expériences en eaux usées réelles. Les eaux usées synthétiques ont la composition suivante :

- Peptone, 160 mg/L ;
- Extrait de viande, 110 mg/L ;
- Urée, 30 mg/L ;
- Hydrogénophosphate de potassium anhydre (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), 28 mg/L ;
- Chlorure de sodium (NaCl), 7 mg/L ;
- Carbonate de calcium dihydraté (CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O), 4 mg/L ;
- Sulfate de magnésium heptahydraté (Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O), 2 mg/L ;
- Acétate, 20mM.

### 1.2.4 Milieux abiotiques

Deux milieux abiotiques sans inoculum ont été utilisés. Pour certains contrôles, il s'agit seulement d'eau dont la conductivité a été ajustée à celle des eaux usées réelles (0,14 S/m) par ajout de KCl. Pour d'autres expériences, c'est un tampon phosphate 10 mM, pH 7,4, dont la conductivité a été ajustée à 0,2 ou 1,2 S/m par ajout de KCl.

## 2 Dispositifs expérimentaux

### 2.1 Réacteurs électrochimiques

#### 2.1.1 Réacteurs « standards »

Toutes les expériences avec un montage à trois électrodes (partie 2.2 de ce chapitre) sont réalisées dans des réacteurs dits « standards ». Seules les caractéristiques et le positionnement des électrodes varient selon les configurations décrites par la suite. Les réacteurs « standards » sont des flacons Schott de 700 mL à col large (Figure 2.1), modifiés par l'ajout de deux piquages GL18 sur les flancs. Lorsque la recirculation est mise en place, le volume maximum du réacteur, conditionné par le piquage GL18 du haut, est de 500 mL. Lors des expériences en batch, ces réacteurs peuvent contenir jusqu'à 700 mL de milieu.

Le réacteur peut être utilisé avec le bouchon. Les quatre piquages GL18 du bouchon sont utilisés pour l'électrode de référence ECS, l'électrode de travail, la contre-électrode, le bullage et/ou les prélèvements en cours d'expérience.

Pour certains essais, un bullage d'air ou d'azote a été mis en place dans le réacteur. Le cas échéant, le positionnement, la durée ou la fréquence de bullage sont précisés dans la description de chaque essai.

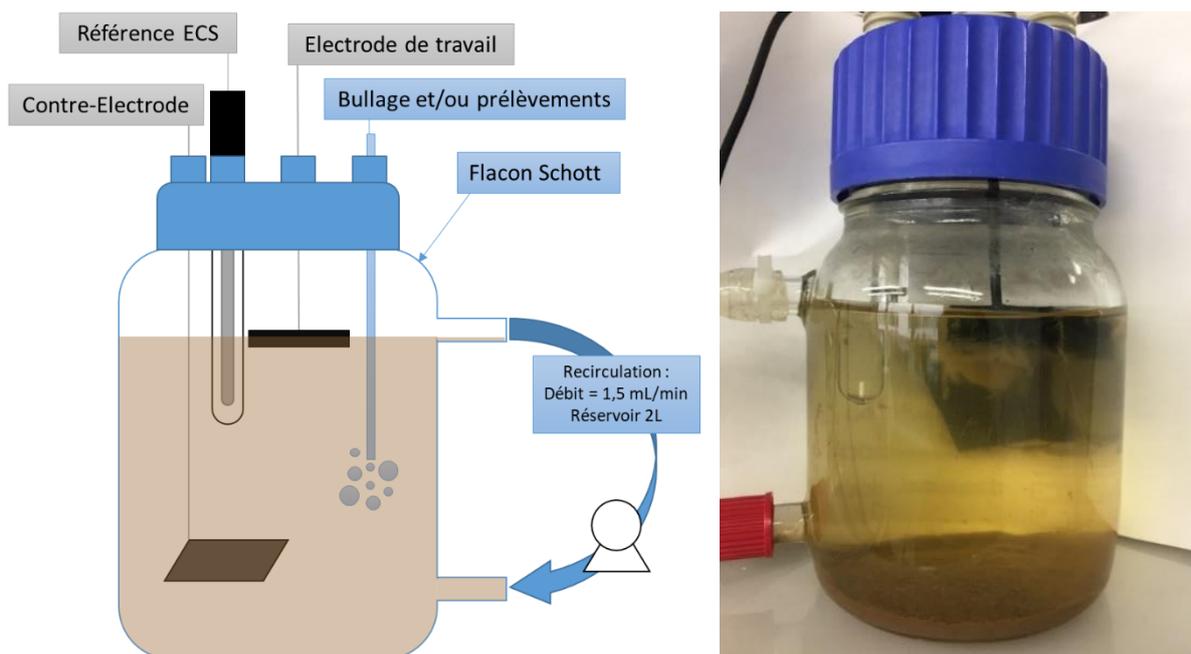


Figure 2.1 : Schéma et photographie d'un exemple de montage à trois électrodes avec électrode à l'interface (partie 2.1.1 de ce chapitre) dans un réacteur « standard » en recirculation.

Ces réacteurs ont aussi été utilisés sans bouchon afin de laisser dépasser une partie de l'électrode pour les montages électrochimiques à trois électrodes comprenant une électrode capillaire émergée (parties 2.2.4 et 2.2.5 de ce chapitre).



Figure 2.2 : Photographie du montage d'électrodes capillaires émergées 1 (partie 2.1.4 de ce chapitre) dans des réacteurs « standards » en batch.

### 2.1.2 Biotuba\_26 et Biotuba\_48

Les deux types de réacteurs conçus pour accueillir les biotubas sont nommés Biotuba\_26 et Biotuba\_48 d'après la hauteur maximale d'électrode dont ils peuvent être équipés (26 et 48 cm). Le Biotuba\_26 est un réacteur en verre d'un diamètre de 4 cm et d'un volume (sans électrode) de 350 mL. Les réacteurs étaient remplis de 27 cm de solution, laissant 1 cm de milieu au-dessus des plus grandes électrodes utilisées. Deux piquages GL18 permettent la recirculation de la solution.

Les réacteurs Biotuba\_48 sont construits sur le même modèle que les Biotuba\_26. Ils sont plus hauts et légèrement plus étroits, 3 cm de diamètre au lieu de 4. Ils permettent d'accueillir 50 cm de solution et sont utilisés avec un biotuba de 48 cm, laissant 2 cm de solution au-dessus du biotuba. Ils présentent aussi deux piquages GL18 pour permettre la recirculation de la solution et deux piquages supplémentaires proche de la mi-hauteur pour des prélèvements.

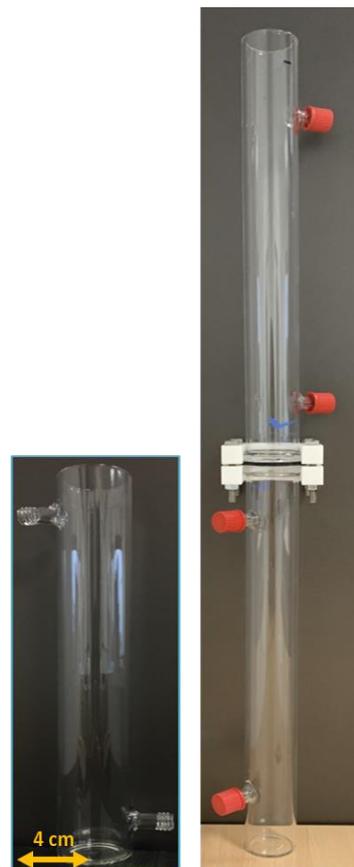


Figure 2.3 : Photographies des (gauche) Biotuba\_26 et (droite) Biotuba\_48.

De la même façon que pour les réacteurs « standards », un bullage d'air est parfois réalisé dans les réacteurs Biotuba\_26 et Biotuba\_48. Cette aération peut être continue ou séquentielle, et placée à différentes hauteurs du réacteur. Les conditions d'aération sont précisées dans les chapitres suivants dans la description des essais.

### 2.1.3 Recirculation

Les expériences sont réalisées soit en mode batch, soit avec une recirculation. La recirculation est réalisée avec une pompe péristaltique Masterflex® L/S® Precision (Cole-Parmer, USA) réglée à la vitesse de 25 rpm et équipée de quatre têtes de pompe Easy-Load® Masterflex® L/S® (Cole-Parmer, USA). Le réservoir est un flacon Schott de 2 L. La pompe est

placée entre la sortie du réservoir et l'entrée du réacteur, la sortie du réacteur vers le réservoir se fait par surverse (Figure 2.4). Le tuyau du réservoir à la pompe et de la pompe au réacteur est un tuyau Tygon® S3 E-3603 (Saint-Gobain, France) avec un diamètre interne de 4,8 mm et externe 8 mm. Celui du réacteur au réservoir (sortie) est du même type mais avec un diamètre interne de 8 mm et externe 12 mm. Enfin, 15 cm de tuyau Masterflex® Puri-flex L/S® 13 (Cole-Parmer, USA) d'un diamètre interne de 0,8 mm sont utilisés au niveau de la pompe pour assurer une recirculation à 1,5 mL/min à la vitesse de la pompe de 25 rpm.

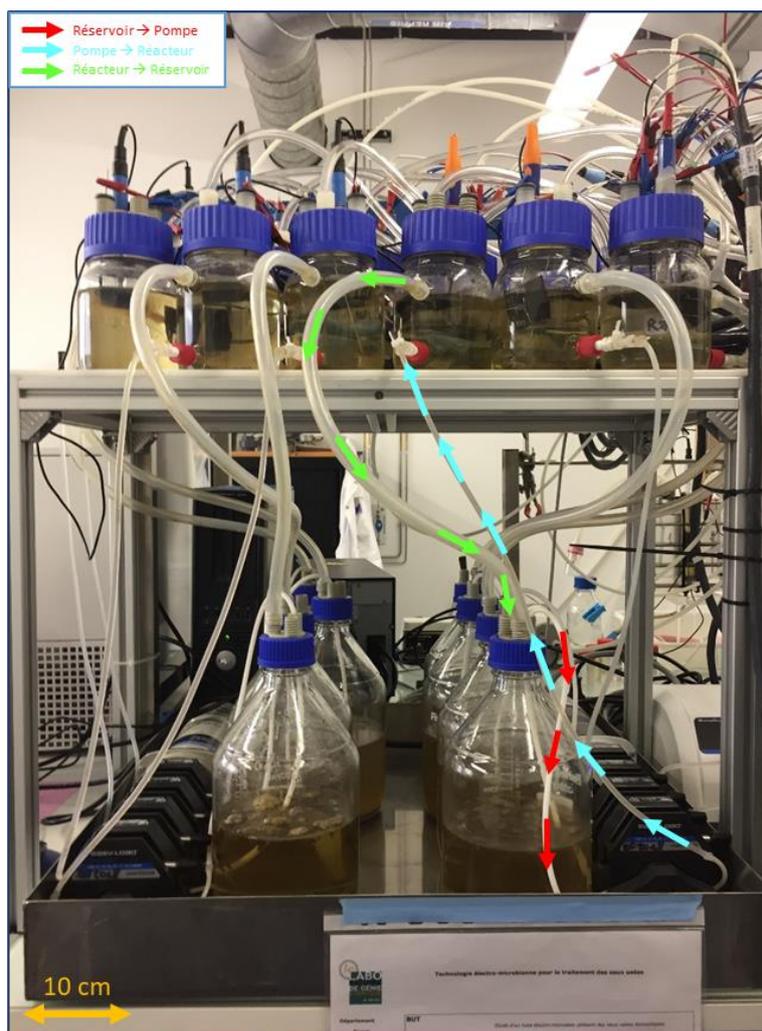


Figure 2.4 : Photographie du montage en recirculation avec des réacteurs « standards ».

Le même type de montage en recirculation est réalisé avec les réacteurs Biotuba\_26 et Biotuba\_48, comme présenté sur les Figure 2.5 et Figure 2.6. Les tuyaux, la pompe, le réservoir et la vitesse de recirculation sont identiques, quel que soit le réacteur utilisé.



Figure 2.5 : Photographies du montage expérimental, (à gauche) le montage complet en recirculation et (à droite) un zoom sur les réacteurs Biotuba\_26.

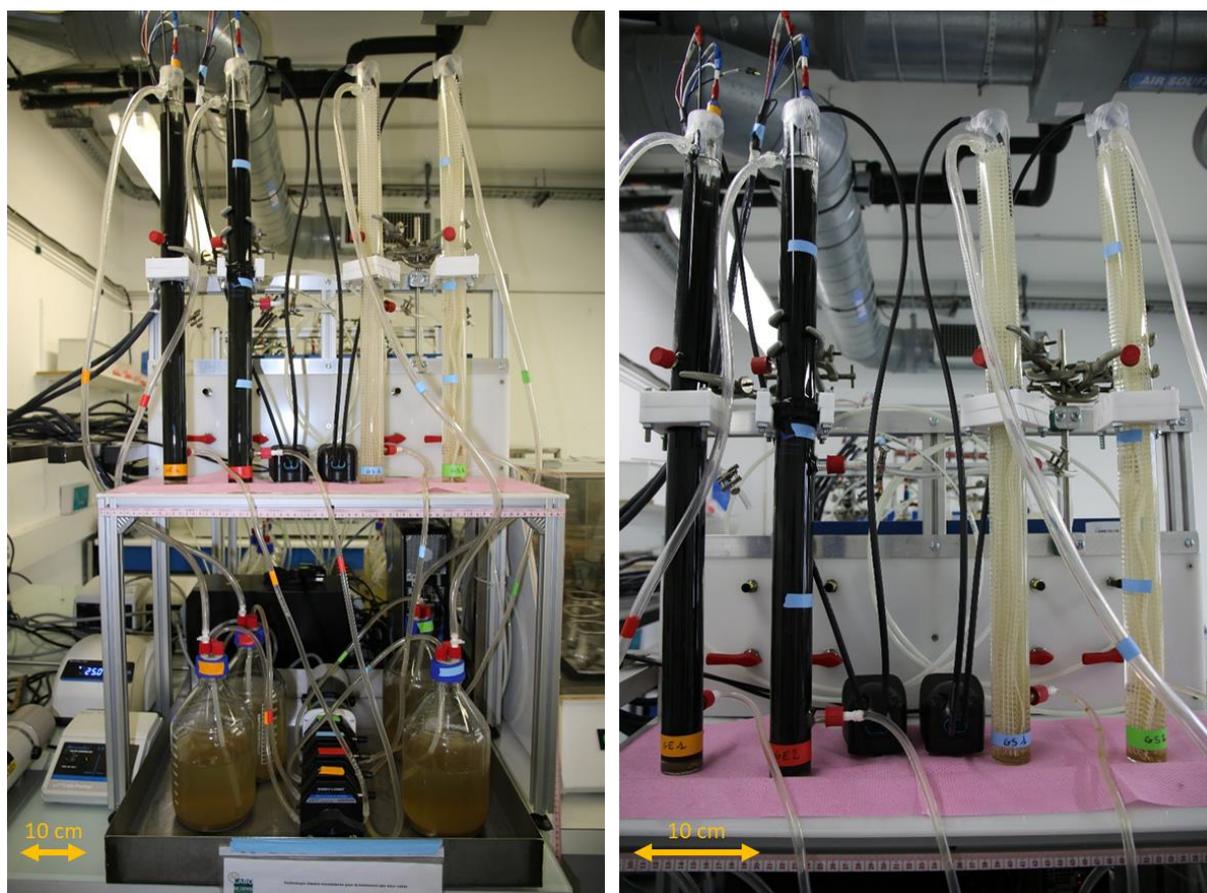


Figure 2.6 : Photographies du montage expérimental, (à gauche) le montage complet en recirculation et (à droite) un zoom sur les réacteurs Biotuba\_48.

## 2.2 Montages électrochimiques à trois électrodes

Certaines expériences ont été réalisées avec des montages à trois électrodes afin d'étudier les parties anodique et cathodique séparément. Ces montages comprennent l'électrode de travail où se développe le biofilm électroactif, la contre-électrode et l'électrode de référence dont le potentiel reste fixe.

Pour toutes les expériences, l'électrode de référence est une électrode au calomel saturée ou ECS (Sentek, Australie) dont le potentiel est de +0,248 V par rapport à une électrode standard à hydrogène à 20°C. Le potentiel des électrodes de référence est vérifié par rapport à une ECS neuve (référence des références) régulièrement aux cours des expériences. Si nécessaire, la solution de KCl saturée est renouvelée. Dans le réacteur, l'électrode de référence au calomel saturée est placée entre l'électrode de travail et la contre-électrode, le plus proche possible de l'électrode de travail.

Les électrodes peuvent être de plusieurs formes ou types selon les expériences réalisées. Elles peuvent être planes ou circulaires, en métal (titane ou platine) ou en matériaux carbonés (feutre ou tissu de carbone). Les différentes électrodes utilisées avec leur connexion électrique (fil de titane ou de platine) sont visibles sur la photographie ci-dessous (Figure 2.7) et décrites dans les sous-parties suivantes.

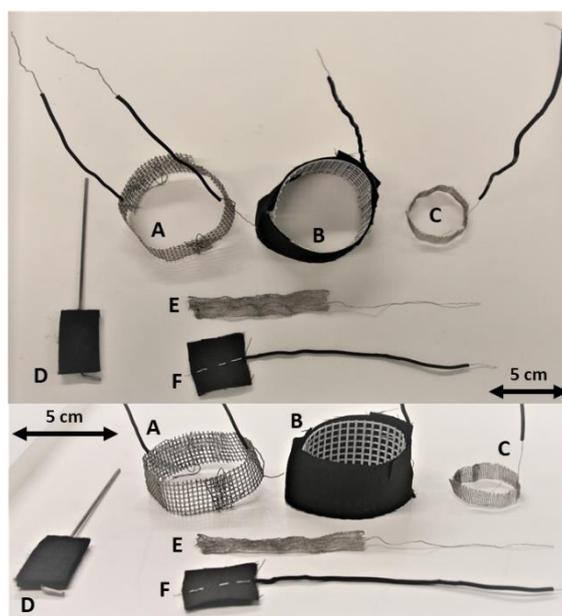


Figure 2.7 : Photographie des différents types d'électrodes utilisés. (A) Grille en acier circulaire, (B) Tissu de carbone circulaire + fil de platine, (C) grille circulaire en platine, (D) feutre de carbone + tige en titane, (E) Grille en platine plane, (F) tissu de carbone + fil de platine.

### 2.2.1 Electrode à l'interface

Lorsqu'il s'agit de favoriser le transport de l'oxygène vers l'électrode, l'électrode de travail est placée horizontalement au niveau de la surface libre de la solution (Figure 2.8). L'électrode de travail est constituée de 8 ou 9 cm<sup>2</sup> de feutre de carbone (2 x 4 ou 3 x 3 cm, 1 cm d'épaisseur) (RVG 4000, Mersen, France). Pour la première expérience uniquement la connexion électrique est réalisée avec un fil de platine. La connexion a été ensuite améliorée en utilisant une tige en titane (Ø 1mm). La contre-électrode est un tissu de carbone connecté avec un fil de platine.

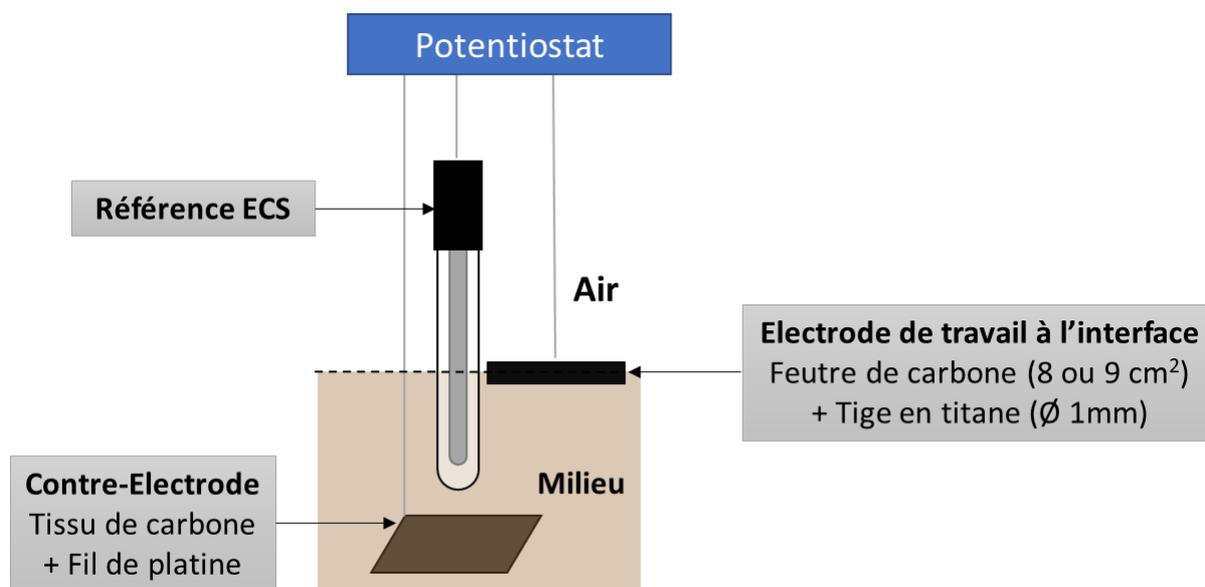


Figure 2.8 : Schéma du positionnement des électrodes pour l'électrode à l'interface.

### 2.2.2 Electrode immergée 1

Le premier type de montage incluant une électrode immergée, comprend une électrode de travail constituée de 9 cm<sup>2</sup> de tissu de carbone (3 x 3 cm) (PaxiTech SAS, France) connectée avec un fil de platine (Figure 2.9). La contre-électrode est une grille de platine plane également connectée avec un fil de platine.

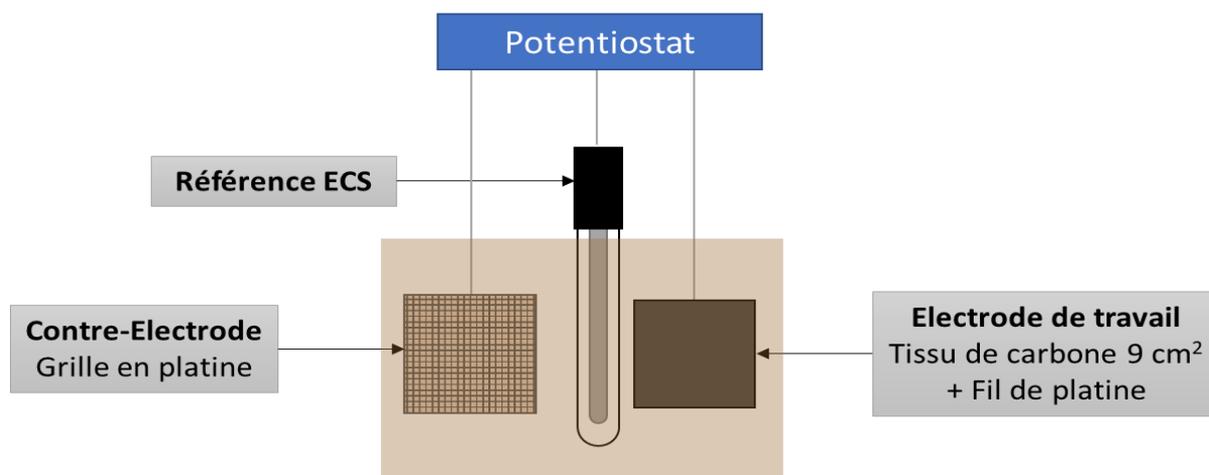


Figure 2.9 : Schéma du positionnement des électrodes pour le montage « électrode immergée 1 ».

### 2.2.3 Electrode immergée 2

Le second type de montage à trois électrodes avec électrode immergée comprend une électrode de travail en feutre de carbone (RVG 4000, Mersen, France) mesurant 5 x 2 cm et connecté avec une tige en titane ( $\varnothing$  1mm). Ce feutre de carbone, d'une épaisseur de 0,5 cm, sera utilisé pour tous les essais ultérieurs, y compris dans les biotubas. La contre-électrode est un feutre de carbone monté de façon circulaire sur un support constitué d'une grille en plastique, et connecté par un fil de platine.

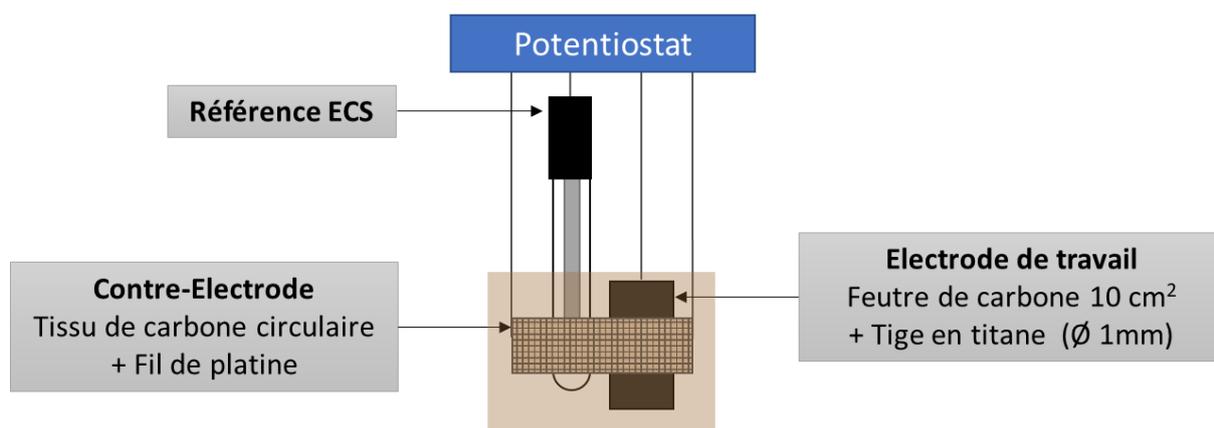


Figure 2.10 : Schéma du positionnement des électrodes pour le montage « électrode immergée 2 ».

### 2.2.4 Electrode capillaire émergée 1

D'autres dispositifs à trois électrodes comprennent une électrode de travail partiellement émergée. Une configuration destinée à comparer deux hauteurs d'électrodes émergées comprend des électrodes de travail en feutre de carbone mesurant 1 x 5 cm ou 20 x 5 cm et connectées avec une tige en titane. L'électrode de travail de petite taille est immergée totalement (Figure 2.11A) et la grande n'est immergée que de 1 cm (Figure 2.11B). La contre-électrode est un feutre de carbone monté de façon circulaire sur un support constitué d'une grille en plastique et connecté par un fil de platine.

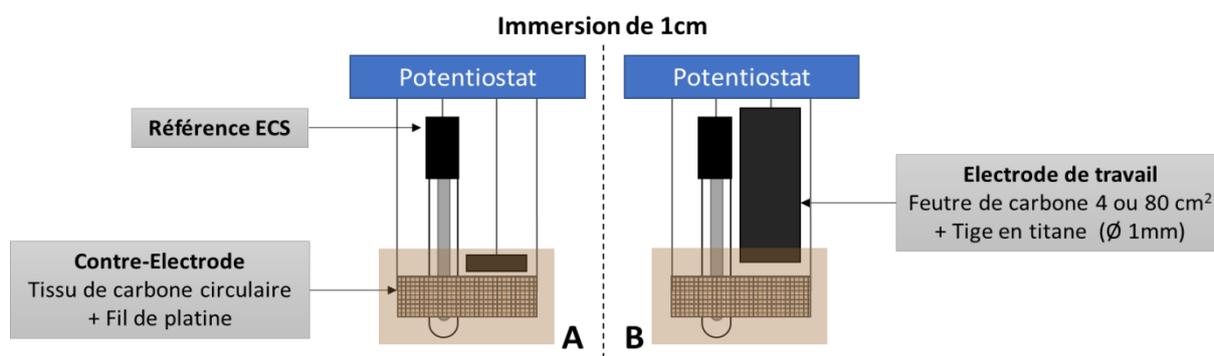


Figure 2.11 : Schéma du positionnement des électrodes pour le montage « électrode capillaire émergée 1 ».

### 2.2.5 Electrode capillaire émergée 2

Pour le second montage avec électrode capillaire émergée, l'électrode est aussi en feutre de carbone connecté avec une tige en titane (Figure 2.12A). Cette fois le feutre mesure 5 cm x 2 cm et est en position verticale afin d'être immergé à différentes hauteurs : 0,5 cm, 2,5 cm et immersion complète (Figure 2.12B). La contre-électrode est une grille circulaire en acier inoxydable.

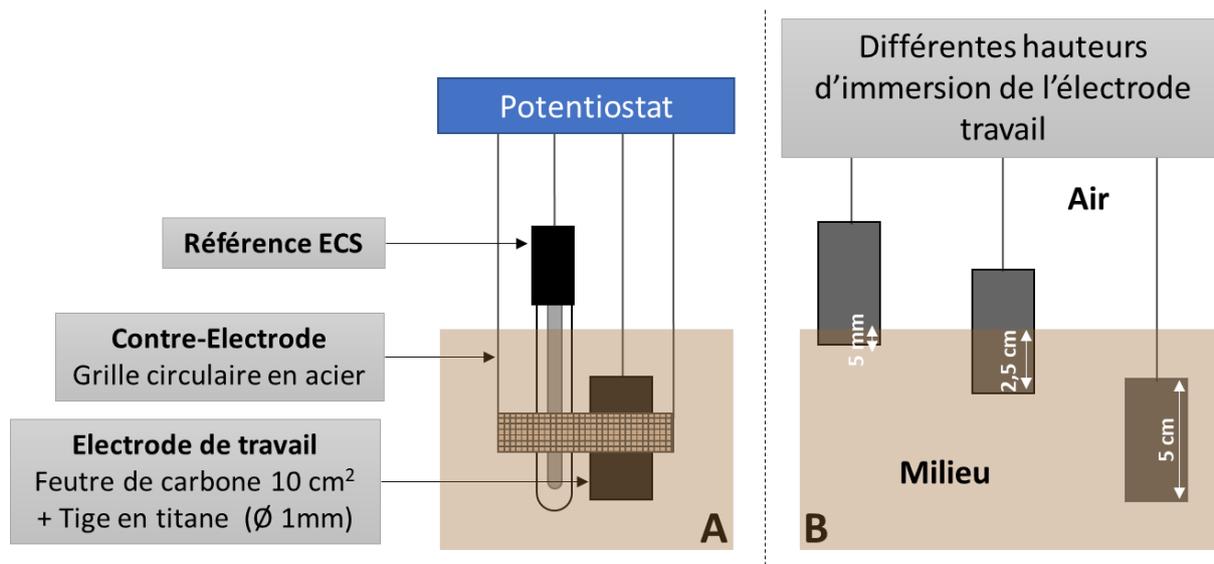


Figure 2.12 : Schéma du positionnement des électrodes pour le montage « électrode capillaire émergée 2 ».

## 2.3 Montage électrochimique de type biotuba

Pour les biotubas, le terme d'électrode de travail ne sera pas ou peu employé car, d'un point de vue rigoureux, le biotuba n'est pas constitué d'une électrode mais deux électrodes en court-circuit. Le potentiostat est alors utilisé uniquement pour mesurer le potentiel en circuit ouvert, ou potentiel mixte, du biotuba par rapport à l'électrode de référence ECS. Il n'y a pas dans ce cas de contre-électrode, sauf pour un essai particulier précisé par la suite.

Le biotuba est constitué de deux lanières de feutre de carbone assemblées l'une avec l'autre en forme de croix. Une tige en titane centrale renforce la structure et assure la connexion électrique (Figure 2.13). Dans le réacteur, la partie basse du feutre, immergée et non aérée, constitue la zone anodique (anaérobie) et la partie haute, émergée ou aérée, la zone cathodique. Lorsque précisé, une structure en grille de plastique de la même forme et de la même taille que l'électrode est utilisée dans les réacteurs de contrôle.

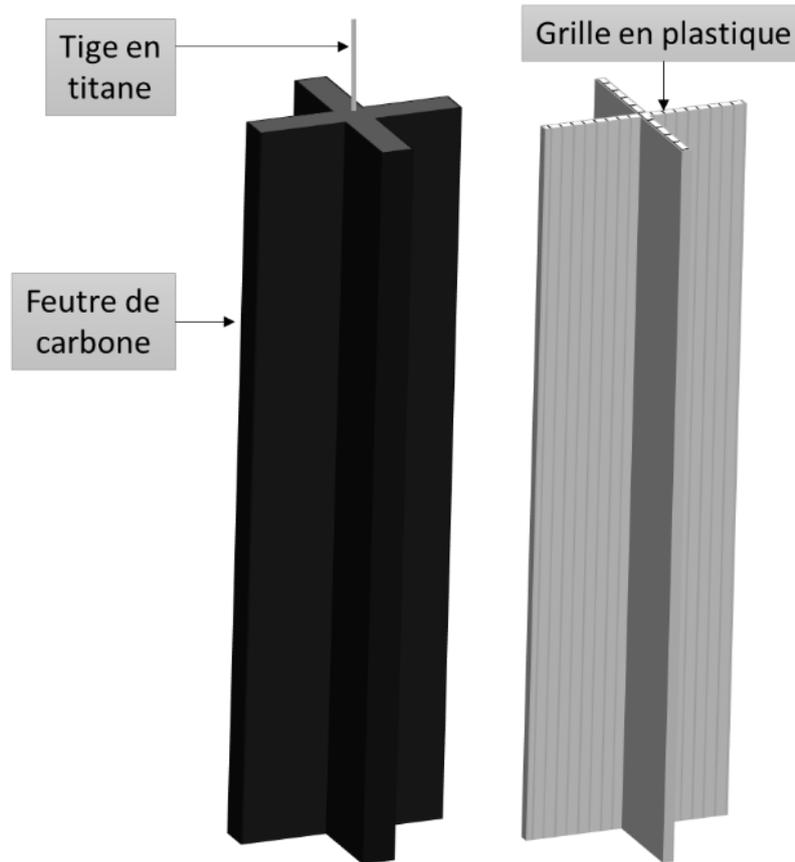


Figure 2.13 : Schéma de la structure du biotuba et du contrôle.

Différentes tailles d'électrodes sont utilisées selon le réacteur, « Biotuba\_26 » ou « Biotuba\_48 », décrits dans la partie 2.1.2 de chapitre.

Dans les réacteurs Biotuba\_26, les lanières de feutre mesurent chacune 4 cm de large et 0,5 cm d'épaisseur pour une hauteur variant de 18 à 26 cm en fonction des essais. Dans les Biotuba\_48 moins larges et plus hauts, les lanières mesurent chacune 3 x 48 x 0,5 cm pour tous les essais.

Pour un essai uniquement, un montage à trois électrodes a aussi été réalisé dans deux Biotuba\_26. Dans cette expérience, le biotuba est alors l'électrode de travail et une contre-électrode est ajoutée. La contre-électrode est une grille de platine circulaire, placée en haut du réacteur (Figure 2.14).

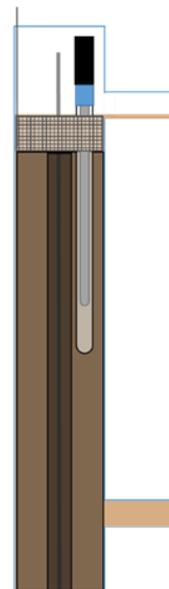


Figure 2.14 : Schéma du « Biotuba » polarisé.

Les biotubas peuvent être complètement immergés dans le milieu de culture ou partiellement émergés. Les biotubas avec électrode capillaire émergée sont mis en place dans les réacteurs Biotuba\_26. La partie immergée peut alors être de 18 cm ou de 14 cm et la partie émergée varie de 4 à 12 cm (Figure 2.15). Les conditions d'émergence relatives à chaque essai sont précisées dans les chapitres concernés.

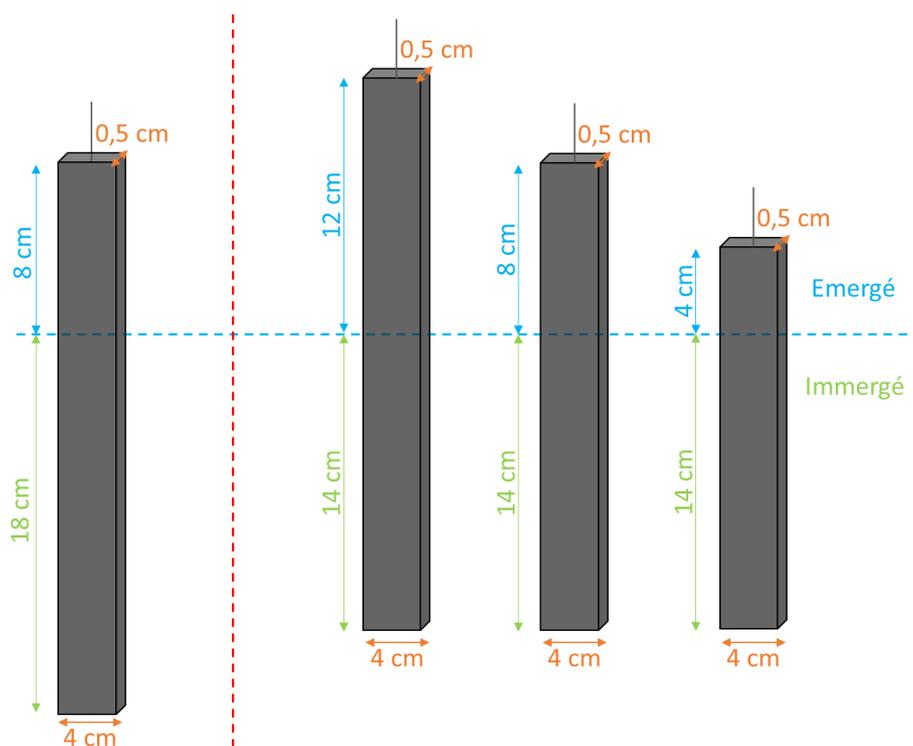


Figure 2.15 : Schéma des différentes conditions d'émergence des biotubas avec électrode capillaire émergée.

## 3 Techniques d'analyse

### 3.1 Techniques électrochimiques

Un potentiostat multi-canaux de type MPG (BioLogic SA, France) piloté par le logiciel d'exploitation EClab (version 10.2) a été utilisé pour l'ensemble des travaux.

#### 3.1.1 Chronoampérométrie

La principale technique utilisée avec les montages à trois électrodes est la chronoampérométrie (CA). Le potentiel imposé est constant avec une valeur de -0,2 ou -0,1 V

vs ECS. La réponse du système se mesure sous la forme de l'intensité du courant produit en fonction du temps. L'intensité du courant est le plus souvent transformée en densité de courant ( $A/m^2$ ) en la divisant par la surface projetée de l'électrode de travail. Nous entendons par surface projetée la surface d'une seule face.

### 3.1.2 Suivi du potentiel en circuit ouvert

Le potentiel en circuit ouvert (*Open Circuit Potential*, OCP) est mesuré entre l'électrode ou le biotuba et l'électrode de référence ECS. Dans ce cas, le potentiostat n'impose aucun potentiel et n'est utilisé que comme un voltmètre à haute impédance d'entrée. Les expériences durant plusieurs jours, l'enregistrement d'une mesure toutes les 10 min et suffisante pour éviter la manipulation de fichiers trop lourds.

### 3.1.3 Voltammétrie cyclique

La voltammétrie cyclique (*Cyclic Voltammetry*, CV) consiste à faire varier le potentiel de l'électrode de travail entre deux bornes, successivement dans le sens de la réduction et dans le sens de l'oxydation. Pour chaque CV, trois cycles sont réalisés. La réponse obtenue pour le premier cycle est souvent un peu différente des suivantes. Les deux cycles suivants sont généralement identiques, c'est le second cycle qui est représenté dans les chapitres suivants. Les bornes de potentiel et la vitesse de balayage pour chaque type d'expérience sont indiquées dans les parties concernées.

Les CVs peuvent être exploitées pour mesurer le courant capacitif ( $I_{cap}$ ) délivré par une électrode et en extraire la capacité de double couche (Cdl) de l'interface électrode-solution. La différence de courant  $\Delta I$  entre l'aller et le retour du balayage (Figure 2.16) est égale à deux fois le courant capacitif :

$$\Delta I = 2I_{cap} \quad (1)$$

La densité de courant capacitif ( $A/m^2$ ), divisée par la vitesse de balayage  $v$  (V/s) donne la capacité de double couche ( $F/m^2$ ) :

$$I_{cap} = C_{dl} \cdot v \quad (2)$$

Les CVs doivent être enregistrées avec plusieurs vitesses de balayage des potentiels afin d'avoir une évaluation sûre de la capacité de double couche.

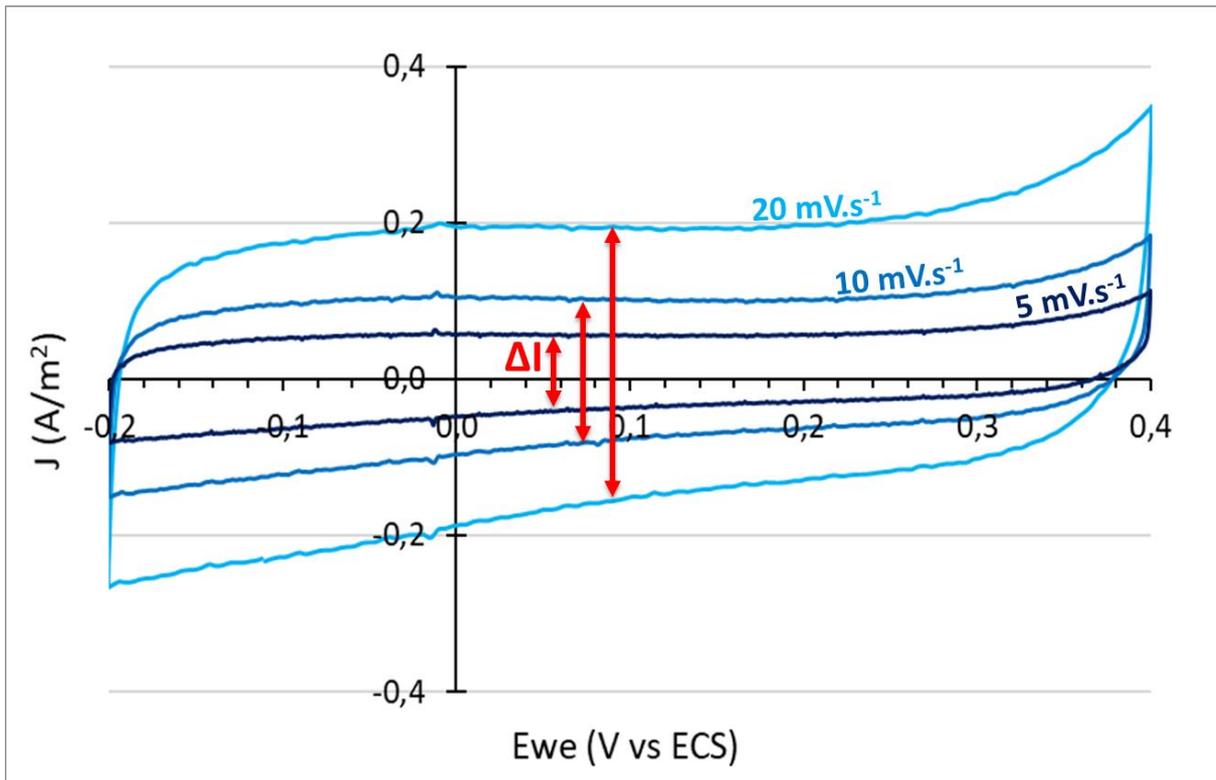
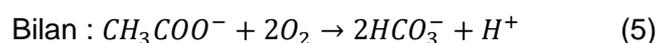
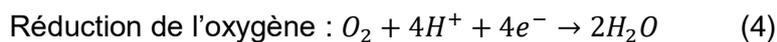
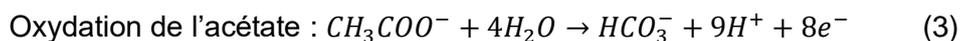


Figure 2.16 : Exemple de CVs à 5, 10 et 20 mV/s utilisées pour le calcul de la Cdl.

## 3.2 Techniques physico-chimiques

### 3.2.1 DCO

La DCO, ou Demande Chimique en Oxygène, mesurée en mg d'O<sub>2</sub>/L, représente la quantité d'oxygène nécessaire pour oxyder la matière organique présente dans l'échantillon. Il s'agit donc d'une mesure indirecte de la concentration en matière organique du milieu. Les réactions de dégradation de la matière organique par l'oxygène peuvent être écrites en utilisant l'acétate comme molécule modèle :



La DCO totale (DCO<sub>T</sub>) prend en compte toute la matière organique du milieu. La DCO<sub>T</sub> inclut la DCO soluble (DCO<sub>S</sub>) et la DCO particulaire (DCO<sub>P</sub>). La DCO<sub>P</sub> est constituée de molécules difficilement biodégradables ou inertes. La DCO<sub>S</sub>, constituée de petites molécules organiques telles que l'acétate ou le formiate, est facilement dégradable et assimilable par les

bactéries. La mesure de DCO<sub>s</sub> est réalisée en filtrant l'échantillon avec un filtre seringue possédant une membrane en acétate de cellulose dont les pores ont un diamètre de 0,22 µm.

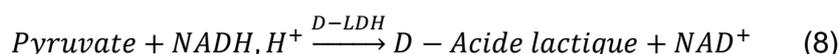
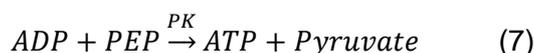
Les mesures de DCO sont réalisées avec les microkits Hach Lange LCK 514 pour une concentration allant de 100 à 2 000 mg d'O<sub>2</sub>/L et LCK 314 pour des concentrations allant de 15 à 150 mg d'O<sub>2</sub>/L. Le cycle de chauffe HT15', comprenant 15 minutes à 170°C est réalisé dans un four HT200S (Hach Lange, USA) et la lecture est réalisée grâce au spectrophotomètre DR 3900 (Hach Lange, USA). Cette méthode est utilisée pour tous les milieux (eaux usées synthétiques ou réelles).

La détermination de la concentration en acétate se fait à partir de l'équation de la réaction d'oxydation de l'acétate (5) qui indique qu'il faut 64 mg d'O<sub>2</sub> pour oxyder 1 mmol d'acétate. Une concentration de 1 mM d'acétate correspond donc à une DCO de 64 mg d'O<sub>2</sub>/L.

### 3.2.2 Acétate

Le kit enzymatique K-ACETAK (Megazyme, Libios, France) a été utilisé pour le dosage de l'acétate. Ce kit est composé de trois solutions : une solution tampon (pH 7.4), une solution de cofacteur NADH, d'adénosine triphosphate (ATP) et de phosphoénolpyruvate (PEP) et une solution d'enzymes contenant de l'acétate kinase (AK), de la pyruvate kinase (PK) et de la D-lactate déshydrogénase (D-LDH).

Le dosage se fait grâce à trois réaction successives : (6) l'échange d'un groupement phosphate entre l'acide acétique et l'ATP, formant l'acétylphosphate et l'ADP ; (7) l'ADP récupère ensuite un groupement phosphate du PEP, formant de l'ATP et du pyruvate ; (8) le pyruvate est hydrogéné en acide lactique par le cofacteur NADH, H<sup>+</sup>.



Après 10 minutes de réaction, l'absorbance à 340 nm est mesurée avec un spectromètre Jenway 7315 (Cole-Parmer, USA). Cette mesure correspond à la quantité restante en NADH et est inversement proportionnelle à la quantité d'acétate dosée. L'étalonnage est effectué à partir de solutions d'acétate de sodium de concentrations croissantes de 0 à 4 mM (Figure 2.17).

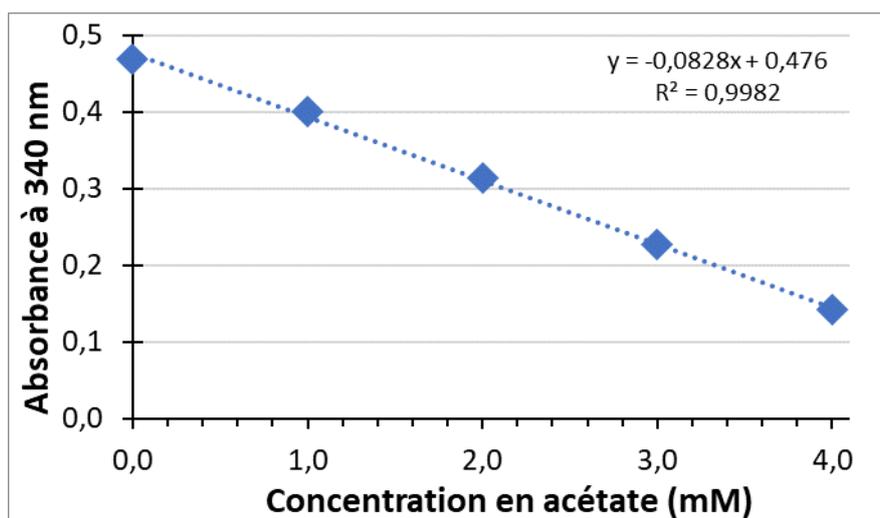


Figure 2.17 : Exemple de gamme étalon obtenue pour le dosage de l'acétate à l'aide du kit enzymatique K-ACETAK (Libios).

### 3.2.3 MES et MVS

Pour caractériser les boues activées de la STEP de Castanet, des mesures de MES et MVS ont été réalisées selon la méthode suivante. En amont de la mesure les cristallisoirs sont placés à 105°C puis dans un dessiccateur. L'échantillon de 50 mL de boues activées est placé dans un tube Falcon puis centrifugé à 4600 rpm pendant 15 minutes dans une centrifugeuse Megafuge 40R (Thermo Scientific, USA). Le culot est placé dans un cristallisoir à 105°C pendant 24 heures. La masse pesée après 24 heures correspond aux MES. Les échantillons sont alors placés à 550°C pendant 2 heures afin d'obtenir la mesure de MVS.

### 3.2.4 pH, conductivité et oxygène dissous

Le pH est mesuré avec un pH-mètre Cyberscan pH 6500 (Thermo Scientific Eutech Instruments, USA) et la conductivité avec un conductimètre portatif Ecoscan Con 6 (Thermo Scientific Eutech Instruments, USA).

Les mesures d'oxygène dissous dans les réacteurs standards sont réalisées avec un oxymètre muni d'une sonde optique Multi 3410 (WTW GmbH, Allemagne).

La concentration en oxygène dissout dans les biotubas est mesurée grâce à un système Presens. Des capteurs (SP-PSt3-SA23-D5-YOP-US) sous forme de pastilles sont collés sur la paroi interne du réacteur, à différentes hauteurs. La lecture se fait à travers la

paroi en verre grâce à une fibre optique reliée à un boîtier Fibox 4 (Presens). Ce système permet des mesures non invasives.

### 3.3 Techniques d'observation

#### 3.3.1 Microscopie à épifluorescence

Pour permettre une observation au microscope à épifluorescence, les échantillons d'électrode ou de biotuba sont marqués à l'acridine orange 0,01% (A6014, Sigma). Cet intercalant ADN, lorsqu'il est irradié avec un faisceau de longueur d'onde 520 nm, fait fluorescer le biofilm. L'échantillon et la solution d'acridine orange sont mis en contact pendant 10 minutes. L'échantillon est ensuite soigneusement rincé avec du milieu physiologique puis laissé sécher à l'air libre et à l'abri de la lumière pendant 24 heures. Pour chacun des biotubas observés, 4 échantillons sont prélevés : deux dans la partie immergée et deux dans la partie émergée. Pour chacun de ces 4 échantillons, 6 acquisitions sont réalisées (Figure 2.18).

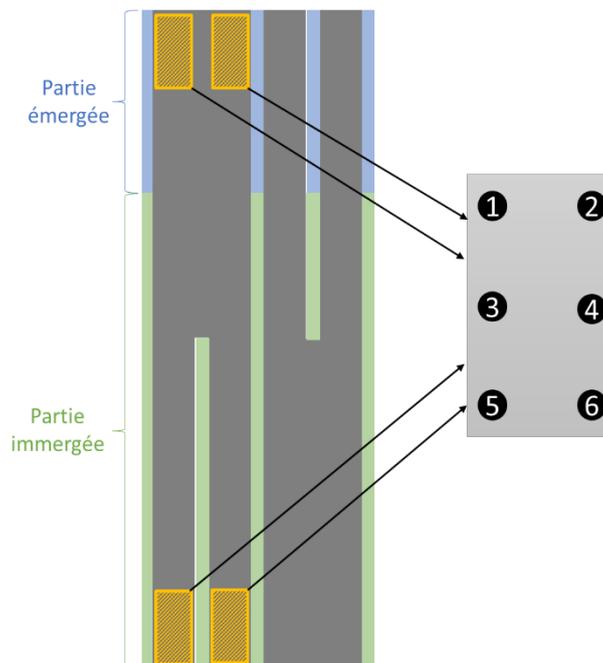


Figure 2.18 : Echantillonnage réalisé sur les biotuba et observations au microscope à épifluorescence réalisées sur chaque échantillon.

Le microscope utilisé pour les observations est un Axio Imager M2 motorisé en Z (Carl Zeiss, Allemagne) et équipé d'une source de lumière (HBO 200) et d'un filtre Zeiss 09 (excitateur HP450, réflecteur FT-10, filtre barrière LP520). Les observations de la réparation

3D du biofilm à la surface des échantillons et à l'intérieur (coupe du feutre de carbone) peuvent être faites directement grâce à la caméra monochrome numérique (Evolution VF). Un « stack » de  $n$  images superposées perpendiculairement à la surface, est réalisé pour chacune des zones observées (Figure 2.18). Chaque « stack » correspond à une acquisition et contient 40 à 160 images, espacées les unes des autres d'une distance constante de  $3,7 \mu\text{m}$ . Le logiciel Zen (Carl Zeiss, Allemagne), utilisé pour traiter les acquisitions sur ordinateur, permet d'obtenir des projections et d'évaluer le taux de recouvrement de l'électrode par le biofilm.

### 3.3.2 Microscopie électronique à balayage (MEB)

Des échantillons émergés et immergés de biotubas ont été observés au Service d'Analyse et Procédé du Laboratoire de Génie Chimique, avec l'aide précieuse de Marie-Line De Solan, grâce à un microscope électronique à balayage (Leo 435 VP-Carl Zeiss SMT) doté de diaphragmes de 30, 50 et  $700 \mu\text{m}$ . En amont de l'observation, les échantillons sont traités suivant trois étapes successives de fixation, déshydratation et métallisation.

Pour fixer le biofilm sur les électrodes, les échantillons sont immergés pendant 20 minutes dans une solution contenant 1 volume de tampon phosphate (0,4 M ; pH 7,4), 2 volumes de glutaraldéhyde à 4% v/v et 1 volume d'eau distillée. Ils sont ensuite rincés dans deux bains successifs durant 15 minutes grâce à une solution composée de 1 volume de tampon phosphate (0,4 M ; pH 7,4), 2 volumes de saccharose (0,6 M) et 1 volume d'eau distillée.

Les échantillons sont déshydratés en les plongeant dans des solutions de plus en plus concentrées en acétone selon les étapes suivantes : acétone 50% (5 minutes), acétone 70% (5 minutes), acétone 100% (30 minutes). Les échantillons sont ensuite plongés 30 minutes dans un mélange 50% acétone + 50% hexaméthylsilazane (HDMS) puis dans 100% HDMS jusqu'à évaporation totale du solvant.

Enfin, une étape de métallisation est nécessaire pour éviter l'accumulation d'électrons à la surface du biofilm, non conducteur, un phénomène néfaste à la qualité de l'image finale. Les échantillons sont alors recouverts d'une nanocouche d'or (10/20nm) par pulvérisation cathodique à froid.

## 3.4 Analyses des populations microbiennes

### 3.4.1 Prélèvement, extraction, quantification et séquençage d'ADN

Des analyses de populations microbiennes sont réalisées sur les électrodes bidirectionnelles et les biotubas. Pour les électrodes bidirectionnelles, l'échantillon est constitué d'un morceau de feutre de 3 cm<sup>2</sup>. Dans le cas des biotubas, des prélèvements de 2 cm<sup>2</sup> sont réalisés au niveau des parties hautes et basses, de la même façon que présenté sur la Figure 2.18 pour les observations au microscope. Plusieurs types d'échantillons sont prélevés: le biofilm interne, externe et le milieu de culture.

Le biofilm présent à la surface de l'échantillon d'électrode ou de biotuba est d'abord prélevé avec un scalpel et placé dans un microtube de 2 mL dans du tampon phosphate stérile (10 mM – pH 8,4), il s'agit du biofilm externe.

Pour obtenir le biofilm interne, les fibres du morceau de feutre de carbone sont déstructurées, placées dans des tubes Falcon de 50 mL et recouvertes de tampon phosphate stérile. Les tubes sont placés au bain à ultrasons avec de la glace pendant 30 minutes pour décoller le biofilm des fibres. La glace permet d'éviter une montée en température qui entrainerait la dégradation de l'ADN. Les fibres de feutre sont retirées des échantillons et les tubes sont centrifugés 15 minutes à 4600 g et à 6°C. Le surnageant est vidé et le culot est remis en suspension dans du tampon phosphate stérile dans un microtube de 2 mL.

Pour le milieu de culture, les étapes sont les mêmes que pour le biofilm interne, à partir d'un échantillon de 20 mL de milieu.

L'ADN des échantillons de biofilms et de milieu est extrait grâce au kit DNeasy PowerBiofilm (Qiagen) selon le protocole fourni. L'extraction des échantillons se déroule selon les étapes suivantes :

- la lyse cellulaire grâce à des actions chimiques, mécaniques et thermiques,
- la précipitation des polluants issus de la lyse (acide humique, débris de cellule, polyphénols, polysaccharides et protéines) pour purifier l'ADN,
- la filtration membranaire sur colonne de centrifugation,
- le lavage de l'ADN fixé sur la colonne,
- l'élution de l'ADN retenu sur la colonne avec 100 µL de tampon dans un microtube de 2 mL.

L'échantillon d'ADN extrait est quantifié grâce à une plaque  $\mu$ Drop™ Plate et un spectrophotomètre UV-visible Multiskan® GO (Thermo Scientific, USA). L'acquisition des mesures se fait au moyen du logiciel SkanIt. Après quantification, les échantillons sont conservés à -20°C avant d'être envoyés à l'unité PROSE de l'INRAE (Antony).

Les collègues du laboratoire PROSE ont réalisé l'amplification de la région hyper variable archéenne et bactérienne V4-V5 du gène de l'ARNr 16S puis son séquençage selon le protocole décrit par (Poirier et al., 2016) ou (Madigou et al., 2019) avec quelques modifications apportées par Chrystelle Bureau. Dans la mesure où ces parties du travail n'ont pas été réalisées dans le cadre de la thèse, les protocoles ne sont pas repris ici. Ils sont toutefois décrits de façon détaillée dans l'article : « *Oxygen-reducing bidirectional microbial electrodes designed in real domestic wastewater* » présenté dans le chapitre 3.

### 3.4.2 Traitement de données

Le traitement de données a été réalisé avec l'aide inestimable d'Olivier Chapleur et de Cédric Midoux de l'unité PROSE. Une matrice de comptage des OTUs (unités taxonomiques opérationnelles) a été conçue en utilisant le pipeline FROGS (Find Rapidly OTU with Galaxy Solution) (Escudié et al., 2018), comprenant des contrôles de qualité de l'ADN, l'analyse des séquences de metabarcoding et l'affiliation des OTU avec la base de données blastn with 16S\_silva132. Les OTUs peu abondantes ont été filtrées. Les OTUs présentes à plus de 0,5% dans au moins un échantillon ont été conservées. Les abondances des OTUs ont été examinées à l'aide du logiciel R CRAN (version 3.6), muni des packages phyloseq R.

Une analyse en composantes principales (ACP) a été effectuée pour mettre en évidence les relations entre des échantillons correspondants à différentes conditions. L'ACP a été calculée à l'aide du logiciel mixOmics R (version 6.6.1) après que les abondances des OTUs dans les échantillons aient été transformées avec un log ratio centré (CLR) (Rohart et al., 2017).



***Chapitre 3 : Optimisation d'une  
électrode microbienne aérée en  
eaux usées domestiques***



## **1 Objectifs et choix de l'étude**

Comme développé dans la partie 4.1 du chapitre 1, les anodes microbiennes ont été décrites et optimisées par de nombreuses équipes de recherche. En outre, au début de ces travaux de thèse, il était relativement aisé d'anticiper le comportement d'une anode microbienne en matériau carboné dans des eaux usées, car ce type d'anode avait déjà été étudié au laboratoire, notamment dans le cadre de la thèse d'Emma Roubaud qui les a mises en œuvre au sein d'électrolyseurs microbiens pour la production d'hydrogène.

Il paraissait donc stratégique de concentrer les efforts sur le développement de la partie cathodique du biotuba. La cinétique trop lente des cathodes de réduction de l'oxygène est connue comme un verrou majeur des systèmes électro-microbiens (Erable et al., 2012). Les catalyseurs métalliques usuels sont inefficaces aux valeurs de pH proches de 7 généralement utilisés dans ces systèmes. Il a été démontré que la catalyse microbienne de la réduction de l'oxygène pouvait offrir une alternative intéressante car elle opère dans les mêmes conditions que celles de l'anode microbienne (Erable et al., 2012; He and Angenent, 2006; Rimboud et al., 2016).

Le principal verrou dans notre cas est la concentration en oxygène dissous quasi-nulle dans les eaux usées (chapitre 2 – partie 1.2.2). En effet, en présence de matière organique à oxyder, l'oxygène dissous est consommé très rapidement par les bactéries des eaux usées, et des boues activées ajoutées comme inoculum, d'où la nécessité d'aérer intensément les bassins dans le traitement biologie classique des eaux usées (Molinós-Senante et al., 2018).

Tous les efforts ont visé à pallier ce problème, en facilitant au maximum le transfert de l'oxygène vers la partie cathodique du biotuba. Au lieu de démarrer directement par un biotuba complet, c'est-à-dire avec une partie anodique et une partie cathodique connectées ensemble, nous avons choisi d'étudier d'abord anode et cathode séparément, grâce à un montage à trois électrodes avec électrode à l'interface et un réacteur « standard » décrits respectivement dans les parties 2.2.1 et 2.1.1 du chapitre 2. Il suffit ensuite de connecter les anodes et cathodes pour concevoir le biotuba.

Ce chapitre s'articule autour de quatre parties. La première partie, que vous êtes en train de lire, trace les objectifs et donne les principaux choix de l'étude. La deuxième partie décrit le développement d'une cathode microbienne de réduction de l'oxygène. Il s'agit d'une cathode à air dite « flottante » car elle est placée à l'interface entre le milieu réactionnel liquide et le ciel gazeux afin de favoriser le transfert de l'oxygène vers le biofilm de la cathode. Ces

premières expériences ont confirmé la faible efficacité des cathodes de réduction de l'oxygène, microbiennes ou non, avec des densités de courant très faibles et peu stables.

Ces piètres résultats ont dirigé les travaux vers la conception d'électrodes microbiennes capables de transferts d'électrons extracellulaires (TEE) bidirectionnels. Ces électrodes microbiennes bidirectionnelles permettent l'oxydation de matière organique lorsqu'elles sont en conditions anodiques (apport de substrat organique, absence d'oxygène) et la réduction de l'oxygène en conditions cathodiques (apport d'oxygène, absence de substrat organique) (Hoareau et al., 2021a). Le fait qu'elles bénéficient d'un biofilm riche développé en conditions anodiques pourrait permettre d'accroître l'efficacité de la catalyse de réduction de l'oxygène. Pour rappel, le principe ainsi que l'état de l'art des TEE bidirectionnels sont détaillés dans l'Article 1 de la partie 4.4 du chapitre 1.

La mise en place d'une électrode microbienne bidirectionnelle a été initiée par un essai de permutation d'une anode microbienne déjà formée en mode cathode de réduction de l'oxygène, comme l'avait déjà initié Elise Blanchet dans ses travaux de thèse (Blanchet, 2016). Trois autres essais successifs similaires ont suivi afin d'évaluer la faisabilité d'un tel protocole dans les eaux usées domestiques et les conditions d'alimentation en substrat et d'aération optimales. Ces essais sont décrits dans la troisième partie du chapitre.

Dans la quatrième partie, la dernière expérience est réalisée selon un protocole optimisé débutant par une phase anodique de formation du biofilm puis alternant des phases anodiques d'apport de substrat et des phases cathodiques d'aération. La réussite de ce protocole optimisé, mené durant 52 jours, a permis de valoriser nos efforts de recherche collaboratifs par la rédaction de l'Article n°3, *Oxygen-reducing bidirectional microbial electrodes designed in real domestic wastewater* (Hoareau et al., 2021b). Cet article inclut l'analyse des courants anodiques (oxydation de la matière organique) et cathodiques (réduction de l'oxygène), le suivi de la DCO<sub>s</sub> et du pH, mais aussi l'analyse des populations microbiennes impliquées dans ce phénomène de TEE bidirectionnels.

## **2 Développement d'une cathode microbienne à air flottante**

### **2.1 Rappel des conditions opératoires**

Le Tableau 3.1 rappelle les principales caractéristiques du montage expérimental et les techniques électrochimiques utilisées lors des trois essais de mise en œuvre d'une cathode

à air flottante dans les eaux usées domestiques. S'agissant d'une cathode à air, l'objectif principal est d'obtenir les densités de courant cathodiques les plus élevées sans apport forcé ni processus de solubilisation spécifique de l'oxygène.

Les essais n°1 et n°2 et 3 diffèrent par le type de collecteur de courant utilisé pour l'électrode travail, passant d'un fil de platine à une tige en titane. Cette dernière assure un meilleur contact électrique avec le feutre de carbone. Lors de l'essai n°3, la polarisation de l'électrode de travail, qui se faisait jusque-là à -0,2 V vs ECS, est passée à -0,1 V pour se rapprocher des systèmes électrochimiques utilisés au laboratoire avec des eaux usées domestiques, notamment les travaux de la thèse d'Emma Roubaud, et permettre une comparaison plus facile.

*Tableau 3.1 : Conditions expérimentales pour les trois essais de mise en œuvre des cathodes à air flottante.*

<b>Montage « Electrode à l'interface » (chapitre 2 – parties 2.1.1, 2.1.3 et 2.2.1)</b>	
<b>Réacteurs « standards », essai n°1 700 mL</b>	Electrode de travail : feutre de carbone 9 cm <sup>2</sup> + <b>fil de platine</b> Contre électrode : tissu de carbone + fil de platine Electrode de référence : ECS
<b>Réacteurs « standards », essais n°2 &amp; 3 700 mL</b>	Electrode de travail : feutre de carbone 9 cm <sup>2</sup> + <b>tige en titane</b> Contre électrode : tissu de carbone + fil de platine Electrode de référence : ECS
<b>Réservoir</b>	Débit de recirculation : 1,5 mL/min
<b>Flacon en verre de 2L</b>	HRT (temps de séjour hydraulique) ≈ 5,5 h
<b>Techniques électrochimiques (chapitre 2 – parties 3.1.1 et 3.1.3)</b>	
CA	CV
E = -0,2 V vs ECS (essais n°1 et 2)	3 cycles à 1 mV/s de -0,6 à 0,4 V vs ECS
E = -0,1 V vs ECS (essai n°3)	

Différents électrolytes ont été utilisés, comme détaillé dans le Tableau 3.2, soit au titre de contrôles, soit pour évaluer l'impact du point de collecte des eaux usées, en entrée ou en sortie du bassin de traitement biologique de la station d'épuration (Castanet-Tolosan). Les

essais n°1 et 2 étaient constitués tous les deux de 8 réacteurs. Les deux contrôles abiotiques contenaient une solution aqueuse de KCl, dont la concentration a été ajustée pour atteindre la conductivité des eaux usées, soit 1,4 mS/cm. Deux réacteurs contenaient des eaux usées collectées en entrée et deux autres des eaux usées collectées en sortie. Aussi, des eaux collectées en entrée et préalablement aérées pendant 4h ont été utilisées dans deux réacteurs afin d'évaluer les densités de courants cathodiques avec des eaux présentant une quantité de matière organique intermédiaire (entre l'entrée et la sortie). Tous les réacteurs, à l'exception des contrôles, ont été inoculés avec 5% de boues activées.

Pour l'essai n°3, le contrôle a été modifié. Un mélange d'eaux usées et de boues activées, autoclavé, a été utilisé afin de se rapprocher le plus possible du milieu utilisé dans les autres réacteurs tout en étant abiotique. L'eau de sortie a finalement été abandonnée pour cet essai 3 puisque les résultats précédents avec ce milieu n'apportaient pas d'information supplémentaire.

Les eaux usées d'entrée et de sortie avaient des valeurs de DCO<sub>s</sub> respectivement de l'ordre de 198 ±54 et 38 ±2 mg d'O<sub>2</sub>/L. Des eaux collectées en entrée et préalablement aérées pendant 4 heures ont aussi été utilisées afin de tester l'impact de la concentration en matière organique. Après les 4 heures d'aération la DCO<sub>s</sub> n'était plus que de 127±32 mg d'O<sub>2</sub>/L.

*Tableau 3.2 : Milieux et inoculum utilisés pour les trois essais de mise en œuvre des cathodes à air flottante.*

Milieu de culture + inoculum 500 mL par réacteur		Nombre de réacteurs		
		Essai n°1 14 jours	Essai n°2 29 jours	Essai n°3 33 jours
<b>Eau + KCl, ajusté à la conductivité des eaux usées, 1,4 mS/cm (contrôle 1)</b>	<b>Eau + KCl</b>	2	2	-
<b>Eaux usées entrée + 5% de boues activées, autoclavé (contrôle 2)</b>	<b>EU + BA, autoclavé</b>	-	-	2
<b>Eaux usées entrée + 5% de boues activées</b>	<b>EU + BA</b>	2	2	2

Milieu de culture + inoculum 500 mL par réacteur		Nombre de réacteurs		
		Essai n°1 14 jours	Essai n°2 29 jours	Essai n°3 33 jours
Eaux usées entrée + 5% de boues activées, aéré 4h	EU + BA, aéré	2	2	2
Eaux de sortie + 5% de boues activées	EU sortie + BA	2	2	-
Nombre total de réacteurs		8	8	6

EU : eaux usées ; BA : Boues activées

## 2.2 Résultats expérimentaux

### 2.2.1 Essai n°1

Les courbes obtenues pour la première chronoampérométrie (CA) (Figure 3.1), réalisée durant 14 jours, donnaient des courants peu stables, perturbés par un bruit électrique important. Cela a été attribué au mauvais contact électrique entre le fil de platine et le feutre de carbone. Le fil de platine a donc été remplacé par une tige en titane lors des essais 2 et 3. La tige en titane est en effet plus rigide et a un diamètre d'un millimètre. Son insertion mécanique dans le feutre oblige un nombre plus important de contact entre la tige et les fibres du feutre.

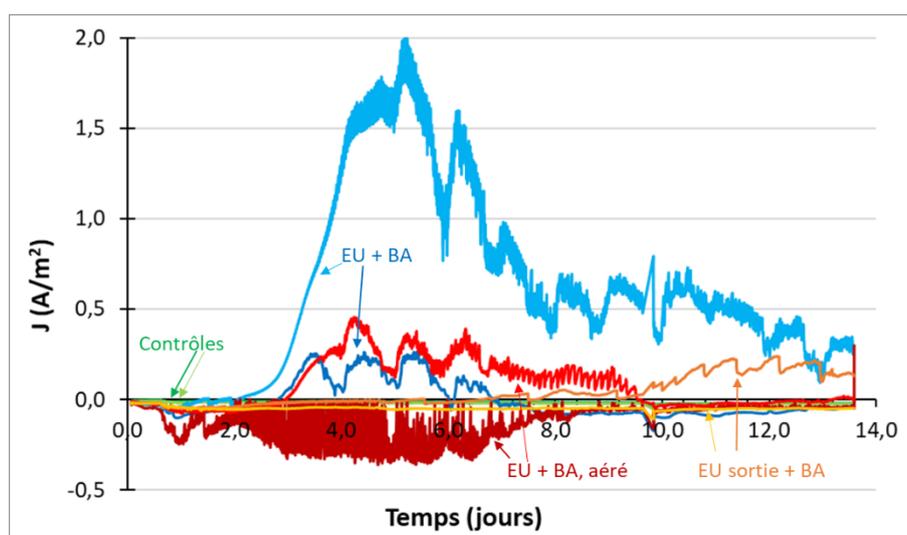


Figure 3.1 : Formation d'une cathode à air flottante en feutre de carbone. CAs obtenues avec une polarisation à  $-0,2$  V vs ECS lors de l'essai n°1.

Le manque de stabilité et le bruit dus à la mauvaise connexion entre le platine et le feutre de carbone ont conduit à des CAs difficilement interprétables, avec des duplicats n'ayant pas les mêmes comportements. Pour tenter tout de même une comparaison entre les différents réacteurs, les intégrales de chaque CA ont été calculées (Tableau 3.3). Une valeur élevée indique une quantité d'électricité importante échangée, en oxydation si la valeur est positive, en réduction si elle est négative.

Les quantités d'électricité sont exprimées en  $A.j/m^2$  car c'est une unité commode, quoiqu'inhabituelle. La quantité d'électricité exprimée en  $A.j/m^2$  est la quantité d'électricité qui permettrait de maintenir une densité de courant de la valeur indiquée en  $A/m^2$  pendant un jour. Par exemple, une quantité d'électricité de  $-0,65 A.j/m^2$  (dernière colonne du Tableau 3.3) permettrait, avec le dispositif expérimental utilisé ici, de maintenir une densité de courant de  $-0,65 A/m^2$  pendant un jour. L'utilisation de cette unité permet une correspondance facile entre quantités d'électricité et densités de courant. Pour exprimer les quantités d'électricité en Coulomb, l'unité usuelle, il suffit de multiplier les chiffres indiqués dans le Tableau 3.3 par  $24 \times 3600$ , soit 86 400. Pour avoir le nombre de moles d'électrons échangés, le facteur multiplicatif est égal à  $24 \times 3600 / 96485$ , soit 0,895.

*Tableau 3.3 : Intégrales des CAs obtenues avec une polarisation à  $-0,2 V$  vs ECS lors de l'essai n°1 de formation d'une cathode à air flottante en feutre de carbone.*

Milieu	Eau + KCl		EU entrée + BA		EU + BA, aéré		EU sortie + BA	
	1	2	1	2	1	2	1	2
<b>Intégrale (<math>A.j/m^2</math>)</b>	-0,19	-0,26	-0,06	8,22	-1,64	1,09	0,57	-0,65

EU : eaux usées ; BA : Boues activées

La comparaison des intégrales a permis de premières constatations quant aux différences liées aux milieux réactionnels. Les contrôles eau + KCl, comme attendu, donnaient bien des quantités d'électricité échangées très faibles, plutôt en réduction. La réaction électrochimique sur le feutre de carbone à  $-0,2 V$  vs ECS était très certainement la réaction de réduction de l'oxygène (ORR).

Le premier réacteur avec l'eau usée d'entrée + 5% de boues activées présente une quantité d'électricité échangée presque nulle, cela pourrait être dû à une compétition entre les réactions anodiques et cathodiques. Le second adopte un comportement global anodique,

avec une quantité d'électricité échangée conséquente de  $8,22 \text{ A.j/m}^2$ . En effet, cette quantité d'électricité, si elle avait été échangée de façon continue pendant les 14 jours de la CA, correspondrait à une densité de courant moyenne de  $0,59 \text{ A/m}^2$ . Ce comportement anodique était probablement dû à la quantité importante de substrat couplée au mauvais transfert de l'oxygène dans les eaux usées. Une étape d'apport d'oxygène par bullage d'air sera probablement nécessaire pour pallier ce problème.

Les eaux usées d'entrée préalablement aérées pendant 4 heures et l'eau de sortie, ont les valeurs de  $\text{DCO}_s$  les moins élevées. Les courants cathodiques les plus importants sont obtenus avec deux réacteurs utilisant ces milieux. L'intégrale de la CA donne une valeur de  $-1,64 \text{ A.j/m}^2$  pour l'un des réacteurs avec les eaux usées aérées. Une valeur de  $\text{DCO}_s$  faible et une étape initiale d'aération favorisent le développement de populations microbiennes aérobies adéquates pour former une cathode microbienne. Toutefois, les résultats sont à relativiser puisque le second réacteur présente, lui, un comportement anodique.

Pour chacun des réacteurs, dans les quatre milieux de culture, les voltammétries cycliques (CVs) initiales et finales ont été comparées (Figure 3.2). Alors que les CVs initiales étaient similaires pour tous les réacteurs, les CVs finales, réalisées après 14 jours de CA, variaient en fonction du milieu réactionnel. Afin de faciliter la comparaison des différents résultats, un tableau a été construit avec les valeurs de potentiels (V vs ECS) à des courants de  $-0,1$ ,  $-0,5$  et  $-1,0 \text{ A/m}^2$  (Tableau 3.4). Pour évaluer la qualité des cathodes, il suffit de considérer que plus la production de courant cathodique se réalise à des potentiels élevés, meilleure est la cinétique cathodique. Identifier les meilleures cathodes dans le Tableau 3.4 revient donc à repérer les valeurs de potentiel les plus élevées au sein d'une ligne donnée.

Les CVs initiales sont très proches pour tous les réacteurs avec un potentiel moyen de  $-0,33 \pm 0,06 \text{ V vs ECS}$  pour une densité de courant de  $-0,1 \text{ A/m}^2$ . La densité de courant de  $-0,5 \text{ A/m}^2$  n'est pas atteinte par tous les réacteurs. Cinq réacteurs sur 8 atteignent cette valeur mais à des potentiels proches de la borne inférieure de la CV, avec une valeur moyenne de  $-0,55 \pm 0,03 \text{ V vs ECS}$ . Aucune des CVs initiale n'atteint la densité de courant de  $-1,0 \text{ A/m}^2$ .

En règle générale, comme on le voit sur la Figure 3.2, la cinétique cathodique est meilleure pour la CV finale que pour la CV initiale : pour une même densité de courant les potentiels sont plus élevés pour la CV finale. Pour la densité de courant de  $-0,1 \text{ A/m}^2$  le potentiel moyen est de  $-0,09 \pm 0,30 \text{ V vs ECS}$ . De plus, presque tous les réacteurs (7 sur 8) atteignent un courant de  $-0,5 \text{ A/m}^2$  avec un potentiel moyen de  $-0,41 \pm 0,11 \text{ V vs ECS}$ . Trois d'entre eux atteignent même  $-1,0 \text{ A/m}^2$  à  $-0,45 \pm 0,08 \text{ V vs ECS}$  en moyenne.

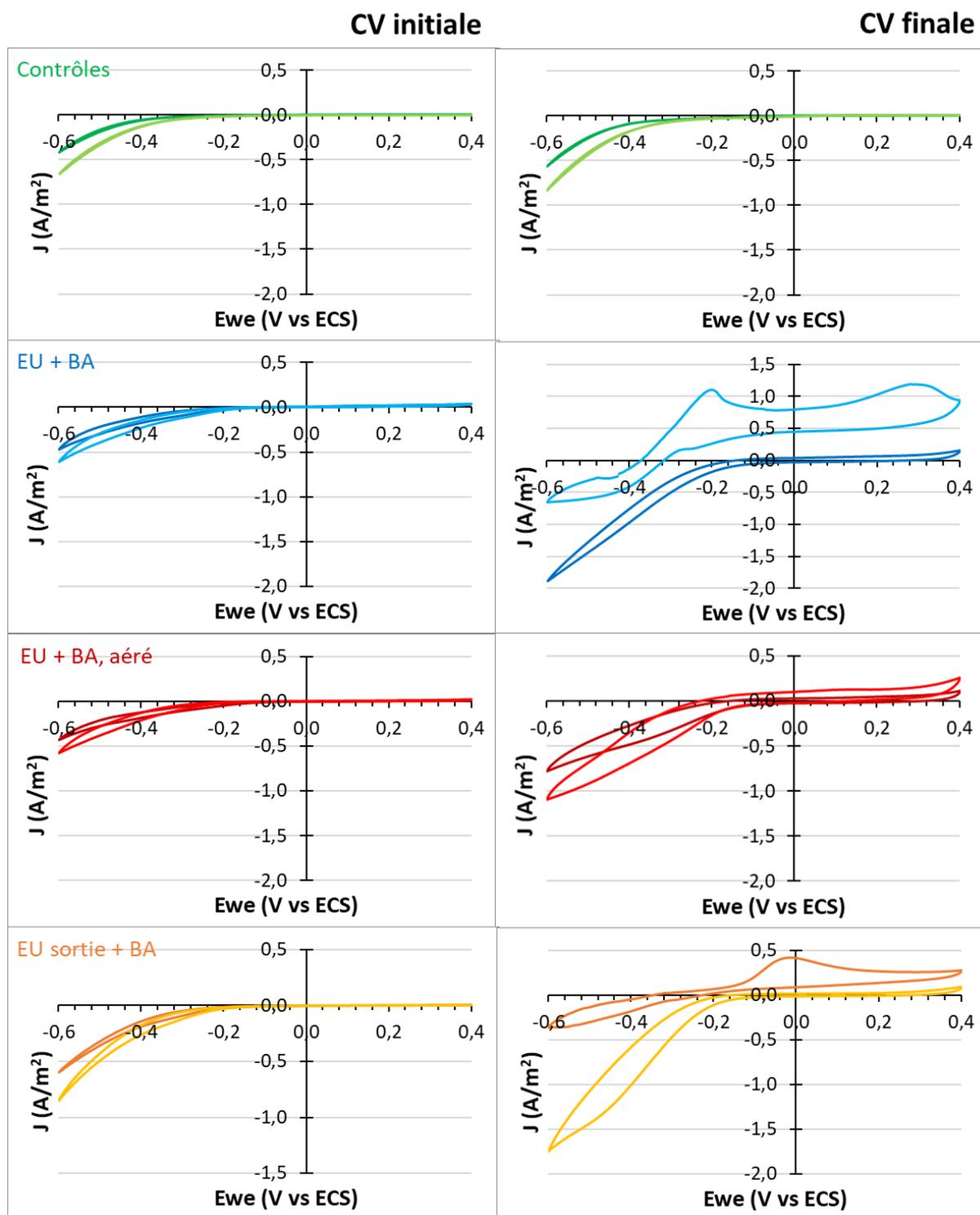


Figure 3.2 : Formation d'une cathode à air flottante en feutre de carbone. CVs initiales et finales obtenues lors de l'essai n°1 avec une vitesse de balayage de 1 mV/sec entre -0,6 et +0,4 V vs ECS (duplicats).

Pratiquement tous les réacteurs ont donc développé des cathodes microbiennes de réduction de l'oxygène à la suite de la CA de 14 jours. Lorsque la CA à -0,2 V vs ECS indique

un courant d'oxydation, les CVs détectent tout de même une catalyse de la réduction de l'oxygène à des potentiels plus bas. L'un des réacteurs « EU + BA » (Figure 3.2) en donne un exemple flagrant. La CV montre la combinaison d'un comportement anodique entre -0,4 V et +0,4 V vs ECS et cathodique entre -0,4 V et -0,6 V vs ECS, le potentiel de basculement étant autour de -0,4 V vs ECS. Cette observation est encourageante et d'ailleurs, sans en avoir conscience au moment où les expérimentations étaient réalisées, nous avons fait un premier pas sur la piste des électrodes bidirectionnelles.

Tableau 3.4 : Comparaison des potentiels (V vs ECS) des cathodes à air flottantes pour différentes valeurs de courant cathodique. Les valeurs de potentiels ont été extraites des CVs initiales et finales obtenues lors de l'essai n°1 de formation d'une cathode à air flottante.

Milieu	Réacteur	Eau + KCl		EU + BA		EU + BA, aéré		EU sortie + BA	
		1	2	1	2	1	2	1	2
E (V vs ECS) pour I = -0,1 A/m <sup>2</sup>	Initiale	-0,44	-0,38	-0,31	-0,28	-0,29	-0,31	-0,31	-0,28
	Finale	-0,41	-0,34	-0,21	-0,39	-0,17	-0,17	0,34	-0,19
E (V vs ECS) pour I = -0,5 A/m <sup>2</sup>	Initiale	-	-0,56	-	-0,56	-	-0,56	-0,56	-0,50
	Finale	-0,58	-0,52	-0,30	-0,44	-0,41	-0,32	-	-0,31
E (V vs ECS) pour I = -1,0 A/m <sup>2</sup>	Initiale	-	-	-	-	-	-	-	-
	Finale	-	-	-0,40	-	-	-0,54	-	-0,40

EU : eaux usées ; BA : Boues activées

La mesure de la DCO soluble (DCO<sub>s</sub>) a permis de dégager deux tendances (Tableau 3.5). Les milieux initialement pauvres en DCO<sub>s</sub>, tels que le contrôle (eau + KCl) sans inoculum et l'eau de sortie inoculée avec les boues activées (EU sortie + BA) ont des concentrations en DCO<sub>s</sub> qui augmentent entre le début et la fin de l'expérience. Ce résultat, a priori surprenant, est toutefois facilement explicable : les milieux contenaient initialement de la DCO particulaire qui s'est hydrolysée au cours des 14 jours de la CA et a augmenté la concentration finale en DCO<sub>s</sub>.

Le contrôle, préparé avec de l'eau du robinet, contenait initialement une très faible concentration en DCO (particulaire et soluble), inférieure à la limite de détection du kit. La

concentration de DCO<sub>s</sub> augmente jusqu'à une valeur qui reste très faible de 20 ±1 mg d'O<sub>2</sub>/L. L'augmentation est plus significative pour l'eau de sortie qui passe de 39,3 mg d'O<sub>2</sub>/L initialement à 68 ±24 mg d'O<sub>2</sub>/L.

Au contraire, les milieux avec une la DCO<sub>s</sub> initiale plus élevée ont vu leur DCO<sub>s</sub> diminuer. On observe un abattement moyen de 36 ±14% pour EU + BA et 28 ±11% pour EU + BA, aéré. Il manque toutefois un contrôle qui aurait été réalisé sans polarisation de l'électrode en feutre de carbone afin d'évaluer si une partie de l'abattement constaté pourrait être attribué au processus électrochimique.

*Tableau 3.5 : DCO soluble initiale et finale obtenues lors de l'essai n°1 de formation d'une cathode à air flottante.*

Milieu	Eau + KCl		EU + BA		EU + BA, aéré		EU sortie + BA			
	1	2	1	2	1	2	1	2		
<b>Réacteur</b>										
<b>DCO soluble</b>	<b>Initiale</b>		146		92,1		39,3			
<b>(mg d'O<sub>2</sub>/L)</b>	<b>Finale</b>		21,3	19,9	78,5	107	58,8	73,1	84,6	51,0

EU : eaux usées ; BA : Boues activées

Les résultats de ce premier essai, tant avec l'amélioration des performances cathodiques observables sur les CVs qu'avec l'abattement de la DCO<sub>s</sub> observé dans les réacteurs avec des eaux usées d'entrée, sont encourageants et ce malgré le mauvais contact entre le fil de platine et le feutre de carbone. Il semble que le milieu EU + BA, avec une DCO<sub>s</sub> initiale de 146 mg d'O<sub>2</sub>/L favorise la formation d'une anode, alors que le milieu EU + BA aéré, moins chargé (92 mg d'O<sub>2</sub>/L), permet la formation d'une cathode. Les performances obtenues avec les eaux usées préalablement aérées pendant 4 heures indiquent une piste à exploiter en ajoutant une étape d'aération avant le début de la polarisation.

### 2.2.2 Essai n°2

L'essai n°2 reproduit les conditions du premier essai en remplaçant le fil de platine de l'électrode de travail par une tige en titane qui offre une meilleure connexion avec le feutre de carbone. La polarisation à -0,2 V vs ECS est maintenue pendant 29 jours (Figure 3.3). Les duplicats ont ici un comportement plus proche entre eux. Comme pour la première expérience, le milieu EU + BA, chargé en DCO<sub>s</sub> favorise la formation d'une anode alors que le milieu EU

+ BA, aéré, moins chargé, tend vers la formation d'une cathode. Le milieu EU sortie + BA a un comportement proche du milieu de contrôle avec des courants plutôt cathodiques mais très faibles.

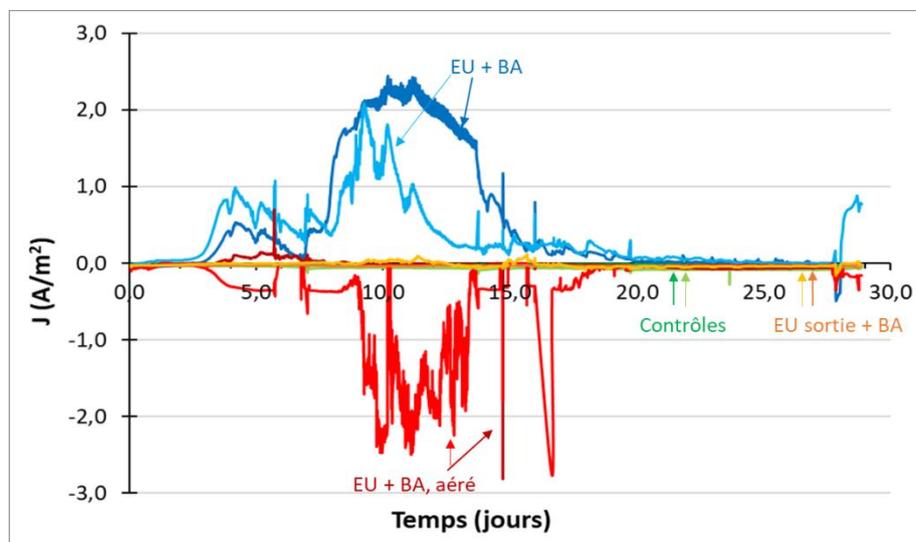


Figure 3.3 : Formation d'une cathode à air flottante en feutre de carbone. CAs obtenues avec une polarisation à  $-0,2$  V vs ECS lors de l'essai n°2.

Les intégrales des CAs confirment ces premières remarques (Tableau 3.6). Dans le milieu EU + BA, des anodes sont clairement formées dans les deux réacteurs avec des intégrales de 14,58 et 10,00 A.j/m<sup>2</sup>. En revanche, les électrodes avec le milieu EU + BA, aéré, présentent toutes deux les comportements cathodiques souhaités, avec une valeur de -10,88 A.j/m<sup>2</sup> pour l'une, qui est particulièrement élevée, puisqu'elle correspondrait à une intensité de 0,37 A/m<sup>2</sup> maintenue constante pendant les 29 jours de la CA. Les électrodes des réacteurs de contrôle, ainsi que celles dans le milieu EU sortie + BA, présentent des valeurs faibles qui ont tendance à être cathodiques.

Tableau 3.6 : Intégrales des CAs obtenues avec une polarisation à  $-0,2$  V vs ECS lors de l'essai n°2 de formation d'une cathode à air flottante en feutre de carbone.

Milieu	Eau + KCl		EU + BA		EU + BA, aéré		EU sortie + BA	
Réacteur	1	2	1	2	1	2	1	2
Intégrale (A.j/m <sup>2</sup> )	-0,32	-1,84	14,58	10,00	-0,45	-10,88	0,96	-0,51

EU : eaux usées ; BA : Boues activées

Malgré ces résultats encourageants, cet essai n°2 a dû être arrêté en cours de route à cause de différents problèmes au niveau de la recirculation des milieux réactionnels. Les tuyaux utilisés pour le premier essai ont été nettoyés avant d'être réutilisés pour ce second essai. Plusieurs colmatages ont entraîné des fuites, des débordements et autres variations de volume réactionnel. Pour les mêmes raisons, une contamination des contrôles (eau + KCl) a été observée avec notamment une forte augmentation de la DCO<sub>s</sub> dans ces réacteurs (Tableau 3.7). Ce lots d'expériences a également permis d'améliorer la gestion de la recirculation avec la mise en place de raccords adaptés permettant d'éviter au maximum les fuites et les colmatages ainsi que le changement systématique des tuyaux entre chaque expérience. Cette expérience nous a conduits à établir une règle de base : un tuyau, même nettoyé avec soin, induit une formation de biofilm colmatant bien plus rapidement qu'un tuyau neuf.

Tableau 3.7 : DCO soluble initiale et finale obtenues lors de l'essai n°2 de formation d'une cathode à air flottante.

Milieu		Eau + KCl		EU + BA		EU + BA, aéré		EU sortie + BA	
Réacteur		1	2	1	2	1	2	1	2
DCO soluble (mg d'O <sub>2</sub> /L)	Initiale	< 15,0		195		135		36,6	
	Finale	93,1	40,0	57,0	51,1	48,9	71,1	49,2	43,3

EU : eaux usées ; BA : Boues activées

### 2.2.3 Essai n°3

Le principal changement pour ce dernier essai est le remplacement du contrôle eau + KCl par un nouveau contrôle constitué d'eaux usées d'entrée inoculées avec 5% de boues activées et autoclavé afin de le rendre aseptique (microbiologiquement inactif). Ce changement de contrôle ne s'est finalement pas révélé pertinent puisqu'un développement bactérien a finalement été observé à partir du jour 18 avec un courant anodique supérieur à celui observé pour EU + BA (Figure 3.4). Il est probable que des spores aient subsisté malgré l'autoclavage, et que le développement microbien soit simplement plus tardif, et donc décalé par rapport aux réacteurs avec EU + BA. En outre, l'autoclavage du mélange EU + BA a certainement accentué la DCO<sub>s</sub>, qui a entraîné une production de courant anodique presque deux fois plus élevée que les cathodes dans le milieu EU + BA non autoclavé.

Le potentiel appliqué pour cet essai n°3 n'est plus -0,2 V vs ECS, comme pour les essais précédents, mais -0,1 V vs ECS pour toute la durée de la CA de 33 jours. Le potentiel de polarisation a été modifié afin d'être en cohérence avec les expériences réalisées précédemment au laboratoire avec des eaux usées, notamment celles de la thèse d'Emma Roubaud (Roubaud, 2019; Roubaud et al., 2021, 2019). Ce potentiel sera conservé pour tous les essais suivants.

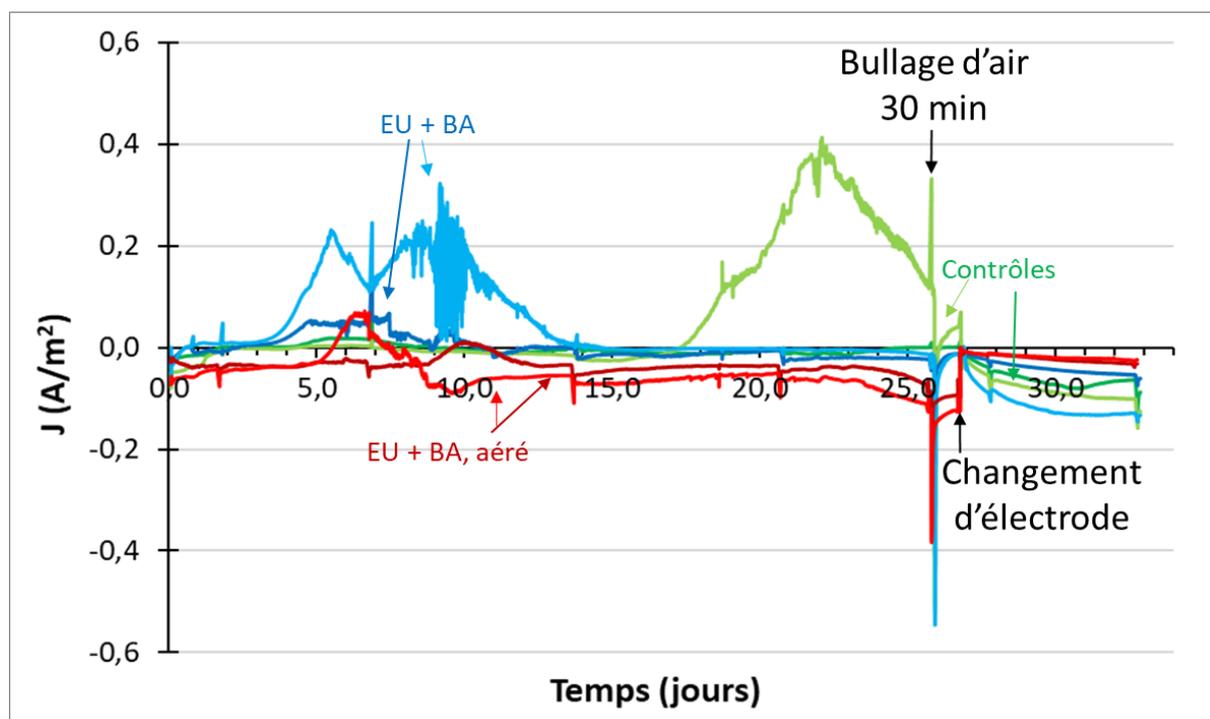


Figure 3.4 : Formation d'une cathode à air flottante en feutre de carbone. CAs obtenues avec une polarisation à -0,1 V vs ECS lors de l'essai n°3.

Une nouvelle fois, le milieu EU + BA a induit la formation d'anodes, bien que les densités de courant soient plus faibles que dans les deux essais précédents et qu'un duplicat ait tardé à révéler son comportement anodique (Tableau 3.7). De façon également similaire aux essais précédents, c'est dans le milieu EU + BA, aéré, que le résultat attendu est obtenu avec la production de courant cathodique la plus importante, presque sur toute la durée de l'expérience, et des intégrales de -1,14 et -1,59 A.j/m<sup>2</sup>. Les trois essais montrent qu'il était probablement nécessaire d'effectuer une étape d'aération préalable afin d'avoir un milieu moins chargé en DCO<sub>s</sub> et une flore microbienne aérobie active pour faciliter la formation d'une cathode microbienne.

*Tableau 3.7 : Intégrales des CAs obtenues avec une polarisation à -0,1 V vs ECS lors de l'essai n°3 de formation d'une cathode à air flottante en feutre de carbone.*

Milieu	EU + BA, autoclavé		EU + BA		EU + BA, aéré	
Réacteur	1	2	1	2	1	2
<b>Intégrale (A.j/m<sup>2</sup>)</b>	-0,47	1,13	-0,25	0,57	-1,14	-1,59

EU : eaux usées ; BA : Boues activées

Deux tests exploratoires importants sont aussi ajoutés au protocole de cet essai. Le premier est un bullage d'air de 30 minutes réalisé au jour 26. Les courants basculent immédiatement vers des courants cathodiques avec un pic à  $-0,19 \pm 0,16 \text{ A/m}^2$  et reviennent rapidement à leur valeur initiale dès l'arrêt de l'aération, ce qui indique une forte limitation de la densité de courant produite par le transfert de l'oxygène vers l'électrode. La comparaison des CVs avant et après aération (Figure 3.5, gauche et milieu) montre que le bullage n'a malheureusement pas eu d'impact pérenne sur les caractéristiques des électrodes, avec même parfois des performances cathodiques moins bonnes après aération, sans doute dues à une altération mécanique du biofilm.

Au jour 27, les électrodes sont remplacées par de nouvelles électrodes en feutre de carbone. L'objectif est de différencier l'effet de la croissance du biofilm à la surface des électrodes d'un éventuel effet de l'évolution du milieu réactionnel. Après le changement d'électrode, la CA montre un comportement cathodique pour toutes les électrodes (Figure 3.4). Cela était dû à la réduction de l'oxygène de l'air emprisonné dans le feutre vierge qui pallie la limitation par le transfert mise en évidence au jour 26.

La comparaison des CVs avant et après le changement des électrodes a mis en évidence des comportements totalement différents en fonction du milieu réactionnel (Figure 3.5, colonnes du milieu et de droite). Le contrôle, qui avait un comportement anodique au moment du changement, présente par la suite de bonnes performances cathodiques. En revanche, pour le milieu EU + BA, aéré, les performances cathodiques sont moins bonnes avec le feutre neuf. Malgré la limitation par le transfert, les cathodes microbiennes formées dans le milieu EU + BA aéré s'avèrent donc plus efficaces que les électrodes neuves dans des conditions non ou moins limitées. Enfin le milieu EU + BA donne des résultats intermédiaires avec un duplicat présentant de meilleures performances cathodiques que les électrodes neuves mais pas l'autre.

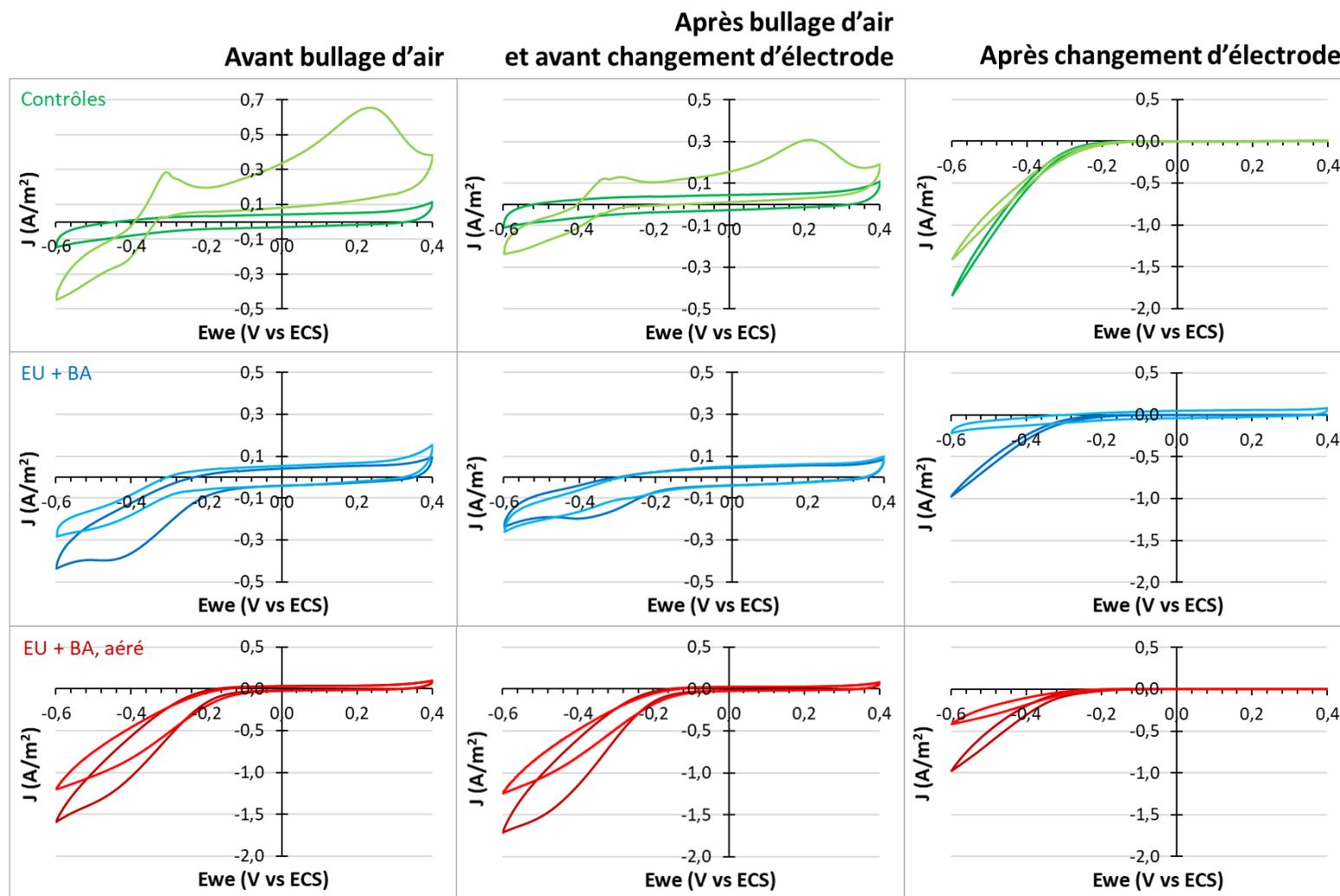


Figure 3.5 : CVs initiales et finales obtenues lors de l'essai n°3 de formation d'une cathode à air flottante en feutre de carbone avec un balayage à 1 mV/sec entre -0,6 et +0,4 V vs ECS, (gauche) avant bullage d'air, (milieu) après bullage d'air avant changement d'électrode et (droite) après changement d'électrode (duplicats).

Le fort abattement de la DCO<sub>s</sub> dans les réacteurs de contrôle a confirmé qu'ils ont bien donné lieu à une activité d'oxydation microbienne (Tableau 3.8). En effet, bien que l'autoclavage ait provoqué une DCO soluble initiale plus importante que celle du milieu EU + BA non autoclavé, les valeurs finales sont similaires pour les deux milieux, signe qu'un développement bactérien a bien dégradé la matière organique.

*Tableau 3.8 : DCO soluble initiale et finale obtenues lors de l'essai n°3 de formation d'une cathode à air flottante.*

Milieu		EU + BA, autoclavé		EU + BA		EU + BA, aéré	
Réacteur		1	2	1	2	1	2
DCO soluble (mg d'O <sub>2</sub> /L)	Initiale	365		253		155	
	Finale	71,2	73,0	75,7	55,2	39,4	30,7

EU : eaux usées ; BA : Boues activées

## 2.3 Conclusion

Ces trois séries d'expériences ont permis de préciser le choix des milieux réactionnels pertinents pour la formation de cathodes microbiennes de réduction de l'oxygène. Il n'a pas été jugé nécessaire de garder les eaux usées de sortie, trop faiblement chargées en DCO<sub>s</sub>, puisqu'elles débouchent à des résultats proches de ceux des contrôles. Il n'a pas non plus été possible de faire, au moins de façon relativement aisée, un milieu de contrôle abiotique à partir d'un simple autoclavage des eaux usées et des boues activées. On suppose que des spores subsistent et entraînent un développement bactérien après deux semaines.

Nous étions un peu déçus par les performances des cathodes microbiennes qui ne donnent des courants de réduction qu'à des potentiels relativement bas, le plus souvent en dessous de -0,2 V vs ECS. Des cathodes microbiennes décrites dans la bibliographie ont produit des densités de courant cathodiques supérieures à 1 A/m<sup>2</sup> pour des potentiels entre -0,1 et +0,2 V vs Ag/AgCl. Il faut toutefois nuancer ces résultats en considérant qu'ils ont été obtenus en milieu synthétique inoculé avec des boues activées ou avec l'effluent d'une PCM (Milner et al., 2016).

Toutefois, ces premiers essais ont apporté de nombreuses informations utiles pour la suite. Le milieu qui a induit le développement des cathodes microbiennes les plus performantes est le milieu EU + BA, aéré. Une aération de 4 heures préalable à l'expérience

permet d'obtenir un milieu moins chargé en DCO<sub>s</sub> favorable la formation des cathodes microbiennes. En effet, avec le milieu EU + BA, la consommation de l'oxygène dans le milieu, couplée à la charge en DCO<sub>s</sub> entraînait la formation d'une anode microbienne. L'aération de 4 heures permet certainement aussi de « réactiver » les boues et les microorganismes aérobies, surtout après un stockage de plusieurs jours en chambre froide.

En outre, plusieurs essais montrent que la formation des anodes microbiennes en présence de DCO<sub>s</sub> élevée (EU + BA) n'interdit pas le développement parallèle de propriétés de cathode microbienne révélées par les CVs. Les tests d'aération transitoire du milieu (essai n°3) ont mis en évidence la forte limitation par le transfert d'oxygène vers l'électrode, bien que les électrodes de travail soient placées au plus près de la surface libre de la solution. Il semble donc que l'on ne puisse pas échapper à une alimentation active de la cathode microbienne en oxygène.

A partir de ces observations la stratégie a été modifiée. C'est ainsi qu'a débuté le développement d'une électrode capable de transferts d'électrons extracellulaires bidirectionnels, c'est-à-dire qui se comporte en anode ou en cathode selon les conditions opératoires appliquées.

### **3 Optimisation d'une électrode microbienne capable de transferts d'électrons extracellulaires (TEE) bidirectionnels**

#### **3.1 Essai préliminaire de permutation d'une anode déjà formée en cathode immergée de réduction de l'oxygène**

Avant de former une électrode capable de TEE bidirectionnels dans les eaux usées domestiques, une expérience préliminaire a été réalisée afin de valider dans les eaux usées la possibilité de passer d'une anode microbienne déjà formée en cathode microbienne de réduction de l'oxygène, à l'image de ce qui a déjà été réalisé au laboratoire dans d'autres milieux (Blanchet et al., 2014; Rimboud et al., 2017).

Nous avons bénéficié, pour cet essai préliminaire, d'anodes microbiennes en graphite formées par Emma Roubaud à partir d'eaux usées hydrolysées et de boues activées, selon un protocole standardisé mis au point dans sa thèse (Roubaud, 2019). Certaines des

électrodes en graphite ont subi au préalable un prétraitement de surface dont les caractéristiques sont présentées dans le Tableau 3.9. Trois types de prétraitement de surface ont été testés : un traitement chimique par bain acide, un traitement électrochimique et la combinaison des deux traitements. Ces traitements sont réalisés dans le but d'augmenter la nano-topographie de la surface du graphite et sa surface électrochimiquement active.

Les anodes microbiennes développées par Emma Roubaud étaient très performantes, au regard des densités de courant rapportées dans la littérature scientifique qui sont en moyenne de 0,8 A/m<sup>2</sup> avec des eaux usées domestiques réelles (donnée issue de l'analyse de 48 publications). Au potentiel imposé de -0,1 V vs ECS, les densités de courant anodiques en régime stationnaire étaient de 2,6 A/m<sup>2</sup> pour le prétraitement chimique et 2,1 A/m<sup>2</sup> pour le prétraitement électrochimique et pour le couplage des deux traitements, contre 1,8 A/m<sup>2</sup> pour le contrôle non traité (Roubaud et al., 2021). Le prétraitement électrochimique de la surface du graphite accroît les densités de courant de près de 56% par rapport à une anode microbienne formée sur du graphite non traité. Le traitement acide et l'association des deux prétraitements (acide et électrochimique) augmentent les densités de courant de seulement 17%.

L'objectif premier était de basculer en cathode les électrodes formées par Emma, qui avaient fonctionné pendant plus d'un mois en anode. L'objectif secondaire consistait à observer si l'effet du prétraitement de surface du graphite était également salutaire pour le fonctionnement en cathode.

*Tableau 3.9 : Conditions expérimentales utilisées pour le passage d'une anode microbienne déjà formée au mode cathode dans les eaux usées domestiques.*

<b>Montage expérimental (Emma Roubaud)</b>	
<b>Réacteurs « standards »</b>	Electrode de travail : graphite + tige en titane
<b>600 mL</b>	Contre électrode : Grille en acier inoxydable
	Electrode de référence : ECS
<b>Réservoir</b>	Débit de recirculation : 1,5 mL/min
<b>Flacon en verre de 2L</b>	(HRT = 6,7h)

Techniques électrochimiques		
CA	CV	
E = -0,1 V vs ECS	3 cycles à 1 mV/s de -0,5 à 0,2 V vs ECS	
CAs successives de 1h, de 0 à -0,4 V vs ECS, avec un pas de 0,05 V		
Traitements de surface		
Sans traitement (x2)	Réacteurs contrôles	
Traitement chimique (x2)	Bains d'acide (B. Li et al., 2014)	
Traitement électrochimique (x2)	Polarisation cyclique entre -1 et +1 V vs ECS à 30 mV/s puis polarisation continue à +1,5 V vs ECS pendant 1 h répété 24 fois (Cercado-Quezada et al., 2011)	
Traitement chimique + électrochimique (x2)		
Conditions de bullage		
Etapas	Bullage d'azote	Bullage d'air
Etape 0 (formation des anodes microbiennes)	Continu	-
Etape 1 (12 jours)	-	-
Etape 2 (7 ou 22 jours)	-	Continu

Après 1 mois de fonctionnement en anode sous polarisation à -0,1 V vs ECS (étape 0), le bullage d'azote qui était maintenu en continu pour assurer des conditions anoxiques a été arrêté. Les réacteurs ont été ouverts pour faciliter l'accès de l'oxygène. Pendant 12 jours, les réacteurs sont laissés ouverts et sous circulation en boucle de la solution constituée d'eaux usées hydrolysées. Les courants sont instables et au moins dix fois plus faibles que lorsque les réacteurs étaient sous azote, avec une densité de courant allant de  $0,06 \pm 0,03 \text{ A/m}^2$  pour une des électrodes non prétraitées et une des électrodes ayant subi un traitement chimique, à  $0,39 \pm 0,24 \text{ A/m}^2$  pour l'une des électrodes prétraitée électrochimiquement. Les courants demeurent anodiques, signe qu'à ce stade, sans aération forcée, il n'a pas encore été possible de basculer les anodes microbiennes en cathodes.

Une aération forcée sous la forme d'un bullage d'air en continu a été mise en place au jour 12. Aussitôt, les courants ont tous évolué vers des courants cathodiques (Figure 3.6). Une des électrodes prétraitées à l'acide donne les courants cathodiques les plus élevés, avec un pic à  $-0,2 \text{ A/m}^2$ . L'une des électrodes ayant subi les deux prétraitements (chimique et électrochimique) donne aussi un courant élevé avec un pic à  $-0,1 \text{ A/m}^2$ . C'est le courant cathodique le plus stable, il reste à  $-0,1 \text{ A/m}^2$  du jour 12 au jour 18. Cependant, pour des raisons techniques et de logistique, un duplicat de chaque expérience a dû être arrêté au jour 19. Les autres duplicats ont été maintenus pendant 15 jours supplémentaires en arrêtant les pompes de recirculation la nuit pour pallier à tout débordement des réacteurs.

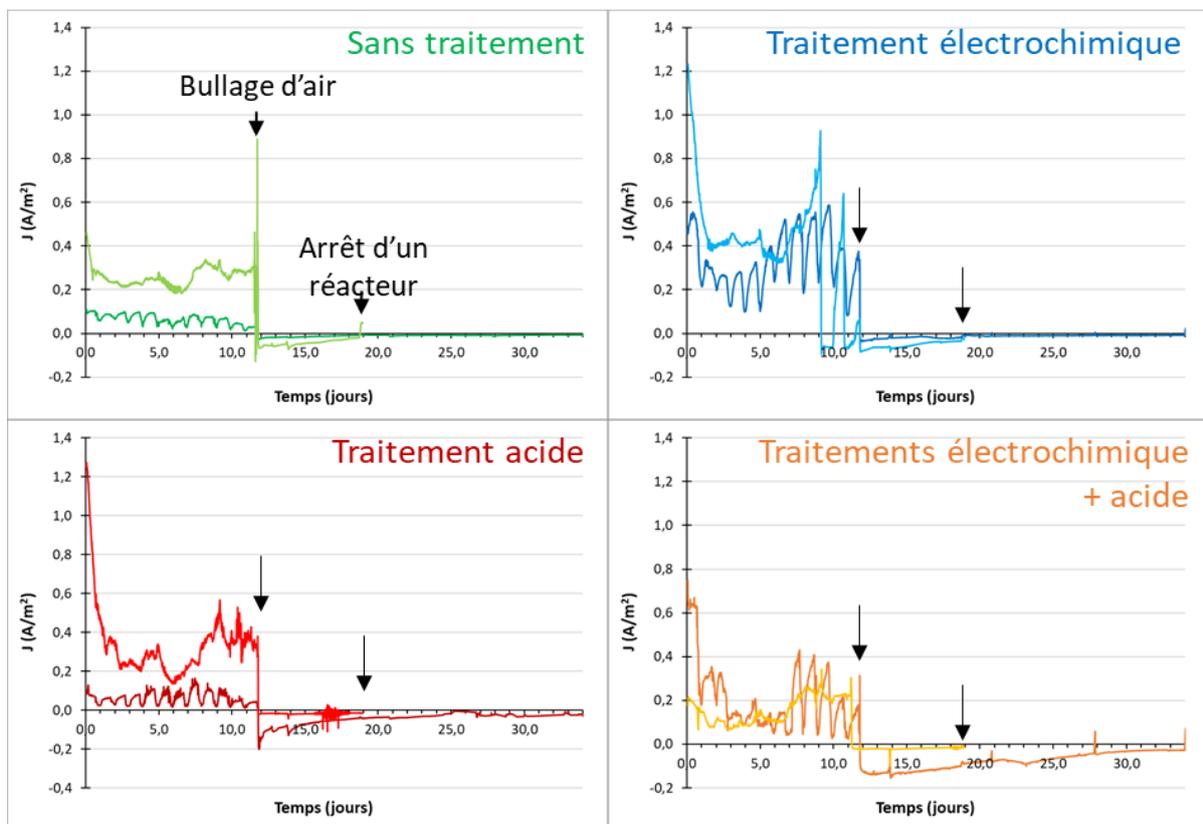


Figure 3.6 : CAs sous polarisation à  $-0,1 \text{ V vs ECS}$  lors du passage d'une anode microbienne en graphite à une cathode dans des eaux usées domestiques. Le graphite avait subi un traitement électrochimique ou acide ou un couplage des deux traitements (duplicats).

Les CVs réalisées au cours de cette expérience affichent des courants capacitifs très importants (Figure 3.7) qui sont la conséquence des prétraitements de la surface du graphite. Le courant capacitif, directement lié à la capacité de double couche, représente la capacité de stockage de charges de l'interface électrode-solution. La présence de courant capacitif a rendu plus compliquée la comparaison des performances des différentes électrodes au travers des

CVs. A l'inverse du courant faradique, le courant capacitif est transitoire, il ne dure que le temps que les charges s'équilibrent à l'interface électrode-solution. La méthode de caractérisation des électrodes a donc été modifiée en réalisant des polarisations successives à différentes valeurs de potentiel appliqué. Pour chaque palier de potentiel on attend que le courant se stabilise afin de ne mesurer que le courant faradique. Grâce à ces mesures de courant en régime stationnaire, il est possible de recréer graphiquement les points d'une voltammétrie,  $I=f(E)$ , en régime stationnaire, sans le courant capacitif.

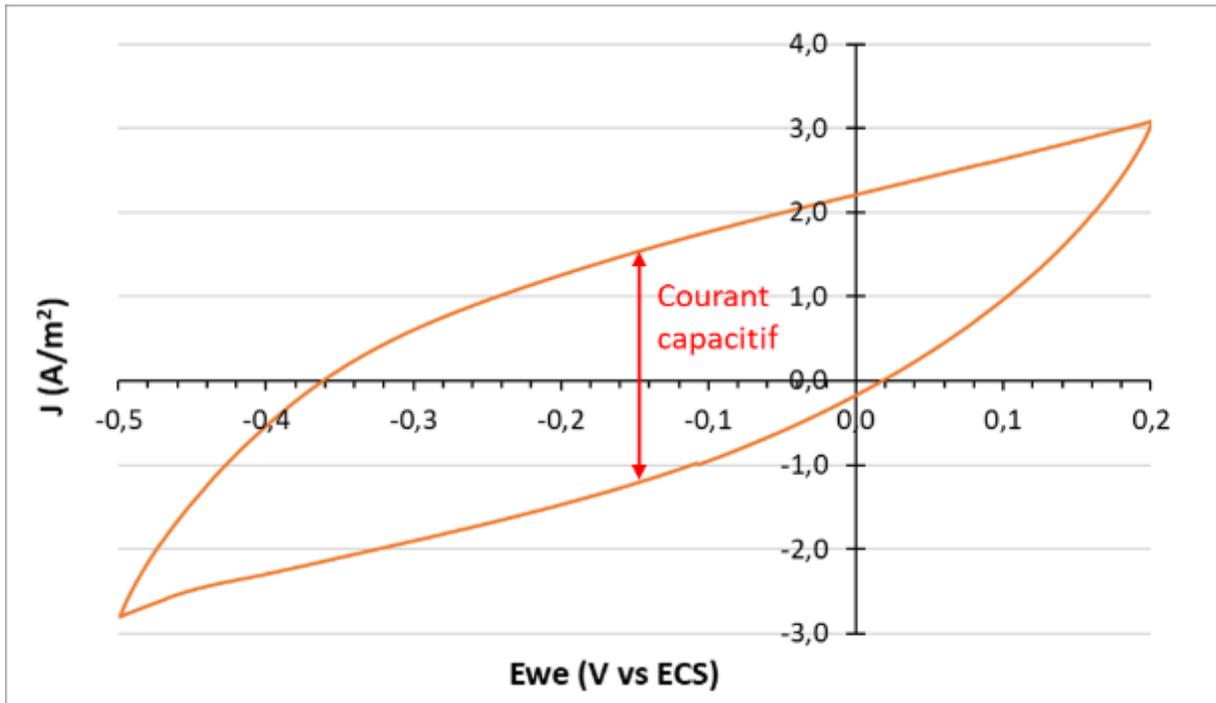


Figure 3.7 : Permutation d'une anode déjà formée à une cathode immergée de réduction de l'oxygène. Exemple de CV obtenue, avec une vitesse de balayage de 1 mV/sec entre -0,5 et +0,2 V vs ECS, avec une électrode en graphite ayant subi les deux prétraitements, au jour 1 sur la Figure 3.6.

Une première polarisation à 0 V vs ECS est réalisée afin de déterminer le temps nécessaire pour atteindre un courant stationnaire. Les électrodes non prétraitées et celles prétraitées dans un bain d'acide se stabilisent presque instantanément. Les électrodes avec un prétraitement électrochimique produisent un courant stable au bout d'environ 30 minutes. Le régime transitoire est encore plus long pour les électrodes en graphite prétraitées à la fois avec les traitements acide et électrochimique.

Lors de l'application d'un potentiel ou du changement de la valeur du potentiel appliqué, le temps nécessaire au rééquilibrage des charges interfaciales est extrêmement court, de

l'ordre de la seconde pour une électrode propre. Les temps sont plus longs lorsqu'un biofilm participe à l'équilibre des charges à la surface de l'électrode. En effet, les biofilms peuvent stocker des charges et augmenter ainsi la capacité de l'interface et son temps de charge et décharge. Deux mécanismes de stockage de charge ont été identifiés pour les anodes microbiennes, le stockage d'ions grâce aux exo-polymères, des polyhydroxyalcanoates (PHA) par exemple, et le stockage sous forme de composants redox, comme les cytochromes ou les flavines (ter Heijne et al., 2021).

Ces propriétés capacitives, comme toutes les caractéristiques du biofilm, dépendent de nombreux facteurs tels leur composition chimique, les EPS présents, l'activité métabolique, l'épaisseur du biofilm mais aussi des composés redox impliqués dans les échanges électroniques extracellulaires (Pinck et al., 2020). Les différences constatées ici révèlent certainement des propriétés capacitives des biofilms très différentes suivant le traitement de surface qu'a subi l'électrode.

La durée de chaque polarisation a donc été fixée à 1 heure pour la suite. Des polarisations successives, par paliers d'une heure, sont alors réalisées de 0 à -0,4 V vs ECS, avec un pas de 0,05 V. La réponse en densité de courant est enregistrée au cours du temps pour chacun des réacteurs (Figure 3.8).

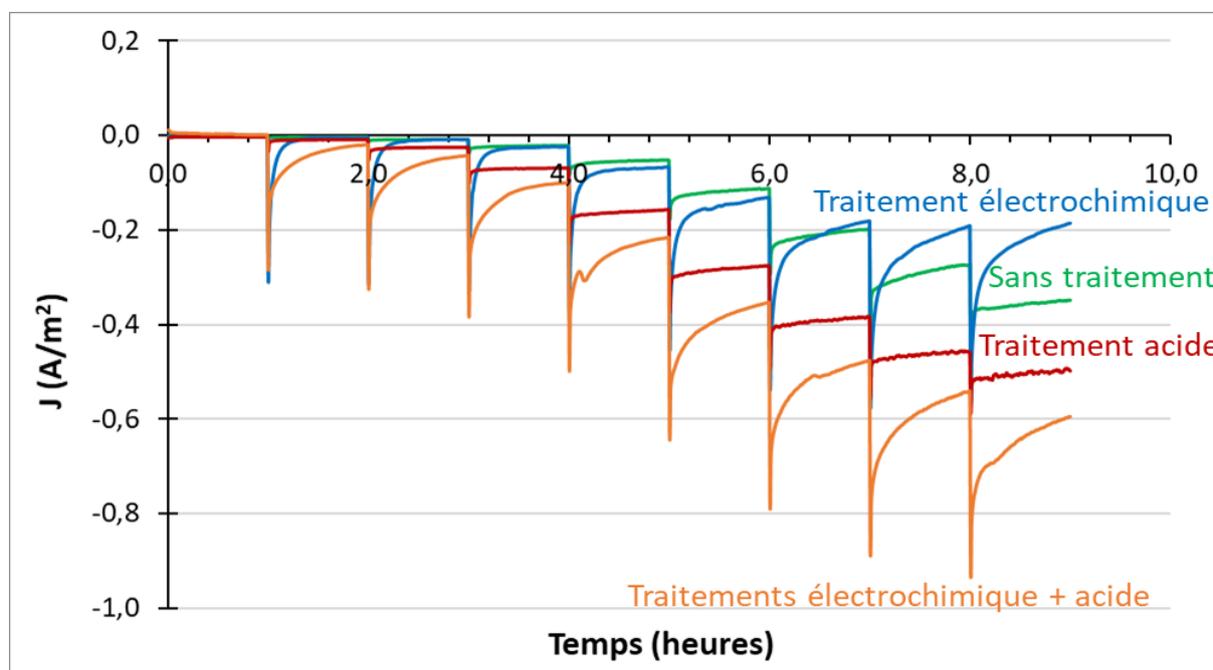


Figure 3.8 : CAs obtenues avec des polarisations successives de 0 à -0,4 V vs ECS, avec un pas de 0,05 V toutes les heures, après le passage d'une anode microbienne en graphite à une cathode dans des eaux usées domestiques. Le graphite avait subi un traitement électrochimique ou acide ou un couplage des deux traitements.

Les résultats étant difficilement interprétables sous cette forme, les densités de courant stationnaire mesurées à la fin de chaque palier d'une heure ont été représentées en fonction du potentiel de polarisation (Figure 3.9).

La cathode ayant subi les deux prétraitements (chimique et électrochimique) donne les densités de courant de réduction les plus élevées atteignant  $-0,6 \text{ A/m}^2$  au potentiel de  $-0,4 \text{ V}$  vs ECS. L'électrode prétraitée électrochimiquement donne au contraire les moins bons résultats, avec des densités de courant trois fois moins élevées. Celles-ci sont même inférieures à celles produites par l'électrode formée sur du graphite non prétraité.

Il est intéressant de mettre ces résultats en perspective avec ceux des anodes microbiennes d'Emma Roubaud. Les anodes microbiennes formées par Emma présentant les meilleures performances anodiques (traitement électrochimique) sont celles qui donnent ici les moins bonnes cathodes. A l'inverse, le couplage des traitements chimique et électrochimique qui ne permettait d'améliorer les performances de l'anode microbienne que de 17% donne ici les courants cathodiques les plus élevés.

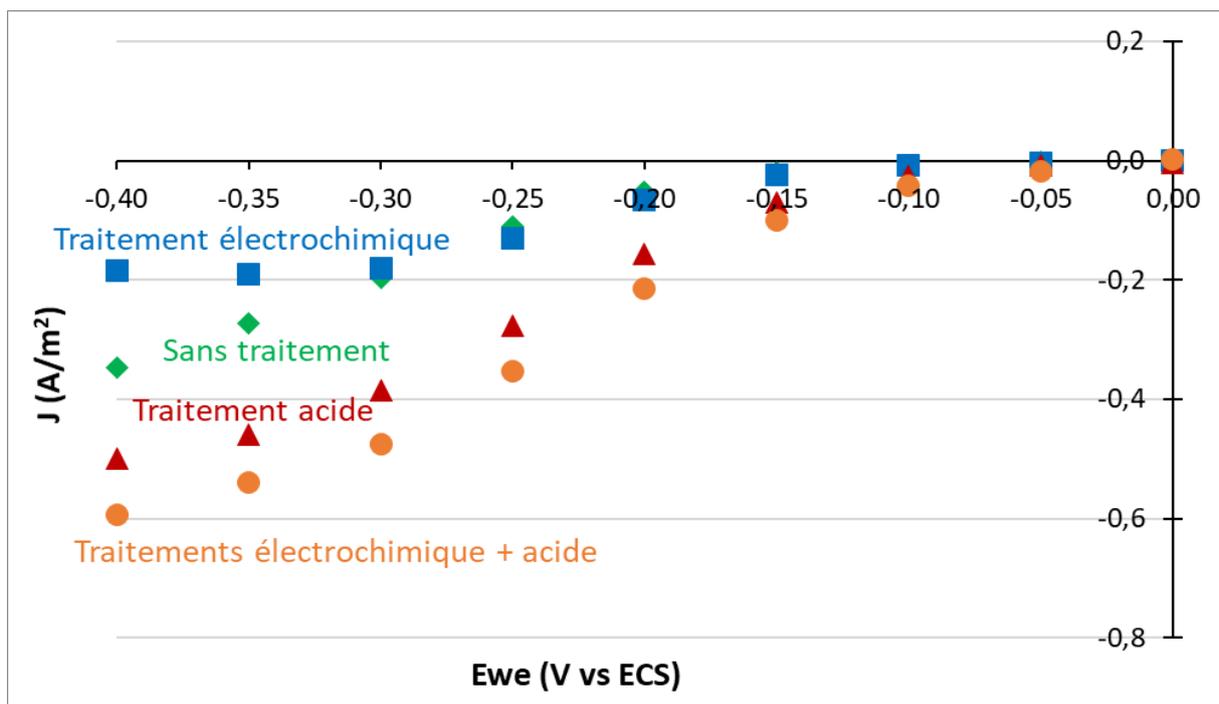


Figure 3.9 : Densité de courant mesurée à la fin de chaque palier de polarisation, en fonction du potentiel imposé à l'électrode de travail, après le passage d'une anode microbienne en graphite à une cathode dans des eaux usées domestiques. Le graphite avait subi un traitement électrochimique ou acide ou un couplage des deux traitements.

L'analyse des populations microbiennes a montré que la famille majoritaire était celle des *Geobacteraceae*, très souvent présente dans les systèmes électro-microbiens. L'abondance de cette famille était de 65% pour les anodes microbiennes formées après le prétraitement électrochimique, 69% pour les contrôles et 77% pour les électrodes prétraitées à l'acide ou ayant subi et le couplage des deux prétraitements (Roubaud et al., 2021). Il semble donc qu'une abondance plus importante de cette famille soit corrélée à une réduction de l'oxygène plus efficace. Cependant cette information est à nuancer puisque ce sont des abondances relatives, la quantité de cellules n'est pas prise en compte. Il est fort possible que les anodes microbiennes les plus performantes aient développé un biofilm anaérobie permettant une oxydation optimale de la matière organique mais sensible à l'oxygène. L'arrivée d'oxygène aurait alors été particulièrement néfaste au biofilm anodique anaérobie.

Avec le couplage des prétraitements acide et électrochimique, l'évolution chimique de l'électrode et l'apparition de groupements C-O, C=O et O=C-O à la surface du graphite ont été préjudiciables à la formation d'anodes microbiennes efficaces (Roubaud et al., 2021). En revanche, nous constatons ici que ce double prétraitement donne les meilleures performances cathodiques. Il est donc possible que les groupements formés à la surface du graphite catalysent la réduction abiotique de l'oxygène à la surface du graphite. Il y a très probablement une réduction à la fois biotique et abiotique de l'oxygène, avec sans doute une prédominance de la réduction abiotique, puisque sa catalyse par la formation de groupements chimiques adéquats augmente considérablement les performances de la cathode.

Au-delà de l'influence des prétraitements du graphite, nous avons démontré qu'il est possible de passer d'une anode microbienne performante à une cathode de réduction de l'oxygène dans un milieu composé d'eaux usées domestiques. Cette conclusion n'était pas assurée a priori, car on lit souvent dans la bibliographie que les espèces capables de TEE les plus efficaces sont anaérobies, voire anaérobies strictes, comme par exemple les espèces du genre *Geobacter*. La seconde information importante à tirer de ces essais concerne l'impact significatif du prétraitement de surface des électrodes en graphite sur les performances des cathodes de réduction de l'oxygène, avec un effet inverse de celui qu'il a sur les anodes microbiennes. Ce dernier résultat serait toutefois à confirmer car, comme indiqué plus haut, des problèmes techniques nous ont empêchés de dupliquer ces expériences.

Plusieurs études ont rapporté une amélioration de la réduction de l'oxygène pour des cathodes ayant subi des traitements acides (Duteanu et al., 2010; Erable et al., 2009a). D'autres traitements chimiques impliquant KOH ou H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> sont possibles et permettraient d'améliorer la structure des pores, de diminuer la résistance et les groupes fonctionnels

nuisibles tels que R-COOR et R-OH tout en augmentant les groupes C=O et C-O qui pourraient être liés à l'amélioration des réactions de réduction de l'oxygène (Wang et al., 2017).

### 3.2 Rappel des conditions opératoires utilisées pour les trois essais de formation d'une électrode bidirectionnelle

A partir des conclusions des expériences précédentes, les trois essais successifs décrits ci-dessous ont visé à optimiser le protocole de formation d'une électrode microbienne capable de TEE bidirectionnels. Le montage expérimental est constitué, comme pour l'optimisation de la cathode microbienne, d'un montage à trois électrodes et d'un réacteur « standard » décrits respectivement dans les parties 2.2.1 et 2.1.1 du chapitre 2. Ici l'électrode de travail est constituée de feutre de carbone non traité. L'objectif est de former une anode microbienne et d'optimiser le passage à la cathode de réduction d'oxygène. Pour chacun des trois essais, 4 réacteurs (2 contrôles avec eau + KCl et 2 avec EU + 5% de BA) sont lancés en parallèle, en batch, selon les conditions expérimentales décrites dans le Tableau 3.10. Les essais n°1, 2 et 3 ont duré respectivement 6, 13 et 33 jours.

Tableau 3.10 : Conditions expérimentales utilisées pour la mise en œuvre des électrodes microbiennes capables de transferts d'électrons extracellulaires bidirectionnels.

Montage « Electrode à l'interface » (chapitre 2 – parties 2.1.1 et 2.2.1)		
Réacteurs « standards », Electrode de travail : feutre de carbone 9 cm <sup>2</sup> + tige en titane		
Essais n°1, 2 & 3	Contre électrode : tissu de carbone + fil de platine	
700 mL	Electrode de référence : ECS	
Techniques électrochimiques (chapitre 2 – parties 3.1.1 et 3.1.3)		
CA	CV	
E = -0,1 V vs ECS	3 cycles à 1 mV/s de -0,4 à 0,6 V vs ECS	
Conditions de bullage		
	Bullage d'azote	Bullage d'air
Essai n°1 (6 jours)	Continu	-
Essai n°2 (13 jours)	30 min au début	4 h - jour 7
Essai n°3 (33 jours)	1 h au début	30 min - jour 26

### 3.3 Résultats expérimentaux

#### 3.3.1 Essais n°1 et 2

Pour le premier essai, un bullage continu d'azote est réalisé dans les réacteurs dès le début des expériences. L'anode microbienne se forme donc dans des conditions anoxiques mais, après 5 jours, le bullage, assez intense, a entraîné une évaporation importante dans les réacteurs et a mis l'électrode de référence hors du milieu réactionnel. La polarisation des électrodes a été perturbée et surtout le potentiel imposé n'était plus contrôlé (Figure 3.10). L'expérience a alors été arrêtée prématurément avant même la tentative de passage en cathode.

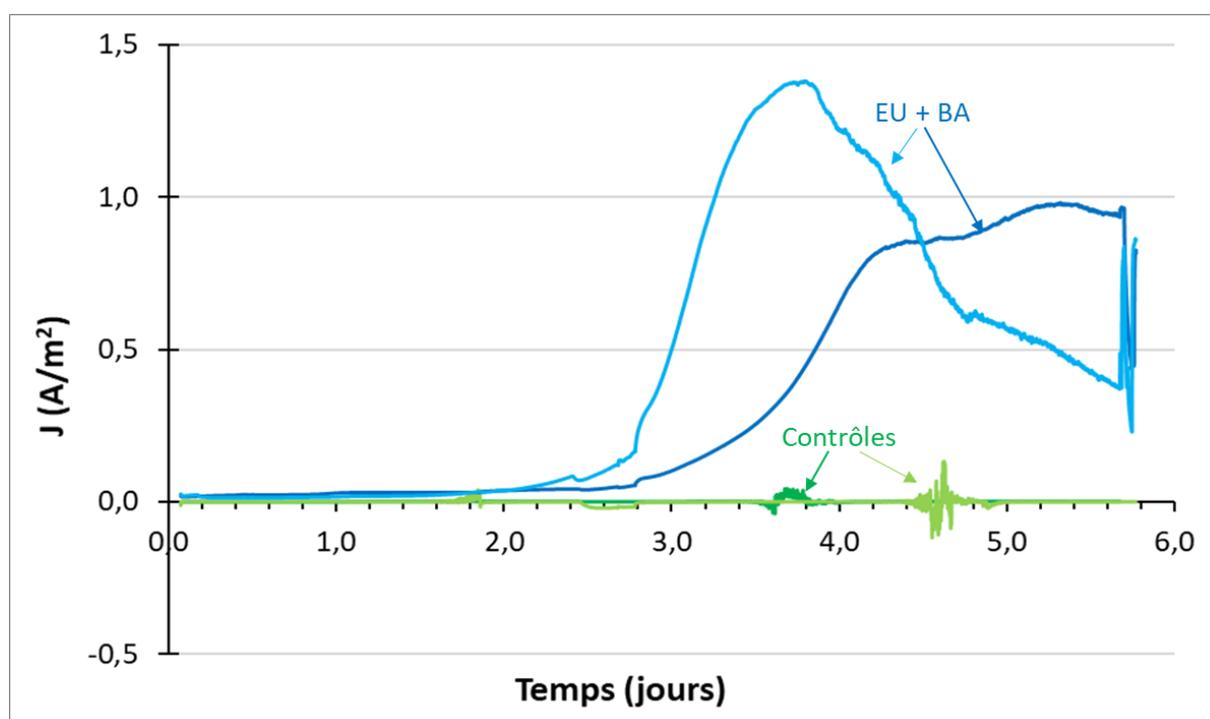


Figure 3.10 : Formation d'une électrode bidirectionnelle en feutre de carbone. CAs obtenues avec une polarisation à  $-0,1$  V vs ECS lors de l'essai n°1 (duplicats pour chaque condition).

Le deuxième essai a été réalisé en remplaçant le bullage continu d'azote par une phase de bullage beaucoup plus courte, de seulement 30 min, en tout début d'expérience. Les réacteurs sont ensuite maintenus fermés pour limiter l'entrée de l'oxygène de l'air. La désaération du milieu réactionnel de 30 minutes a probablement été insuffisante puisque la densité de courant maximale qui a été atteinte était environ 10 fois plus faible que celle observée lors de l'essai n°1 (Figure 3.10). Malgré les précautions prises, il faut sans doute supposer qu'une entrée d'air a eu lieu et a entraîné une consommation parasite importante de

la DCO<sub>s</sub>. Au jour 3, la DCO<sub>s</sub> dans les réacteurs avec EU + BA est de 124 ±12 mg d'O<sub>2</sub>/L contre 191 au début de l'expérience (Tableau 3.11). Au jour 7, elle n'est plus que de 103 ±13 mg d'O<sub>2</sub>/L. Ces valeurs sont sans doute insuffisantes pour maintenir le courant anodique.

Le bullage d'air de 4 heures effectué au jour 7 permet un passage en cathode quasi-immédiat. Bien que les courants restent très faibles, la CA donne des courants cathodiques jusqu'à la fin de l'expérience (Figure 3.11). Les 4 heures de bullage d'air ont donc été suffisantes pour faire basculer l'anode en cathode de façon pérenne.

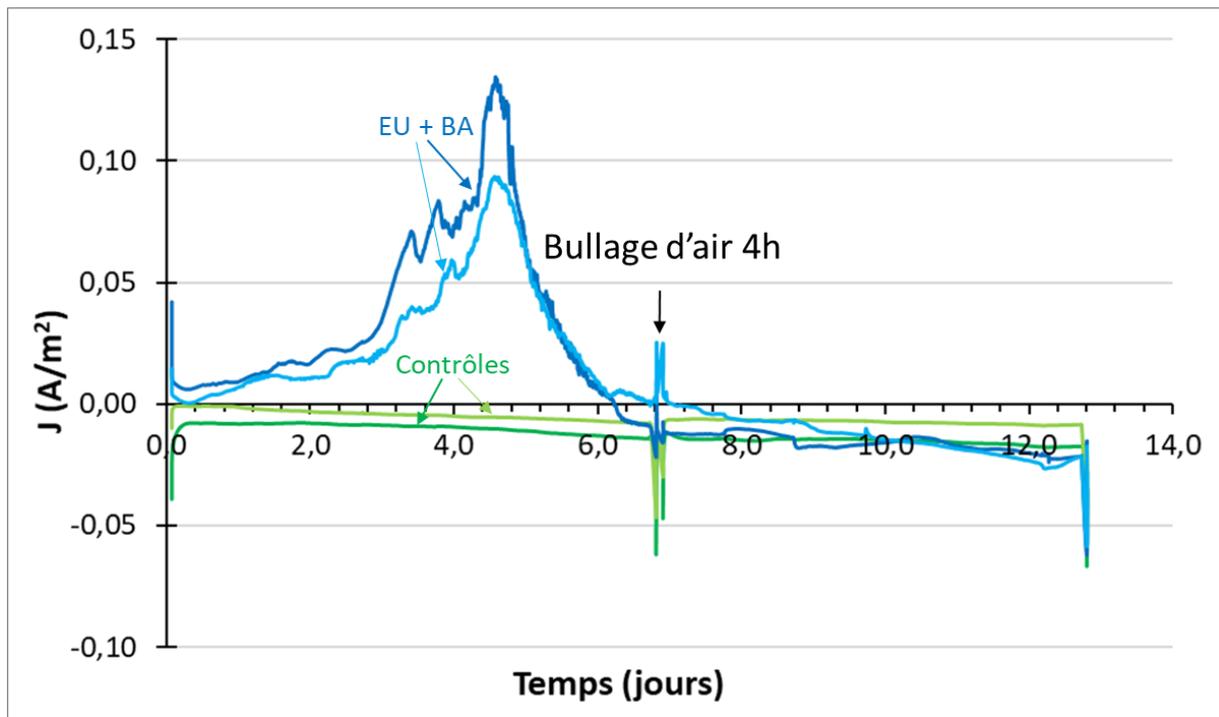


Figure 3.11 : Formation d'une électrode bidirectionnelle en feutre de carbone. CAs obtenues avec une polarisation à -0,1 V vs ECS lors de l'essai n°2 (duplicats pour chaque condition).

Au moment du passage en cathode au jour 7, la DCO<sub>s</sub> était faible (103 ±13 mg d'O<sub>2</sub>/L, Tableau 3.11). Cette faible concentration explique que le courant ait chuté avant même le bullage d'air. La matière organique a probablement été dégradée par un processus aérobie parasite entrant en compétition avec l'oxydation bioélectrochimique par le biofilm et la croissance du biofilm. Le rendement faradique entre le début de l'expérience et le jour 7 est calculé grâce à la formule :

$$\text{Rendement faradique} = \frac{Q \times 32.10^3}{ne^-_{DCO} \times 0,7 \times \Delta DCO_s \times F} \quad (1)$$

Avec :

- Q, la quantité d'électricité passée dans le circuit pendant une semaine (C)
- $\Delta\text{DCO}_s$ , la quantité de  $\text{DCO}_s$  consommée pendant la même période (mg d' $\text{O}_2/\text{L}$ )
- F, la constante de Faraday (= 96 485 C/mol)
- $ne^-_{\text{DCO}}$ , le nombre de mole d'électrons extraits d'une mole de DCO, soit 4.

Les valeurs de quantité d'électricité de l'ordre de  $1,7 \cdot 10^4$  C donnent un rendement faradique de 15%. La part de la matière organique dégradée par le biofilm est donc minime puisque 85% de la matière organique est consommée par des réactions parasites. Il faut noter que ce calcul confirme que nous travaillons dans des conditions électro-analytiques adéquates. En effet, la taille des électrodes a été choisie suffisamment petite ( $9 \text{ cm}^2$ ) et le volume total de solution suffisamment grand (700 mL) pour que le phénomène électrochimique puisse être étudié sur de longues périodes sans perturber le milieu. Hélas, la consommation parasite de la  $\text{DCO}_s$  a limité la durée de l'expérience.

La faible  $\text{DCO}_s$  explique certainement le passage aisé en cathode. Comme on l'a observé dans la partie 2.2.3 avec le milieu EU+BA aéré les faibles charges en  $\text{DCO}_s$  semblent faciliter le passage en cathode.

Tableau 3.11 : DCO soluble initiale et finale obtenues lors de l'essai n°2 de formation d'une électrode bidirectionnelle en feutre de carbone.

Milieu		Eau + KCl		EU + BA	
		1	2	1	2
DCO soluble (mg d' $\text{O}_2/\text{L}$ )	Réacteur				
	Initiale	< 15		191	
	Avant $\text{O}_2$	< 15	< 15	55,9	82,7
	Finale	< 15	< 15	47,2	53,9

EU : eaux usées ; BA : Boues activées

La comparaison des CVs initiales et finales des électrodes microbiennes montre des courants cathodiques plus importants en fin d'expérience (Figure 3.12). Toutefois, les courants cathodiques produits par les électrodes microbiennes sont inférieurs à ceux des contrôles réalisés en eau et KCl. Il est possible que la phase d'aération ait simplement dégradé le biofilm anodique, et que les courants cathodiques soient là encore dus à la réduction abiotique de

l'oxygène. Les courants cathodiques moindres pour les électrodes microbiennes pourraient être dus au masquage d'une partie de la surface de l'électrode par un biofilm inactif, ou à la compétition avec des bactéries aérobies qui consomment l'oxygène. En effet la DCO<sub>s</sub> pendant la phase cathodique était plus importante dans les réacteurs contenant EU + BA que dans les contrôles (60 ±16 mg d'O<sub>2</sub>/L vs <15 mg d'O<sub>2</sub>/L). Elle pouvait donc soutenir une consommation parasite plus intense de l'oxygène que dans les contrôles, comme le prouve la diminution de la DCO<sub>s</sub> dans les réacteurs contenant le milieu EU + BA pendant les 6 jours de fonctionnement en cathode (Tableau 3.11).

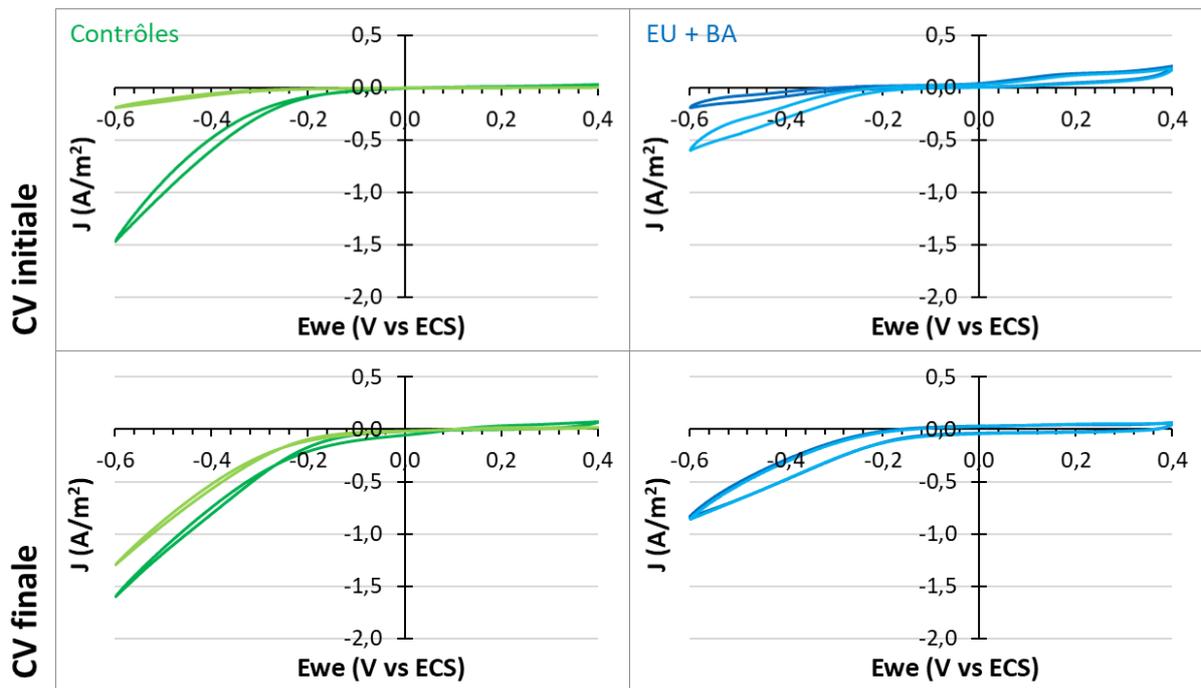


Figure 3.12 : Formation d'une électrode bidirectionnelle en feutre de carbone. CVs initiales et finales obtenues lors de l'essai n°2 avec un balayage à 1 mV/sec entre -0,6 et +0,4 V vs ECS (duplicats).

Ces résultats sont prometteurs mais les performances des cathodes microbiennes restent encore très limitées, probablement à cause du développement insuffisant du biofilm durant la phase initiale anodique. Le troisième essai a donc été réalisé en tentant d'améliorer la phase de formation de l'anode microbienne.

### 3.3.2 Essai n°3

Dans cet essai, la désaération du milieu réactionnel a été réalisée pendant 1 heure, au lieu de 30 minutes. Dès le début de l'expérience une des électrodes a un comportement cathodique alors que l'autre a le comportement anodique attendu (Figure 3.13). Du jour 4 au jour 10, avec l'électrode ayant un comportement cathodique, les courants cathodiques augmentent avec une valeur moyenne de  $-0,38 \pm 0,20$  A/m<sup>2</sup> et même un pic à  $-0,96$  A/m<sup>2</sup>. Cependant, le bruit observé sur la CA (Figure 3.13 courbe bleue foncée) pendant cette période laisse penser que ces valeurs pourraient être dues à un problème avec l'électrode de référence (désaturation, défaut, colmatage du fritté, etc.). Il peut aussi être supposé que ce réacteur n'ait pas été hermétique, dès le début de l'expérience.

Dans le second réacteur, une anode microbienne semble bien s'être formée. Elle présente des densités de courant qui restent cependant faibles avec un maximum de  $0,2$  A/m<sup>2</sup>, alors que  $1,4$  A/m<sup>2</sup> avaient été atteints dans l'essai n°1 (Figure 3.10). Il semble se confirmer que le bullage d'azote, s'il n'est pas continu, ne permet pas de former une anode microbienne performante, sans doute parce que les réacteurs utilisés ne sont pas hermétiques. On note d'ailleurs que, lorsque toute la DCO<sub>s</sub> a été consommée, les électrodes ont un léger comportement cathodique qui étaye l'hypothèse de la présence d'oxygène dans les réacteurs.

Un bullage d'air a été réalisé pendant 30 minutes au jour 26. Dans l'essai précédent, le bullage d'air avait été réalisé pendant 4 heures. Nous souhaitons déterminer ici si un bullage d'air plus court serait suffisant pour basculer l'électrode en cathode. Ce bullage court n'a eu que peu d'effet. Un bullage d'air de 30 minutes est probablement insuffisant.

Au jour 27 les électrodes ont été remplacées par de nouvelles électrodes propres. Cet essai avait deux objectifs, d'une part différencier la catalyse cathodique liée à la présence du biofilm de processus qui pourraient être liés à des composés en solution, et d'autre part observer l'effet de l'air emprisonné dans le feutre sur les performances cathodiques.

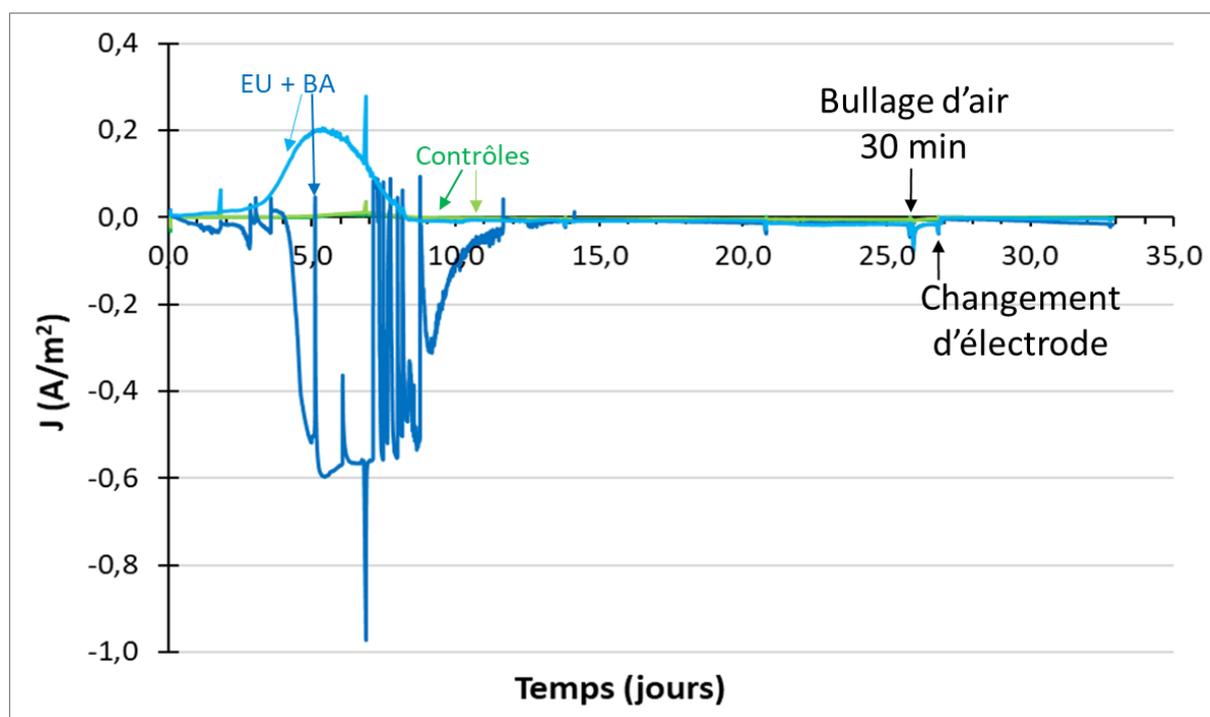


Figure 3.13 : Formation d'une électrode bidirectionnelle en feutre de carbone. CAs obtenues avec une polarisation à  $-0,1 V$  vs ECS lors de l'essai n°3 (duplicats pour chaque condition).

La Figure 3.14 présente les CVs réalisées au début de l'expérience juste après le bullage initial à l'azote (J1), avant l'étape de bullage d'air (J25), entre l'étape de bullage et le changement d'électrode (J26) et après le changement d'électrode (J26). Ces CVs montrent tout d'abord qu'il n'y avait aucune réaction de réduction dans 3 des 4 réacteurs sur la CV initiale. Le bullage initial d'azote de 1 heure a donc été efficace. Ces premières CVs confirment aussi une entrée d'air parasite et/ou une désaération insuffisante dans l'un des réacteurs contenant le milieu EU + BA qui, lui, présente un fort comportement cathodique.

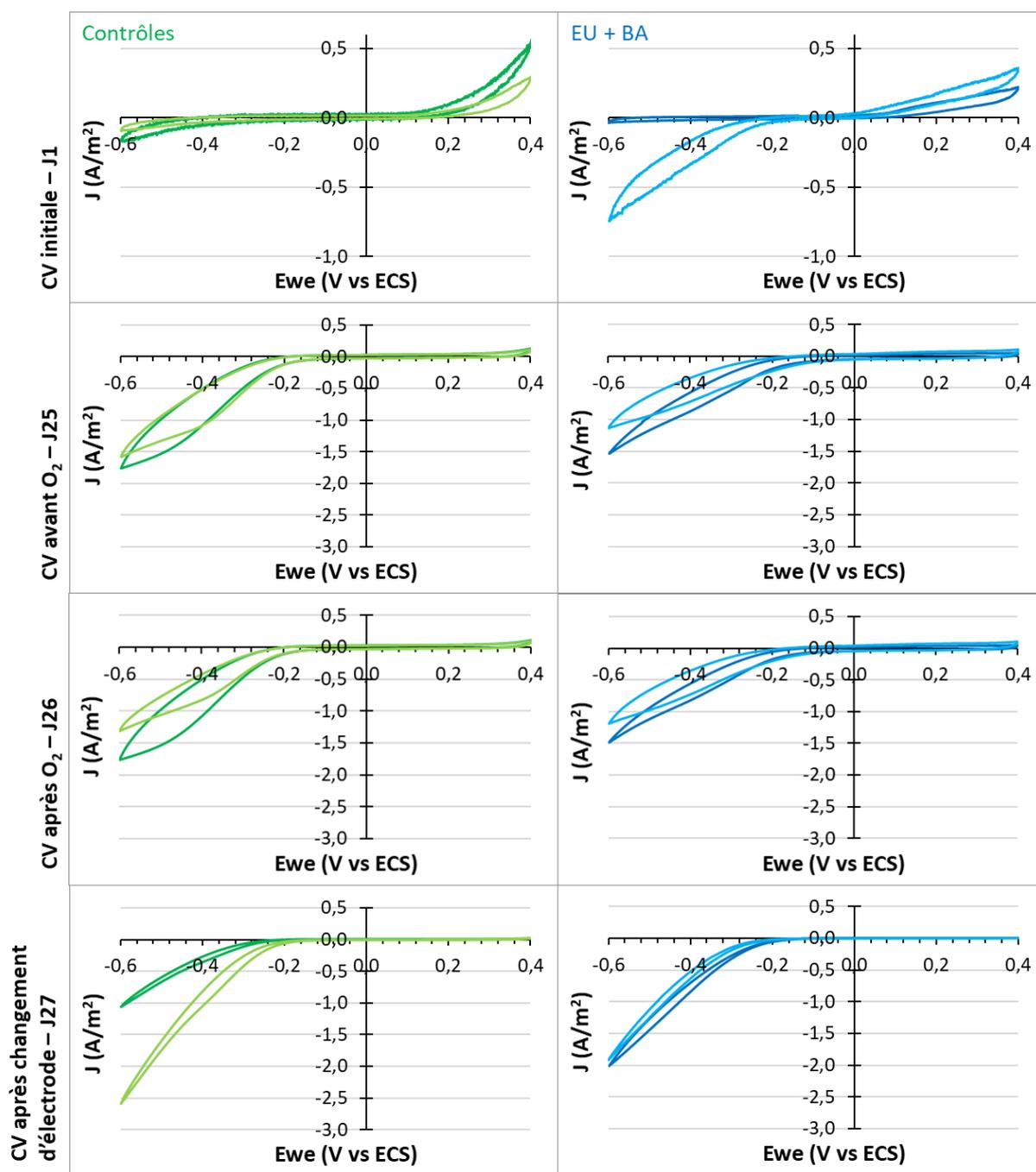


Figure 3.14 : Formation d'une électrode bidirectionnelle en feutre de carbone. CVs initiales, avant bullage, entre bullage et changement d'électrode et après changement d'électrode obtenues lors de l'essai n°3 avec un balayage à 1 mV/sec entre -0,6 et +0,4 V vs ECS (duplicats).

Les CVs intermédiaires et finales présentent toutes des courants de réduction avec des valeurs inférieures à  $-1,0 \text{ A/m}^2$  à un potentiel d'électrode de  $-0,6 \text{ V vs ECS}$ . Les CVs avant et après bullage d'air sont identiques, signe que le bullage d'air n'a effectivement rien apporté.

En revanche, la réduction de l'oxygène semble plus importante pour les CVs obtenues avec le feutre vierge en fin d'expérience dans le milieu EU + BA et dans un des contrôles. Comme évoqué précédemment, cela est dû à l'oxygène de l'air emprisonné dans le feutre neuf. La réduction abiotique de l'oxygène, en présence d'une quantité importante d'oxygène, est plus importante qu'avec le biofilm.

Nous avons tenté une interprétation plus précise des différentes CVs en comparant les valeurs de potentiels pour des densités de courant de -0,1, -0,5 et 1,0 A/m<sup>2</sup> (Tableau 3.12). Pour un courant donné, la catalyse de la réduction de l'oxygène se traduit par un déplacement du potentiel vers les valeurs plus élevées.

En début d'expérience, la plupart des électrodes n'atteignent pas -0,1 A/m<sup>2</sup>. Le bullage initial à l'azote a pleinement joué son rôle de désoxygénation. Le seul réacteur à atteindre -0,5 A/m<sup>2</sup> en début d'expérience est le réacteur n°2 qui contient le milieu EU + BA. La désaération n'a pas été efficace, ou mal réalisée, dans ce cas. C'est aussi le réacteur qui a formé une cathode dès le début de la polarisation.

Les CVs du jour 25 atteignent toutes -1,0 A/m<sup>2</sup>. A la densité de courant de -0,1 A/m<sup>2</sup>, les valeurs de potentiel sont de -0,23 et -0,19 V vs ECS respectivement pour les contrôles et les électrodes microbiennes. On pourrait voir dans ce déplacement de 40 mV un début de catalyse dû au biofilm. Toutefois, ce gain est perdu pour les densités de courant plus élevées, puisque les électrodes microbiennes exhibent alors des potentiels plus faibles que les contrôles (-20 mV pour -0,5 A/m<sup>2</sup> et -75 mV pour -0,5 A/m<sup>2</sup>). Les différences sont ténues mais elles semblent indiquer un zeste de catalyse aux densités de courant faibles, qui est perdu lorsque le courant croît. En fait, le biofilm a un double effet : un petit effet catalytique et, en contrepartie, un masquage de l'électrode. Ici, comme évoqué plus haut, la réduction de l'oxygène est essentiellement abiotique. Le frêle effet catalytique apporté par le biofilm ne parvient plus, lorsque la cinétique de la réaction abiotique croît, à compenser la résistance qu'il impose au transfert de l'oxygène vers la surface du graphite.

Comme remarqué précédemment, il n'y a pas de différence notable entre les CVs avant et après bullage d'air. Le changement des électrodes microbiennes par des feutres vierges a un petit effet sur le courant cathodique. Tout d'abord, à la densité de courant la plus faible (-0,1 A/m<sup>2</sup>), le gain catalytique de 40 mV qui était présent à la fois aux jours 25 et 26 avec les électrodes microbiennes est perdu au jour 27 avec les feutres vierges. Ces fragiles 40 mV de gain avec les électrodes microbiennes pourraient donc bien être un signe de catalyse électro-microbienne. Il est difficile de tirer des conclusions sûres pour les densités de courant plus élevées car les valeurs de potentiel présentent plus de dispersion que précédemment. L'état

de surface des électrodes vierges est moins bien contrôlé que l'état de surface obtenu après 25 jours de polarisation. La moindre pollution de la surface, par les manipulations lors de la préparation des électrodes par exemple, peut faire varier les CVs initiales. On peut toutefois remarquer que, dans trois des quatre réacteurs, la densité de courant de  $-1,0 \text{ A/m}^2$  est atteinte à un potentiel légèrement plus élevé que celui des électrodes microbiennes. La Figure 3.14 indique en outre que ces trois réacteurs atteignent des densités de courant de  $-2,0 \text{ A/m}^2$ , alors que ce n'est jamais le cas avec les électrodes microbiennes. Ces valeurs élevées de densité de courant de réduction sont obtenues grâce à l'oxygène de l'air emprisonné dans le feutre neuf.

Tableau 3.12 : Formation d'une électrode bidirectionnelle en feutre de carbone.

Comparaison des potentiels extraits des CVs de la Figure 3.14 pour 3 valeurs de densité de courant. Les CVs ont été enregistrées aux jours 1, 25, 26 et 27 lors de l'essai n°3.

Milieu		Eau + KCl		EU + BA	
		1	2	1	2
E (V vs ECS) pour I = $-0,1 \text{ A/m}^2$	Initial – J1	-0,53	-	-	-0,31
	Avant O <sub>2</sub> – J25	-0,23	-0,23	-0,19	-0,19
	Après O <sub>2</sub> – J26	-0,24	-0,24	-0,20	-0,20
	Après changement d'électrode – J27	-0,31	-0,24	-0,23	-0,27
E (V vs ECS) pour I = $-0,5 \text{ A/m}^2$	Initial – J1	-	-	-	-0,52
	Avant O <sub>2</sub> – J25	-0,35	-0,34	-0,34	-0,39
	Après O <sub>2</sub> – J26	-0,35	-0,37	-0,34	-0,39
	Après changement d'électrode – J27	-0,46	-0,33	-0,35	-0,39
E (V vs ECS) pour I = $-1,0 \text{ A/m}^2$	Initial – J1	-	-	-	-
	Avant O <sub>2</sub> – J25	-0,44	-0,45	-0,48	-0,56
	Après O <sub>2</sub> – J26	-0,44	-0,51	-0,49	-0,54
	Après changement d'électrode – J27	-0,59	-0,41	-0,44	-0,47

EU : eaux usées ; BA : Boues activées

En conclusion, il semble que la réduction de l'oxygène soit très majoritairement assurée par la réaction électrochimique abiotique à la surface du feutre et contrôlée par le transfert de l'oxygène vers le matériau de l'électrode.

### **3.4 Conclusion**

L'expérience préliminaire et les trois essais successifs n'ont pas vraiment permis de définir un protocole optimisé pour former des électrodes capables de TEE bidirectionnels dans les eaux usées domestiques. Les difficultés étaient liées aussi bien au développement de l'anode microbienne qu'au passage vers une cathode microbienne.

Le premier point important porte sur la difficulté de développer une anode microbienne performante en début d'expérience. Lors de l'essai n°1 le bullage d'azote en continu a conduit à des densités de courant de l'ordre de  $1 \text{ A/m}^2$  en 3 à 5 jours mais a entraîné simultanément une évaporation trop importante du milieu réactionnel. Malheureusement, une désaération pendant une période courte de 30 min à 1 h en début d'expérience, réalisée dans le cadre des essais 2 et 3, n'a pas permis d'obtenir des performances satisfaisantes. D'autre part, les anodes microbiennes formées par Emma Roubaud et utilisées pour l'essai préliminaire étaient développées sous un bullage continu à l'azote mais avec un dispositif de recirculation de la solution. La recirculation permettait de maintenir le niveau de solution dans le réacteur, sans se soucier de problème d'évaporation. De plus, la mise en recirculation permet d'opérer avec un plus grand volume de solution (réacteur + réservoir) et donc avec un maintien de la concentration en  $\text{DCO}_s$ . Le mode batch semble ne pas être le plus approprié pour former des anodes microbiennes vraiment performantes avec des eaux usées réelles, c'est-à-dire sans ajout de substrat.

L'autre enseignement à tirer de ces essais consiste à utiliser la consommation de la matière organique pour maîtriser l'alternance des phases anode/cathode. Lorsque la matière organique est disponible, juste après la mise en route ou le changement du réservoir d'eaux usées, l'électrode a un comportement anodique. Le milieu est pratiquement anoxique du fait de la consommation de l'oxygène par les bactéries planctoniques qui ont à leur disposition une grande quantité de matière organique à oxyder. Il faut qu'il n'y ait pratiquement plus de matière organique disponible pour que l'électrode puisse être alimentée en oxygène et que le basculement en mode cathode soit aisé.

## 4 TEE bidirectionnels dans les eaux usées et analyses de population (article 3)

En couplant les informations extraites des essais décrits ci-dessus et l'étude bibliographique sur les TEE bidirectionnels présentés dans le chapitre 1, un protocole a été élaboré pour former des électrodes capables de TEE bidirectionnels dans les eaux usées domestiques. Les résultats de cette étude ont donné lieu à un article publié dans le journal *Bioresource Technology* et intitulé « *Bidirectional microbial electrodes designed in domestic wastewater* ».

L'étude compare deux façons de former les anodes microbiennes, avant de les soumettre à des alternances de phases anodiques et cathodiques. Dans tous les cas, les 8 réacteurs sont en recirculation (circulation de la solution en boucle fermée). Pendant les phases anodiques, 4 réacteurs sur 8 sont sous un bullage continu d'azote alors que les 4 autres sont ouverts à l'air libre.

Les principales conclusions de cette étude sont :

- Le bullage d'azote en continu, couplé à la recirculation de la solution, permet d'obtenir des courants presque deux fois plus élevés que dans les réacteurs sans bullage en phase anodique, avec des densités de courant maximales de 6,4 et 3,1 A/m<sup>2</sup>, respectivement. Dans les réacteurs ouverts les courants anodiques sont logiquement moins élevés à cause de la dégradation de la matière organique par les bactéries aérobies qui entre en compétition avec l'oxydation par le biofilm. En revanche, dans les réacteurs ouverts, le courant en phase cathodique est plus important. Il est probable que le contact avec l'oxygène lors des phases anodiques permet au biofilm de mieux s'adapter au bullage d'air lors des phases cathodiques. Les courants restent stables lors des alternances de phases.
- Les électrodes formées donnent des densités de courant anodique comparables aux plus hautes valeurs reportées dans la bibliographie pour des eaux usées domestiques. De plus, en fin d'expérience, lorsque tous les réacteurs sont placés sous azote, les performances de tous les réacteurs sont similaires. Les biofilms formés dans les réacteurs ouverts sont donc tout aussi performants que ceux formés sous azote. La limitation du courant anodique observée sur les CAs des réacteurs ouverts était uniquement liée à la déplétion du substrat et pas aux propriétés catalytiques des biofilms.

- Les électrodes formées sous azote présentent une majorité de bactéries de la classe des *Gammaproteobacteria* alors que celles formées dans les réacteurs ouverts ont une majorité de *Bacteroidia*. Les *Gammaproteobacteria* présentent des abondances plus importantes dans le milieu de culture, à l'inverse de *Bacteroidia*.
- Les analyses en composantes principales (ACP) montrent que 21% des différences entre les communautés microbiennes sont dues à la localisation : biofilm à l'intérieur de l'électrode en feutre, biofilm à la surface de l'électrode, milieu de culture. Le milieu de culture présente une diversité plus importante. Il semble donc y avoir une sélection bactérienne au niveau de l'électrode. Les biofilms internes et externes présentent plus de similarité entre eux qu'avec la population planctonique.
- L'âge du biofilm ainsi que le bullage d'azote en phase anodique ont moins d'influence sur les communautés, ces paramètres représentent 12% et 11% de la variance entre les échantillons, respectivement. Le biofilm à la fin de sa formation en conditions anodiques (28 jours) est différent du biofilm aux jours 38 et 52, qui a subi une et trois alternances de phases anodique/cathodique. Le biofilm a donc évolué sous l'effet des phases cathodiques.
- L'étude des populations microbiennes a mis en avant une riche diversité tant en termes d'abondance que de variance. Cela est probablement dû au mélange d'espèces bactériennes qui sont sélectionnées par chacune des phases anodique (oxydation de la matière organique) et cathodique (réduction de l'oxygène).
- L'étude a montré qu'il est possible de former des électrodes capables de TEE bidirectionnels dans les eaux usées domestiques, sans ajout de substrat, avec des réacteurs ouverts à l'air libre et qu'elles résistent très bien aux courtes périodes de bullage d'air effectuées pendant les phases cathodiques. Ce système pourra être mis en application pour un biotuba.

## Oxygen-reducing bidirectional microbial electrodes designed in real domestic wastewater

Morgane Hoareau<sup>a</sup>, Benjamin Erable<sup>a</sup>, Olivier Chapleur<sup>b</sup>, Cédric Midoux<sup>b</sup>, Chrystelle Bureau<sup>b</sup>,  
Anne Goubet<sup>b</sup>, Alain Bergel<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratoire de Génie Chimique, Université de Toulouse, CNRS, INP, UPS, Toulouse, France

<sup>b</sup>Université Paris-Saclay, INRAE, PRocédés biOtechnologiques au Service de l'Environnement, 92761 Antony, France

Corresponding author: [alain.bergel@toulouse-inp.fr](mailto:alain.bergel@toulouse-inp.fr) (A. Bergel)

### Highlights

- In anode operation, current density up to 6.4 A.m<sup>-2</sup> were produced in real wastewater.
- Bioanodes formed in open-to-air reactor gave higher O<sub>2</sub>-reduction current when aerated.
- *Gammaproteobacteria*, *Bacteroidia* and *Clostridia* were the three dominant classes.
- Clear distinction between the planktonic and sessile microbial populations.
- Biofilm microbial population mixed both aerobic and anaerobic electroactive species.

### Abstract

Microbial electrodes were designed in domestic wastewaters to catalyse the oxidation of organic matter (anode) and the reduction of oxygen (cathode) alternately. The successive aeration phases (cathode) enhanced the anodic efficiency, resulting in current densities of up to 6.4 Am<sup>-2</sup> without the addition of any substrate. Using nitrogen during the anodic phases affected the microbial populations and the electrodes showed a lower ability to subsequently turn to O<sub>2</sub> reduction than the microbial anodes formed in open-to-air conditions did. No strong difference was observed between internal and external biofilm, both of which showed a very large variety of taxa in terms of abundance as well as variance. They comprised a mix of aerobic and anaerobic species, many of which have already been identified separately in bioelectrochemical systems. Such a large diversity, which had not been observed in aerobic bidirectional bioelectrodes so far, can explain the efficiency and robustness observed here.

### Keywords

Electroactive biofilm, Bioanode, Microbial snorkel, Microbial fuel cell, Microbial population

## 1. Introduction

A platinum electrode polarized at a constant potential (in the range where water electrolysis does not occur) can be an anode when supplied with hydrogen or a cathode when supplied with oxygen. Such bidirectional electron transfer is usual in the domain of abiotic electrochemistry. Microbial electrodes can also achieve bidirectional electron transfer, but generally in fully anaerobic conditions, i.e. by using electron acceptors such as nitrate, sulfate or carbon dioxide in the cathodic mode (Kalathil and Pant, 2016; Xie et al., 2020) rather than oxygen.

Actually, it was initially thought that oxygen was drastically detrimental to exoelectrogen biofilms because it can kill strictly anaerobic exoelectrogen bacteria and, in contrast, it can promote the development of aerobic non-electroactive bacteria. This vision has gradually changed, as some microbial anodes have been observed to tolerate oxic environments while still maintaining high efficiency (Erable and Bergel, 2009) and even to benefit from micro-aeration (Yong et al., 2017; Yang et al., 2018).

A few studies have now demonstrated that microbial electrodes can achieve bidirectional electron transfer with oxygen as the electron acceptor. The aerobic bidirectional electrodes (ABMEs) catalyse the oxidation of organic matter in anoxic conditions and the reduction of oxygen in aerobic conditions (Jiang and Zeng, 2019). ABMEs have already shown great promise for pH stabilisation in microbial fuel cells (MFC). In an MFC, oxidation of the organic matter acidifies the anode, while reduction of oxygen alkalises the cathode.

Both pH drifts result in considerable decrease of the MFC performance (Oliot et al., 2016). Designing an MFC with an ABME in each compartment allows the anode and cathode modes be alternated on each electrode (Cheng et al., 2010; Li et al., 2014). This strategy has proved successful in stabilising the pH value of MFCs around a neutral value for more than 140 days (Strik et al., 2010). A recent study has shown that ABMEs implemented on rotating disks partially exposed to air have great potential for wastewater treatment (Chen et al., 2019a). ABMEs would also inevitably occur in microbial snorkels (Hoareau et al., 2019).

A microbial snorkel can be considered as a short-circuited MFC and can be as simple as a single electrode with its lower part (anode) in the anoxic bottom of a wastewater treatment tank and the upper part (cathode) in the aerated zone of the reactor (Erable et al., 2011). The principle of the microbial snorkel has been successfully implemented in the form of conductive granular beds in constructed wetlands (Aguirre-Sierra et al., 2016; Domínguez-Garay and Esteve-Núñez, 2018; Quejigo et al., 2019). In a snorkel, the frontier between the oxic and

anoxic zones is often not well-defined and can move to a great extent because of the wastewater loading sequence, the application of stirring or not, wind and rain affecting the outdoor wetlands, etc. In consequence, although it has not been pointed out in the literature so far, ABMEs must inevitably be created in the fuzzy anoxic/oxic zone of microbial snorkels.

In spite of such a variety of applications, the number of studies devoted to ABMEs remains limited. Most of the studies have used synthetic media (Freguia et al., 2008; Strik et al., 2010; Cheng et al., 2010; Li et al., 2014; Sun et al., 2015; Yu et al., 2015). Only two have used a natural medium, leachate from garden compost (Blanchet et al., 2014) or wastewater (Chen et al., 2019a). All have added an artificial substrate: acetate (Freguia et al., 2008; Cheng et al., 2010; Strik et al., 2010; Blanchet et al., 2014; Yu et al., 2015) or glucose (Li et al., 2014; Sun et al., 2015), as the carbon source. Only a few studies have explored the microbial populations related to ABMEs.

The purpose of the present study was to assess the possibility of designing ABMEs in raw domestic wastewater and to gain information for possible future application of ABMEs in wastewater treatment. The study intended to determine the effect of the anoxic/oxic conditions on the electrode performance and biofilm composition.

The experiments were carried out in electroanalytical conditions in order to fix as many parameters as possible (Rimboud et al., 2014) apart from the anoxic/oxic conditions. In particular, the potential of the electrodes was controlled at a constant value by using 3-electrode setups. The potential of -0.1 V/SCE was chosen in these cases because this value has provided both efficient microbial anodes (Roubaud et al., 2019) and O<sub>2</sub>-reducing microbial cathodes (Milner et al., 2016) when activated sludge was used as the inoculum. Electrodes had a small surface area (2 × 4 cm<sup>2</sup>) in comparison to the volume of solution (more than 2.5 L) in order to stabilise the chemical composition of the solution over long periods. The cathode phases were brought about simply by setting forced aeration. The microbial populations were analysed in relation to biofilm age, biomass location – on the outer surface or inside the carbon felt electrodes – and the level of anoxia maintained during the anode phases.

## **2. Materials and methods**

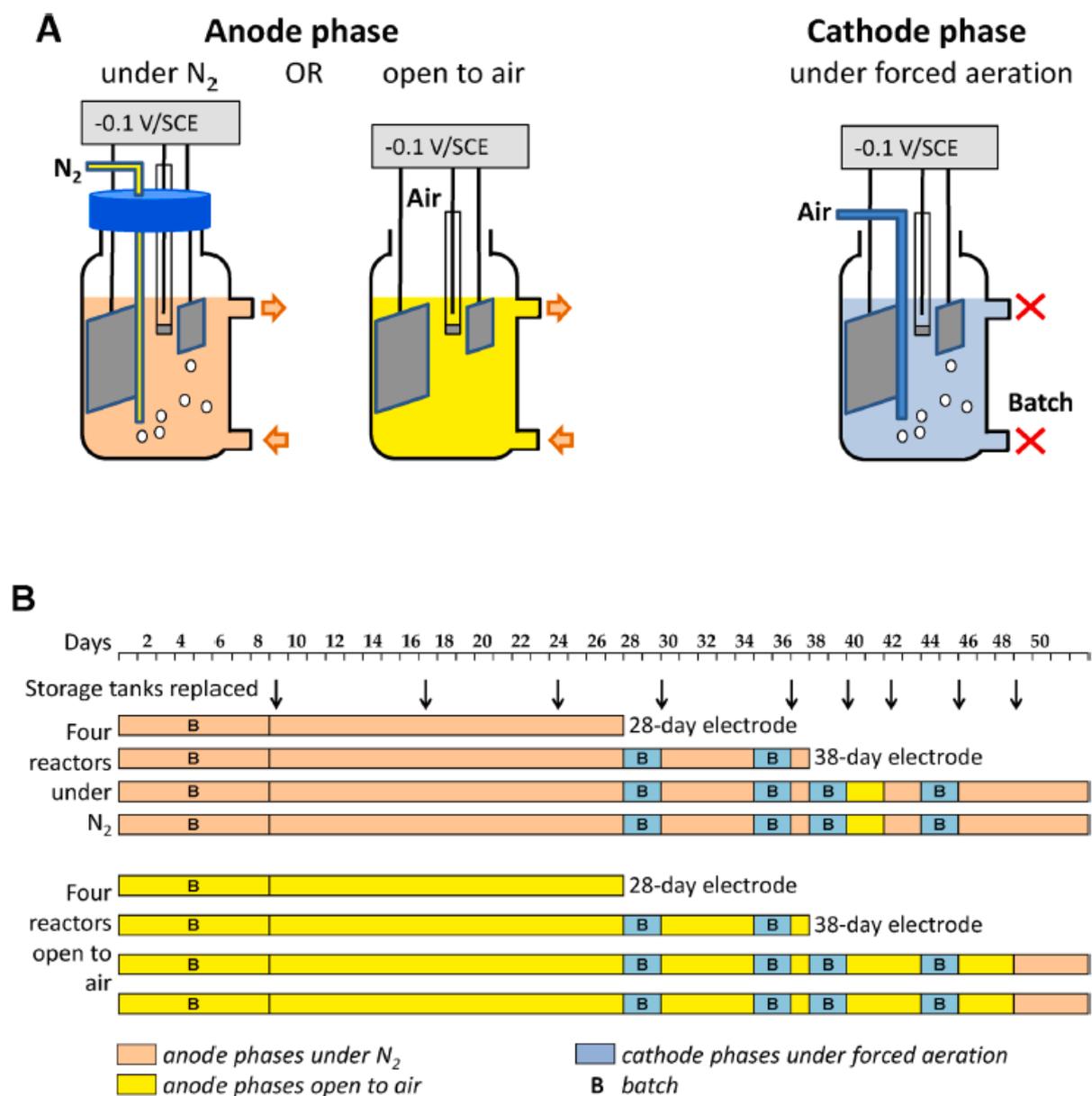
### **2.1. Media and set-up**

The electrochemical reactors were Schott flasks containing 500 mL of domestic wastewater (WW) collected from the aerobic tank of a wastewater treatment plant (Castanet-

Tolosan, near Toulouse, France). They were inoculated with 5% (v/v) activated sludge from the same plant. The concentrations of total suspended solids (TSS) and volatile suspended solids (VSS) of the sludge were  $10 \pm 1$  and  $8.7 \pm 0.1$  g.L<sup>-1</sup>, respectively. All the reactors were initially filled with fresh mix of WW and 5% sludge. This mix had initial values of soluble and total COD of 230 and 1230 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>, respectively, and the initial pH was 8.3. Each reactor was part of a closed hydraulic loop including a peristaltic pump (Masterflex®, Cole-Parmer, USA) and a 2 L storage tank. The storage tanks always contained hydrolysed WW. Hydrolysis consisted of keeping the WW in a closed tank under anaerobic conditions at room temperature for one week. This step promoted hydrolysis of the particulate COD and thus maximized the soluble COD. Depending on the different times of WW collection, the COD of hydrolysed WW was in the range of 250–350 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup> (against 150–250 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup> for WW before hydrolysis).

Each reactor was equipped with a 3-electrode set-up. The working electrodes were carbon felt sheets (RVG 4000, Mersen, France) (Blanchet et al., 2016) of 2 × 4 cm<sup>2</sup> surface area and 0.5 cm thickness. They were electrically connected with titanium rods (1 mm in diameter) with the free part insulated by heat-shrinkable sleeves. The working electrodes were placed at the free surface of the solution so as to have easy access to oxygen during cathodic phases. The 16 cm<sup>2</sup> counter electrodes were made of carbon cloth (Paxitech, France) and were connected to the electrical circuit with a platinum wire. A multi-channel potentiostat (MPG, EClab software, Bio-Logic SA) was used to control the potential of each working electrode vs. a saturated calomel reference electrode (SCE, Sentek, Australia, 0.24 V/SHE). All potentials were expressed vs. SCE. Biofilms were formed and operated under a constant applied potential of -0.1 V vs. SCE and at room temperature ( $20 \pm 2$  °C). The current density (A.m<sup>-2</sup>) was related to the projected surface area of the working electrode, 8 cm<sup>2</sup>.

## 2.2. Biofilm formation and operation (Fig. 1)



**Fig. 1. Scheme of the experimental set-up and timetable of the protocol.**

Eight reactors were run in parallel. Four were run under continuous bubbling of N<sub>2</sub> while the other four had no bubbling and remained open to the air. The first 28 days were dedicated to the formation of microbial anodes and there was no switch in cathodic conditions during this period. This anode formation phase started in batch mode (no solution circulation). An increase of the current indicated the formation of an electroactive biofilm on the working electrode. When the current stopped rising, around day 8, the closed hydraulic loop was put into circulation

mode at a flow rate of  $1.5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . When the current dropped, the COD in the loops was no longer sufficient and the storage tanks were changed to provide the reactors with hydrolysed WW. The storage tanks were always changed at the same time for the eight loops, at days 9, 17 and 24.

After day 28, anodic and cathodic phases were alternated. Cathodic phases were started when the substrate contained in the recirculating loop had been consumed, which was detected by the current dropping to near zero. Recirculation was stopped, all eight reactors were opened and air bubbling was set up. Four cathodic phases were completed on days 28, 35, 38 and 44, each lasting for approximately 24 h. At the end of the cathodic phases, the storage tanks were changed to provide the reactors with COD again (days 30, 36, 39, 46) and the anodic conditions were restored. The storage tanks were also changed at days 42 and 49. Two reactors (one under nitrogen and one not) were stopped at day 28, and two others at day 38, in order to analyse the evolution of the microbial populations.

Electrodes were characterised by cyclic voltammetry (CV) from  $-0.6$  to  $0.4 \text{ V/SCE}$  at  $1 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ . CVs were performed at the beginning and the end of the experiments and at important times (change of conditions, aeration, etc.). For each CV, three cycles were recorded. The first cycle was sometimes slightly different from the next two cycles, which were usually identical. The second cycles are represented in this article.

Throughout the experiment, Chemical Oxygen Demand (COD) was measured using Hach Lange LCK 514 microkits for a concentration ranging from 100 to  $2,000 \text{ mg of O}_2\cdot\text{L}^{-1}$  and LCK 314 for concentrations ranging from 15 to  $150 \text{ mg of O}_2\cdot\text{L}^{-1}$ . Soluble COD was measured after filtering the samples with a syringe filter having a pore diameter of  $0.22 \mu\text{m}$ .

Oxygen concentrations were measured with an optical dissolved oxygen meter Multi 3410 (WTW GmbH, Germany) in the middle of the reactors, i.e. around 10 cm below the free surface of the solution.

### **2.3. Molecular biology methods**

After the shutdown of the reactors, a  $3 \text{ cm}^2$  piece of the felt electrode and 10 mL of culture medium were collected for molecular biology analyses. The external biofilm was recovered by scraping the surface of the electrode with a scalpel. After removal of the external biofilm, the internal biofilm was collected by placing the felt pieces in an ultrasonic bath for 15 min. All samples were then centrifuged for 15 min at  $4600 \text{ g}$  and  $6 \text{ }^\circ\text{C}$ . DNA extraction was

performed on the pellet of each sample using a DNeasy PowerBiofilm (Qiagen) kit, according to the manufacturer's recommendations.

### **2.3.1. 16S sequencing**

16S rRNA gene high-throughput DNA sequencing was performed at the NGS facility of the PROSE Research Unit, INRAE (Antony, France) using Ion Torrent™ (Life Technologies, USA) technology and methods. Archaeal and bacterial hyper variable region V4-V5 of the 16S rRNA gene was amplified and then sequenced according to the protocol described by Poirier et al. (2016) or Madigou et al. (2019) with some modifications.

The V4–V5 region was amplified according to the Platinum SuperFi DNA Polymerase 3-step protocol (Invitrogen). PCR products were purified using Solid Phase Reversible Immobilization (SPRI) magnetic beads (Mag-Bind TotalPure NGS magnetic beads, Omega Bio-Tek) according to the manufacturer's instructions. Purified amplicons were quantified using D1000 ScreenTape and 2200 TapeStation (Agilent Technologies). Then all amplicons were pooled in equimolar ratios.

To prepare template-positive Ion Sphere Particles (ISPs), the library was set up on the Ion OneTouch 2 Instrument (Life Technologies) using the Ion PGM Hi-Q View OT2 Kit (Life Technologies) and following the manufacturer's instructions.

Sequencing was performed on an Ion Torrent Personal Genome Machine using Ion 316 Chip V2 (Life Technologies) and Ion PGM Hi-Q View Sequencing Kit (Life Technologies) according to the manufacturers' instructions. Sequencing data was processed by the Torrent Suite Software. The software filtered out low quality and polyclonal sequence reads, and filtered data was exported as a FastQ file.

### **2.3.2. Data treatments**

An OTU (operational taxonomic unit) count matrix was designed using a FROGS (Find Rapidly OTU with Galaxy Solution) (Escudié et al., 2018) pipeline, including DNA quality controls, metabarcoding sequence analyses, and OTU affiliation using blastn with 16S\_silva132 database. Low abundance OTUs were filtered out and OTUs present at above 0.5% in at least one sample were kept. The OTU abundances were examined using R CRAN software (version 3.6), phyloseq and mixOmics R packages. Principal Component Analysis (PCA) was performed to highlight the relationship between samples from the different

conditions after OTU abundances in the samples had been transformed with centred log ratio (CLR) (Rohart et al., 2017).

### **3. Results and discussion**

#### **3.1. Electrochemical results**

Eight reactors were operated under constant applied potential at  $-0.1$  V/SCE. Four reactors were under nitrogen bubbling and four with no nitrogen supply remained open to the air (Fig. 1). Fig. 2 gives the average curves for each of the two conditions. The first 28 days (Fig. 2.A) were used to form microbial anodes. They gave results similar to those already reported in identical conditions (Roubaud et al., 2019). During this biofilm formation phase, the values of current in the reactors with  $N_2$  bubbling reached  $4.1 \pm 0.8$   $A.m^{-2}$ , which was the level of the highest values reported for microbial anodes designed in raw WW without acetate addition. It was twice the steady state current density of  $2.0$   $A.m^{-2}$  obtained in similar domestic wastewater with carbon felt electrodes (Roubaud et al., 2019). To the best of our knowledge, the highest current density reported in similar conditions is  $4.9$   $A.m^{-2}$ . In this case, high strength molasses wastewater provided a particularly high COD concentration of  $127,500$   $mg\ O_2.L^{-1}$  (He et al., 2017).

The maximum current density reached in the absence of  $N_2$  bubbling was only  $2.3 \pm 0.5$   $A.m^{-2}$ . This lower performance was probably due to the aerobic consumption of COD in the reactors left open to air (no  $N_2$  bubbling), which resulted in COD values of only  $88 \pm 15$   $mg\ O_2.L^{-1}$  at the end of the initial 28-day anodic phase, while average COD was  $183 \pm 32$   $mg\ O_2.L^{-1}$  in the reactors under  $N_2$ . The oxidation of the organic matter by oxygen explained why the concentration of dissolved oxygen was  $0$   $mg/L$ ,  $10$   $cm$  under the free surface even in the absence of  $N_2$  bubbling.

After day 28, successive anodic and cathodic phases were alternated (Fig. 1). The cathodic phases on days 28, 35, 38 and 44 (Fig. 2.B) lasted for around 24 h, during which time air was bubbled through all reactors. The anodic phases confirmed that the current density was 2 to 3 times higher in the reactors under  $N_2$  than in those without  $N_2$  bubbling. Anodes under  $N_2$  reached a maximum of  $5.5 \pm 1.2$   $A.m^{-2}$ , which was at the highest level of current density obtained in real WW. The final values of anodic current density (day 52) exceeded those obtained during the period of biofilm formation before the anoxic/oxic alternations were started (day 28). This shows that the successive switches to cathodic conditions improved the anode performance. As already reported in the literature, operating in bidirectional mode with

aerobic phases can enhance the performance of organic matter oxidation (Blanchet et al., 2014; Chen et al., 2019a; Freguia et al., 2008).

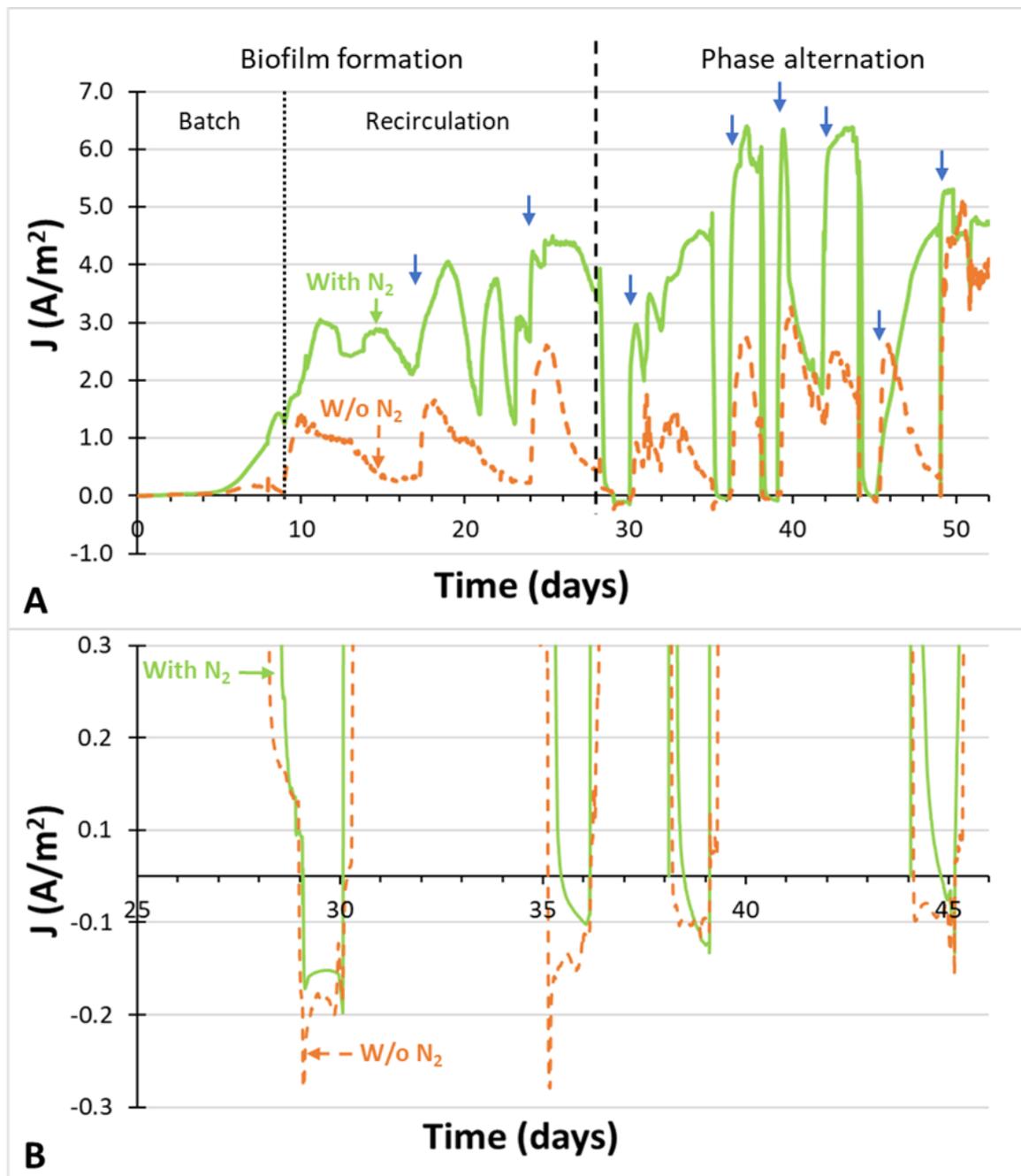


Fig. 2. Current density versus time under constant polarization at  $-0.1$  V/SCE. Average values of the electrode operated with  $N_2$  (green) or without  $N_2$  supply (orange). (A) Entire experiment (days 0 to 52) and (B) focus on the cathodic phases. After 9 days in batch mode, the recirculation was started (dotted line). After day 28, cathodic and anodic phases were alternated (dashed line). Arrows indicate the storage tank changes.

On day 40, nitrogen bubbling was stopped for 2 days. The current density produced by the reactors normally under N<sub>2</sub> dropped until it reached the values of the reactor without N<sub>2</sub>, around 2.0 A.m<sup>-2</sup>. Conversely, from day 49, all the reactors were placed under N<sub>2</sub>. The reactors that had not benefited from N<sub>2</sub> until that time reached the same current density level as the reactors that had been operated under N<sub>2</sub>, with current densities up to 4.0 A.m<sup>-2</sup>. In this case, the average CODs were of the same order, 156 ±11 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup> and 164 ±19 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>, respectively. These two symmetrical checks (no N<sub>2</sub> bubbling in any reactor on day 40 and N<sub>2</sub> bubbling in all reactors on day 49) showed that the presence or absence of N<sub>2</sub> supply during biofilm formation and the anodic phases did not significantly affect the biofilm electroactive capability since all electrodes produced similar current density when they were placed in the same conditions. The conditions of N<sub>2</sub> bubbling or no N<sub>2</sub> bubbling during the anodic phases affected the current produced mainly through the aerobic consumption of COD.

In the reactors with N<sub>2</sub>, pH was stable even during phase changes, with an average value of 8.6 ±0.3 at the end of the anodic phases and 8.6 ±0.1 during the cathodic phases. In reactors without N<sub>2</sub>, the pH varied slightly, with 7.6 ±0.1 and 8.3 ±0.1 during the anodic and cathodic phases, respectively. The pH increase in the reactors without N<sub>2</sub> during the anodic phases may have been due to the production of CO<sub>2</sub> by oxidation of organic matter, which acidified the medium. During the cathodic phases, the air bubbling flushed CO<sub>2</sub> and the pH returned to its initial value. On the contrary, in the reactors under N<sub>2</sub>, the continuous bubbling evacuated the CO<sub>2</sub> produced and maintained a stable value of pH.

During forced aeration, the concentration of dissolved oxygen was maintained at 6.8 ±0.5 mg/L. When the aeration started, the current density dropped rapidly until it reached negative values corresponding to the cathode mode. The cathodic current density stabilised in the 0.05–0.10 A.m<sup>-2</sup> range when there was no N<sub>2</sub> supply during the anode phases. Reactors under N<sub>2</sub> during the anode phases showed a weaker ability to switch to cathode mode. Cathodic current densities were lower, not exceeding 0.05 A.m<sup>-2</sup>, while some reactors kept a slightly anodic behaviour. Cathodic currents were always considerably lower than the anodic currents. It has already been reported in the literature that cathodic currents are generally considerably lower than anodic currents, whether the electron acceptor is oxygen (Blanchet et al., 2014) or not (Yang et al., 2017).

At the end of the cathodic phases, when all the reactors were under air bubbling, the average COD measurements were similar for all the reactors, with 84 ±17 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup> and 86 ±10 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup> in the reactors operated with and without N<sub>2</sub>, respectively. This fraction represents the refractory COD, which could not be degraded by bacteria, even after 24h of intensive aeration.

Cyclic voltammeteries recorded at day 48, during the fourth cathodic phase, are reported in Fig. 3. CVs displayed clear waves of oxygen reduction, with reduction current density greater than  $1.5 \text{ A}\cdot\text{m}^{-2}$  at  $-0.3 \text{ V}$  vs. SCE. The electrodes subjected to  $\text{N}_2$  bubbling during the anodic phases showed a plateau around this value of current density (Fig. 3.A). In contrast, the electrodes formed without  $\text{N}_2$  supply produced continuously increasing current density at lower potentials, with no plateau, up to  $-3.7 \text{ A}\cdot\text{m}^{-2}$ , at  $-0.6 \text{ V}$  vs. SCE (Fig. 3.B). These kinetics were less than those reported for the very best mono-directional  $\text{O}_2$ - reducing microbial cathodes, which reached 2 to  $2.5 \text{ A}\cdot\text{m}^{-2}$  (Wang et al., 2013; Izadi et al., 2019) when developed on gas-diffusion electrodes, and up to  $3 \text{ A}\cdot\text{m}^{-2}$  at  $0.4 \text{ V}$  vs Ag/AgCl under forced aeration (Milner and Yu, 2018). Nevertheless, they can be reasonably compared with efficient conventional  $\text{O}_2$ - reducing microbial cathodes. The electrodes operated under  $\text{N}_2$  and without  $\text{N}_2$  were consequently able to reduce oxygen efficiently in cathodic conditions, but those formed under  $\text{N}_2$  showed a limiting current at the lower potential values.

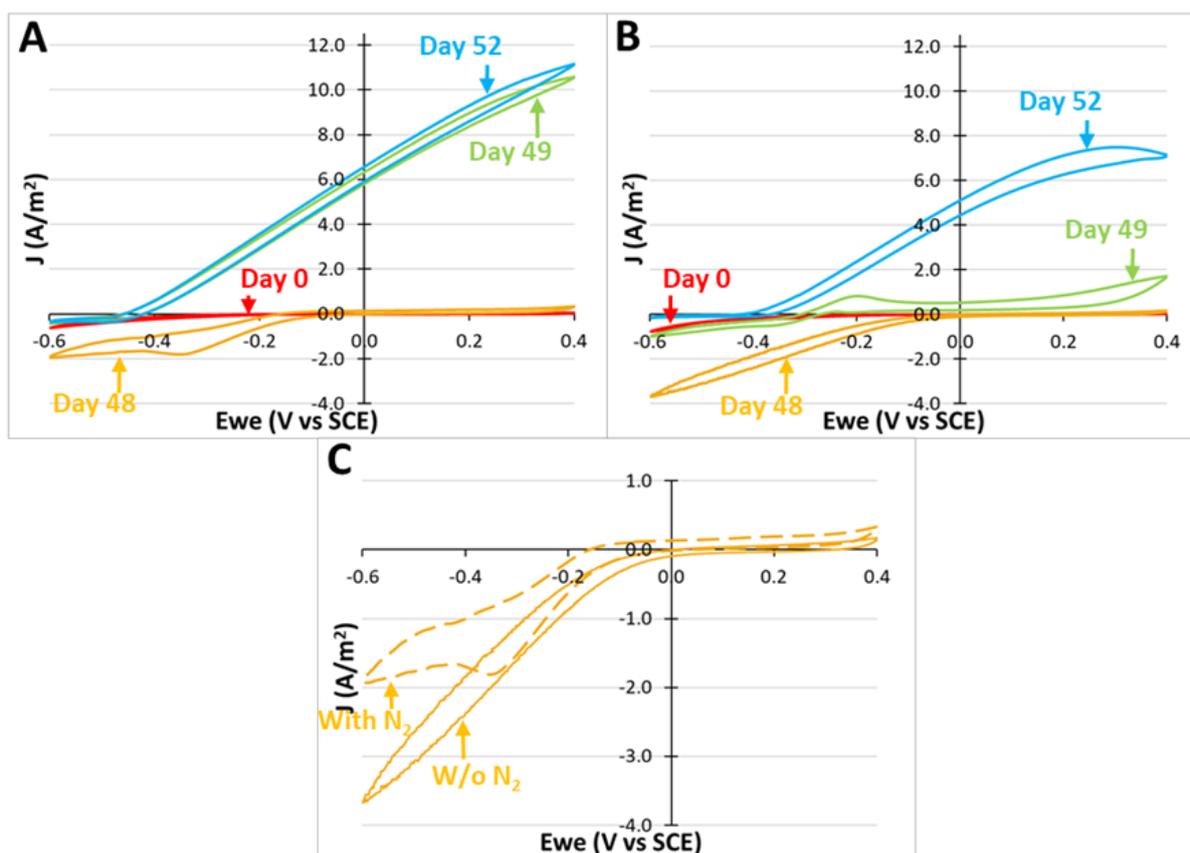


Fig. 3. Cyclic Voltammeteries recorded at 1 mV/s on day 0 (initial), day 48 (cathodic phase, under aeration), day 49 (anodic phase) and day 52 (all reactors were under  $\text{N}_2$  bubbling). (A)  $\text{N}_2$  bubbling during the anodic phases; (B) no  $\text{N}_2$  during the anodic phases; (C) Comparison of the CVs on day 48 extracted from A) and B).

At day 49, when the anodic conditions were restored, CVs showed that the electrodes under N<sub>2</sub> rapidly displayed anodic behaviour, with currents up to around 11 A.m<sup>-2</sup> at 0.4 V vs. SCE (Fig. 3.A). In contrast, the electrodes operating without N<sub>2</sub> were hard to return to anodic behaviour and their current densities did not reach 2 A.m<sup>-2</sup> (Fig. 3.B). At day 49, all the reactors were placed under N<sub>2</sub> bubbling and CVs were recorded again at day 52. The electrodes usually operating under N<sub>2</sub> gave CVs that looked the same as those recorded on day 48, while the electrodes usually operating without N<sub>2</sub> showed considerably improved performance, with current densities reaching 7 A.m<sup>-2</sup>. As mentioned above, the lower performance of the anodes operating without N<sub>2</sub> supply was mainly due to the side consumption of COD by aerobic bacteria. When put under N<sub>2</sub>, these anodes clearly showed better performance, even if they did not quite reach those of the electrodes continuously operated under N<sub>2</sub>.

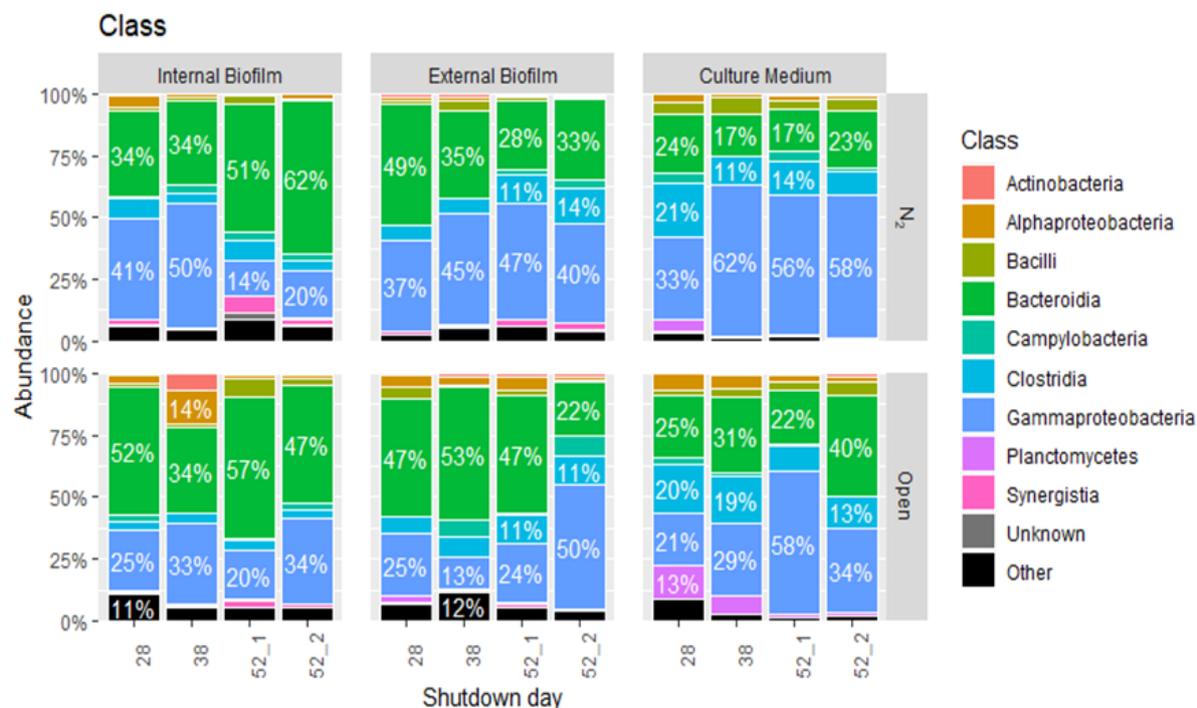
To sum up the electrochemical part of this work, information that holds great promise must be kept in mind if the objective is to design ABMEs in the form of MFCs or microbial snorkels suitable for working in WW treatment tanks. It has been demonstrated here, for the first time, that raw WW have the capacity to form efficient ABMEs without the addition of any substrate. The ABMEs produced anodic current density at a level matching the highest magnitudes reported in the literature for conventional microbial anodes formed in raw WW. The periodic shift to aerated conditions did not disturb their exoelectrogenic capacities, which were recovered when aeration was stopped. Notably, the catalysis of oxygen reduction was more efficient when the biofilms were not operated in strictly anaerobic conditions during the anode phases. Nitrogen bubbling was consequently not useful, and could even be detrimental, for designing ABMEs. This is important and encouraging information for the possible scale up of ABMEs to large sized installations.

## 3.2. Microbial population analysis

### 3.2.1. Diversity of microbial communities

Sequencing data were first examined at the class level. Archaea represented less than 0.5% of the DNA of the samples. Three major bacterial classes were present in all samples: *Gammaproteobacteria* from the *Proteobacteria* phylum, *Bacteroidia* from the *Bacteroidetes*, and *Clostridia* from the *Firmicutes* (Fig. 4). *Gammaproteobacteria* abundances were higher in the culture medium (up to 62%) than in the internal biofilm (up to 50%). Logically, the external biofilm, which is located at the interface between the internal biofilm and the culture medium, presented intermediate values. *Clostridia* showed the same behaviour as the *Gammaproteobacteria* regarding the biomass location, with values up to 21% in the culture

medium, dropping to 14% maximum in the external biofilm and less than 10% in the internal one. The *Bacteroidia* class showed opposite results with higher abundance (up to 57%) in the internal biofilm than in the culture medium (40% maximum at day 52).



**Fig. 4. Relative abundances of the classes. Top line: reactors under N<sub>2</sub> bubbling; bottom line: reactors without N<sub>2</sub> supply, open to air. For each condition, samples were collected at day 28 (end of the anode formation phase), day 38 before the third cathodic phase, and day 52 at the end of the experiment (52\_1 and 52\_2 are duplicates).**

Relative abundance of the different classes was influenced by N<sub>2</sub> supply. In the reactors under N<sub>2</sub>, the *Gammaproteobacteria* class was the most abundant, with up to 62%, whereas the *Bacteroidia* class was the most abundant in the reactors without N<sub>2</sub> bubbling (50% maximum). The abundances of Clostridia tended to be higher for the reactors without N<sub>2</sub> but the effect of N<sub>2</sub> seemed less marked than that found for the *Gammaproteobacteria*. *Gammaproteobacteria* have already been described in bioelectrochemical systems (BESs) including both exoelectrogenic and electrotrophic species (Logan et al., 2019). These differences in the microbial populations may support the lower O<sub>2</sub> reduction capability that was observed with the electrodes formed under N<sub>2</sub> during the anode phases. Fig. 5 represents the most abundant genera in the *Gammaproteobacteria* class. The major genus found here is *Acinetobacter*, an electrotrophic species. It grows preferentially in the culture medium rather

than in biofilm and is more abundant in the reactors with N<sub>2</sub>, except for the internal biofilm at day 52.

A total of 49 OTUs from the *Acinetobacter* genus were found here, confirming the large presence of this genus. The major one, OTU\_1 had an abundance of up to 35% in the samples from the culture medium, but could not be affiliated up to the species level. Different species of this aerobic genus have already been identified in wastewater treatment plants (Liu et al., 2017; Chen et al., 2019b), including BESs (Sathishkumar et al., 2019). The *Acinetobacter* genus has already been identified in O<sub>2</sub>-reducing bidirectional biofilms (Blanchet et al., 2014; Yun et al., 2018) with, in these cases too, a higher abundance in the culture medium.

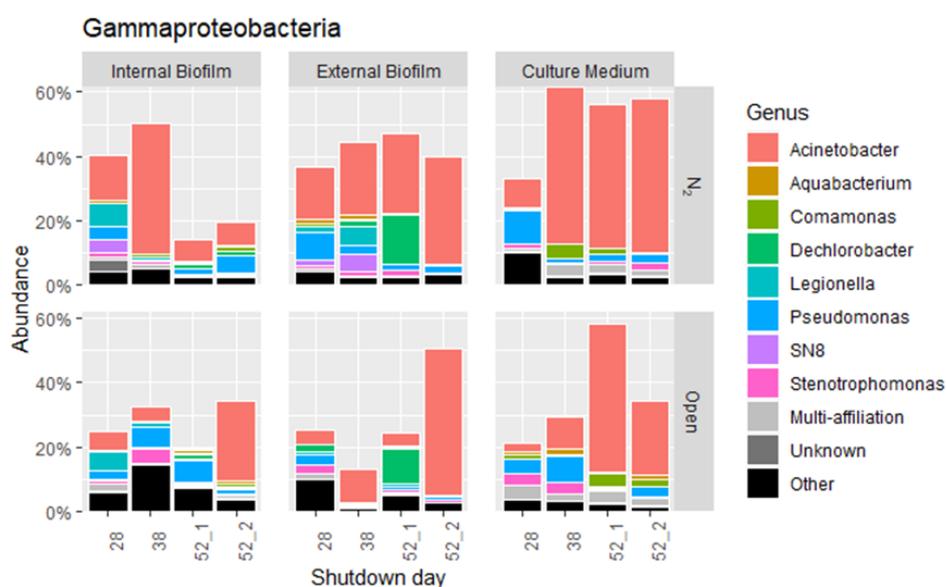


Fig. 5. Principal genera in the *Gammaproteobacteria* class.

The main bacterial genus usually found in most microbial electrochemical systems, *Geobacter* (Logan et al., 2019; Roubaud et al., 2019; Yun et al., 2018), was absent here. As *Geobacter* species are anaerobic, intense aeration during the cathodic phases was most probably detrimental to the development of the genus. Here, other electroactive bacteria, such as *Acinetobacter* or *Pseudomonas*, aerobic or facultative anaerobic, should ensure the electron transfers. For the *Bacteroidia* and *Clostridia* classes, the diversity of the genera was greater and Principal Component Analysis (PCA) was carried out to refine the analysis at the OTU level.

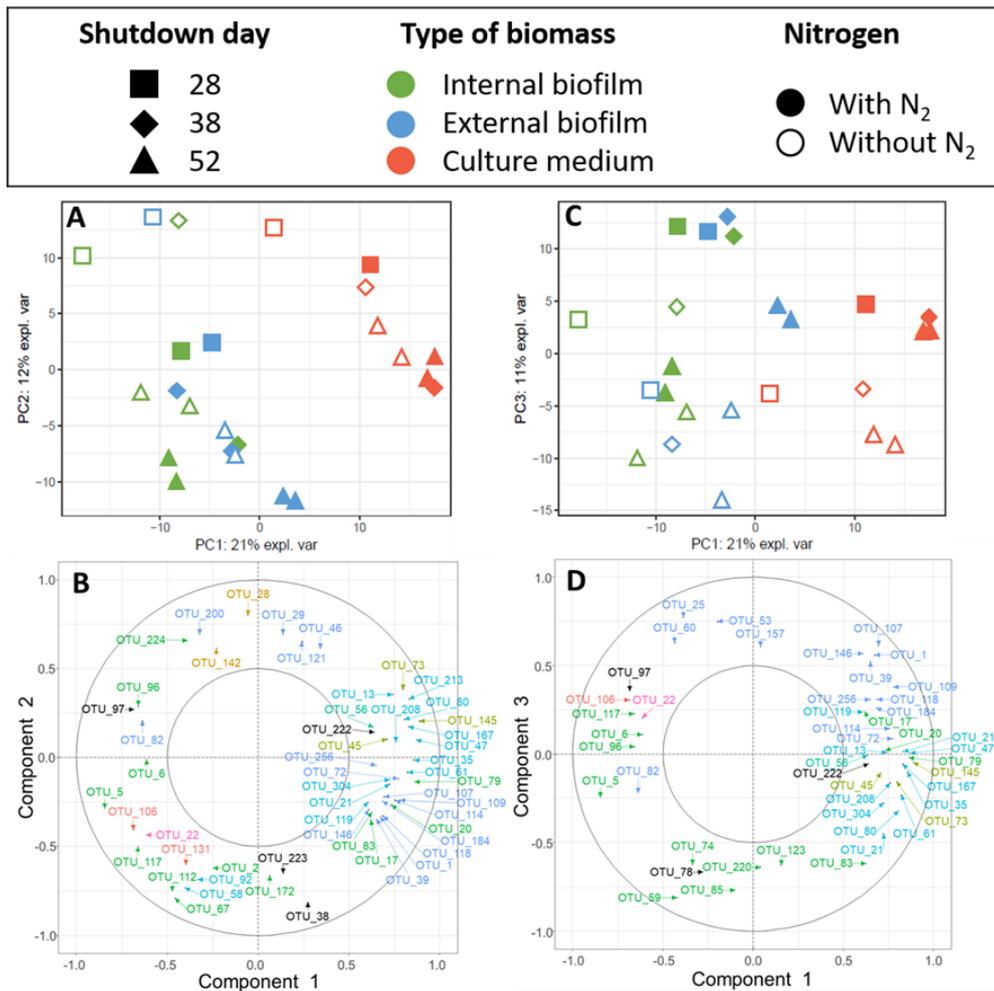
### 3.2.2. Comparison of the samples based on the aeration, biomass location and biofilm age

PCA was carried out on the 16SRNA gene tag datasets. Plots of individuals, representing each sample (Fig. 6.A and 6.C), show the separation of the different samples according to the PCA (components 1, 2 and 3). Samples from the culture medium are clearly distinguished from the biofilm samples (component 1). The difference is less clear between internal and external biofilm samples, indicating that the biofilms over and inside the electrode have close microbial populations. Samples collected at the end of the biofilm formation phase (day 28) were separated from the samples taken later on (component 2). This shows that the anoxic/oxic alternations, which started after day 28, affected the microbial populations.

Component 3 separated samples according to the N<sub>2</sub> bubbling and independently of their type, except for the internal biofilm at day 52. The internal biofilm at day 52 could act differently because it was not exposed to the influence of aeration in the same way as the other samples, especially after 52 days of experiment.

The correlation circles were used to link the observed patterns to the microbial dynamics and evolution of bacterial abundances between the samples (Fig. 6B and D). According to component 1, a large bacterial diversity was characteristic of the media, with a majority of OTUs from the *Gammaproteobacteria* and *Clostridia* classes. Among them, OTU\_35 *Proteiniclasticum* genus, Clostridia class, is a hydrogen autotrophic bacterium, known to degrade protein in BESs using wastewater (Yin et al., 2017; Gao et al., 2020). It could replace *Geobacter* in the present system. *Pseudomonas* (OTU\_256, *Gamma-proteobacteria*), also characteristic of the media, is known for its heterotrophic nitrification and aerobic denitrification capabilities (Chen et al., 2019b) and its speculated ability to catalyse the electrochemical oxygen reduction (Blanchet et al., 2014).

Some OTUs from the *Bacteroidia* class *Cloacibacterium* were characteristic of the biofilm samples. Among them, OTU\_6 is a facultative anaerobe that can adapt to the alternation phase without suffering from a lack or an excess of O<sub>2</sub>. It was originally found in wastewater and is known to be electroactive, contributing to organic compound degradation in BESs using activated sludge as the inoculum (Gao et al., 2020; Zheng et al., 2019) or a consortium from phenol polluted wastewater (Hassan et al., 2018).



**Fig. 6.** Comparison of samples based on the biofilm location and age, plot of individuals (A) and correlation circle (B); based on the biofilm location and N<sub>2</sub> bubbling, plot of individuals (C) and correlation circle (D). NB: OTUs on the correlation circles (B and D) are coloured according to the bacterial class, with the same colours as those used in Fig. 3.

On component 2, *Brevundimonas* (OTU\_28, *Bacilli*), characteristic of the samples at day 28, is from the *Caulobacteraceae* family, observed in BESs used for advanced oxidation in water treatment (Bennani et al., 2015). *Paludibacter* (OTU\_172, *Bacteroidia*), characteristic of more advanced dates, has been found as part of the biocathode community in a bidirectional electrode operated in domestic wastewater (Yun et al., 2018). This could explain why it is characteristic of late sampling dates, after several anodic–cathodic alternations. It might also play a role in sulfate removal in BESs (Liang et al., 2013).

According to component 3, a characteristic OTU of the reactors without N<sub>2</sub> bubbling is *Pseudomonas* (OTU\_157, *Gammaproteobacteria*), as described earlier. The *Lentimicrobiaceae* family (OTU\_220, *Bacteroidia*), characteristic of the reactors without N<sub>2</sub>, has already been observed in a BES implemented for COD removal (De Paepe et al., 2020).

In summary, the most influential parameter in the present system is the biofilm/medium location, with a clear separation between the culture medium and the biofilm (both internal and external). Date of sampling is the second parameter responsible for an important difference between samples from biofilm formation phase (day 28) and alternation phase (days 38 and 52). Finally, a difference between the samples from the reactors with and without N<sub>2</sub> was observed. The very large variety of taxa present in the samples, both in terms of abundance and variance, was probably the cause of the stability and high values of both cathodic and anodic currents. The present and characteristic OTUs were a mixture of anaerobic species, often found in anaerobic digesters, and aerobic species, found in biocathodes. All of them have already been identified separately in BESs.

To the best of our knowledge, only one previous study has analysed the microbial population of a bidirectional electrode designed in wastewater (Chen et al., 2019a). A different biofilm structure was reported, with aerobes in the external layer (including genus *Neomegalonema*, *Alphaproteobacteria* class) and exoelectrogens in the internal one (including genus *Arcobacter* of the *Epsilonproteobacteria* class) whereas, in our study, no significant difference was found between the internal and external biofilms and the microorganisms described previously in ABMEs were not identified here. These differences may stem from the different experimental set-ups and protocols. This shows that different ways can result in efficient mixes of aerobic and anaerobic species, working together in bidirectional biofilms designed in real wastewater.

All the experiments were performed under constant, controlled potential here. This means that the effects observed (summarized in the conclusion below) were the direct consequences of the anoxic/oxic conditions and were not indirectly induced by the variations of the potential value that can be provoked by the different anoxic/oxic conditions. Actually, the potential of the electrodes can vary in different ways and to different extents depending on the type (MFC, snorkel, electrolysis cell) and the design (ratio of anode/cathode surface areas, distance between anode and cathode, external resistance in MFC...) of the setups. Now, similar experiments can be carried out with different cell types and compared to the basis described here in order to unravel the indirect effects of the variations of the potential, which are linked to the cell configuration, and the direct effects of the anoxic/oxic conditions, which have been characterised here.

## **4. Conclusion**

Raw domestic wastewater showed the capacity to form efficient ABMEs. Putting the reactor under N<sub>2</sub> during the anodic phases revealed higher anodic currents, because it avoided the side-consumption of COD by aerobic bacteria, but it did not improve the intrinsic anodic capacity of the ABMEs and it was detrimental to the cathodic currents. Strictly anaerobic conditions are consequently not required for the design of ABMEs. The electrode efficiency and stability was explained by the large variety of the microbial population, which mixed – in the same biofilm – aerobic and anaerobic species that have already been identified separately in different bioelectrochemical microbiotas.

## **CRedit authorship contribution statement**

Morgane Hoareau: Investigation, Writing - original draft, Writing - review & editing, Visualization. Benjamin Erable: Conceptualization, Methodology, Validation, Writing - review & editing, Supervision. Olivier Chapleur: Formal analysis, Visualization, Writing - review & editing, Supervision. Cédric Midoux: Formal analysis, Visualization, Writing - review & editing. Chrystelle Bureau: Investigation, Writing - review & editing. Anne Goubet: Investigation, Writing - review & editing. Alain Bergel: Conceptualization, Methodology, Validation, Writing - original draft, Writing - review & editing, Visualization, Supervision, Funding acquisition.

## **Declaration of Competing Interest**

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

## **Acknowledgements**

This work was supported by the French Agence Nationale de la Recherche (ANR), within the framework of the Biotuba project (ANR- 17-CE06-0015). We are grateful to the INRAE MIGALE bioinformatics facility (MIGALE, 2020) for providing help, computing and storage resources.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124663>.

## References

- Aguirre-Sierra, A., Bacchetti-De Gregoris, T., Berná, A., Salas, J.J., Aragon, C., Esteve-Nunez, A., 2016. Microbial electrochemical systems outperform fixed-bed biofilters in cleaning up urban wastewater. *Environ. Sci. Water Res. Technol.* 2 (6), 984–993. <https://doi.org/10.1039/C6EW00172F>.
- Bennani, Y., Peters, M.C.F.M., Appel, P.W., Rietveld, L.C., 2015. Electrochemically active biofilm and photoelectrocatalytic regeneration of the titanium dioxide composite electrode for advanced oxidation in water treatment. *Electrochim. Acta* 182, 604–612. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2015.09.101>.
- Blanchet, E., Erable, B., De Solan, M.-L., Bergel, A., 2016. Two-dimensional carbon cloth and three-dimensional carbon felt perform similarly to form bioanode fed with food waste. *Electrochem. Commun.* 66, 38–41. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2016.02.017>.
- Blanchet, E., Pécastaings, S., Erable, B., Roques, C., Bergel, A., 2014. Protons accumulation during anodic phase turned to advantage for oxygen reduction during cathodic phase in reversible bioelectrodes. *Bioresour. Technol.* 173, 224–230. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.09.076>.
- Chen, S., Brown, R.K., Patil, S.A., Huber, K.J., Overmann, J., Schröder, U., 2019a. Aerobic microbial electrochemical technology based on the coexistence and interactions of aerobes and exoelectrogens for synergistic pollutant removal from wastewater. *Environ. Sci. Water Res. Technol.* 5 (1), 60–69. <https://doi.org/10.1039/C8EW00530C>.
- Chen, S., He, S., Wu, C., Du, D., 2019b. Characteristics of heterotrophic nitrification and anaerobic denitrification bacterium *Acinetobacter* sp. T1 and its application for pig farm wastewater treatment. *J. Biosci. Bioeng.* 127 (2), 201–205. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.07.025>.
- Cheng, K.Y., Ho, G., Cord-Ruwisch, R., 2010. Anodophilic biofilm catalyzes cathodic oxygen reduction. *Environ. Sci. Technol.* 44 (1), 518–525. <https://doi.org/10.1021/es9023833>.
- De Paepe, J., De Paepe, K., Godia, F., Rabaey, K., Vlaeminck, S.E., Clauwaert, P., 2020. Bioelectrochemical COD removal for energy-efficient, maximum and robust nitrogen recovery from urine through membrane aerated nitrification. *Water Res.* 185, 116223. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116223>.
- Domínguez-Garay, A., Esteve-Núñez, A., 2018. Designing strategies for operating microbial electrochemical systems to clean up polluted soils under non-flooded conditions. *Bioelectrochemistry* 124, 142–148. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2018.03.006>.
- Erable, B., Bergel, A., 2009. First air-tolerant effective stainless steel microbial anode obtained from a natural marine biofilm. *Bioresour. Technol.* 100 (13), 3302–3307. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.02.025>.
- Erable, B., Etcheverry, L., Bergel, A., 2011. From microbial fuel cell (MFC) to microbial electrochemical snorkel (MES): maximizing chemical oxygen demand (COD) removal

- from wastewater. *Biofouling* 27 (3), 319–326. <https://doi.org/10.1080/08927014.2011.564615>.
- Escudié, F., Auer, L., Bernard, M., Mariadassou, M., Cauquil, L., Vidal, K., Maman, S., Hernandez-Raquet, G., Combes, S., Pascal, G., 2018. FROGS: find, rapidly, OTUs with galaxy solution. *Bioinformatics* 34, 1287–1294. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx791>.
- Freguia, S., Rabaey, K., Yuan, Z., Keller, J., 2008. Sequential anode–cathode configuration improves cathodic oxygen reduction and effluent quality of microbial fuel cells. *Water Res.* 42 (6-7), 1387–1396. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.10.007>.
- Gao, Y., Huang, H., Peng, C., Fan, X., Hu, J., Ren, H., 2020. Simultaneous nitrogen removal and toxicity reduction of synthetic municipal wastewater by microelectrolysis and sulfur-based denitrification biofilter. *Bioresour. Technol.* 316, 123924. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123924>.
- Hassan, H., Jin, B.o., Donner, E., Vasileiadis, S., Saint, C., Dai, S., 2018. Microbial community and bioelectrochemical activities in MFC for degrading phenol and producing electricity: microbial consortia could make differences. *Chem. Eng. J.* 332, 647–657. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.09.114>.
- He, L.i., Du, P., Chen, Y., Lu, H., Cheng, X.i., Chang, B., Wang, Z., 2017. Advances in microbial fuel cells for wastewater treatment. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 71, 388–403. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.12.069>.
- Hoareau, M., Erable, B., Bergel, A., 2019. Microbial electrochemical snorkels (MESs): a budding technology for multiple applications. A mini review. *Electrochem. Commun.* 104, 106473. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2019.05.022>.
- Izadi, P., Fontmorin, J.-M., Fernández, L.F.L., Cheng, S., Head, I., Yu, E.H., 2019. High performing gas diffusion biocathode for microbial fuel cells using acidophilic iron oxidizing bacteria. *Front. Energy Res.* 7 <https://doi.org/10.3389/fenrg.2019.00093>.
- Jiang, Y., Zeng, R.J., 2019. Bidirectional extracellular electron transfers of electrodebiofilm: Mechanism and application. *Bioresour. Technol.* 271, 439–448. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.133>.
- Kalathil, S., Pant, D., 2016. Nanotechnology to rescue bacterial bidirectional extracellular electron transfer in bioelectrochemical systems. *RSC Adv.* 6 (36), 30582–30597. <https://doi.org/10.1039/C6RA04734C>.
- Li, W., Sun, J., Hu, Y., Zhang, Y., Deng, F., Chen, J., 2014. Simultaneous pH selfneutralization and bioelectricity generation in a dual bioelectrode microbial fuel cell under periodic reversion of polarity. *J. Power Sources* 268, 287–293. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2014.06.047>.
- Liang, F., Xiao, Y., Zhao, F., 2013. Effect of pH on sulfate removal from wastewater using a bioelectrochemical system. *Chem. Eng. J.* 218, 147–153. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2012.12.021>.
- Liu, H., Lu, Q., Wang, Q., Liu, W., Wei, Q., Ren, H., Ming, C., Min, M., Chen, P., Ruan, R., 2017. Isolation of a bacterial strain, *Acinetobacter* sp. from centrate wastewater and study of its cooperation with algae in nutrients removal. *Bioresour. Technol.* 235, 59–69. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.03.111>.
- Logan, B.E., Rossi, R., Ragab, A., Saikaly, P.E., 2019. Electroactive microorganisms in bioelectrochemical systems. *Nat. Rev. Microbiol.* 17 (5), 307–319. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0173-x>.

- Madigou, C., Le Cao, K.-A., Bureau, C., Mazéas, L., Déjean, S., Chapleur, O., 2019. Ecological consequences of abrupt temperature changes in anaerobic digesters. *Chem. Eng. J.* 361, 266–277. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.12.003>.
- MIGALE, 2020. Migale Bioinformatics Facility. <https://doi.org/10.15454/1.5572390655343293E12>.
- Milner, E.M., Popescu, D., Curtis, T., Head, I.M., Scott, K., Yu, E.H., 2016. Microbial fuel cells with highly active aerobic biocathodes. *J. Power Sources* 324, 8–16. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2016.05.055>.
- Milner, E.M., Yu, E.H., 2018. The effect of oxygen mass transfer on aerobic biocathode performance, biofilm growth and distribution in microbial fuel cells. *Fuel Cells* 18 (1), 4–12. <https://doi.org/10.1002/fuce.201700172>.
- Oliot, M., Galier, S., Roux de Balmann, H., Bergel, A., 2016. Ion transport in microbial fuel cells: key roles, theory and critical review. *Appl. Energy* 183, 1682–1704. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2016.09.043>.
- Poirier, S., Desmond-Le Quéméner, E., Madigou, C., Bouchez, T., Chapleur, O., 2016. Anaerobic digestion of biowaste under extreme ammonia concentration: identification of key microbial phylotypes. *Bioresour. Technol.* 207, 92–101. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.01.124>.
- Rodrigo Quejigo, J., Tejedor-Sanz, S., Esteve-Núñez, A., Harnisch, F., 2019. Bed electrodes in microbial electrochemistry: setup, operation and characterization. *ChemTexts* 5 (1). <https://doi.org/10.1007/s40828-019-0078-3>.
- Rimboud, M., Pocaznoi, D., Erable, B., Bergel, A., 2014. Electroanalysis of microbial anodes for bioelectrochemical systems: basics, progress and perspectives. *PCCP* 16 (31), 16349–16366. <https://doi.org/10.1039/C4CP01698J>.
- Rohart, F., Gautier, B., Singh, A., Lê Cao, K.-A., 2017. mixOmics: An R package for 'omics feature selection and multiple data integration. *PLOS Comput. Biol.* 13, e1005752. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005752>.
- Roubaud, E., Lacroix, R., Da Silva, S., Etcheverry, L., Bergel, A., Basséguy, R., Erable, B., 2019. Benchmarking of industrial synthetic graphite grades, carbon felt, and carbon cloth as cost-efficient bioanode materials for domestic wastewater fed microbial electrolysis cells. *Front. Energy Res.* 7 <https://doi.org/10.3389/fenrg.2019.00106>.
- Sathishkumar, K., AlSalhi, M.S., Sanganyado, E., Devanesan, S., Arulprakash, A., Rajasekar, A., 2019. Sequential electrochemical oxidation and bio-treatment of the azo dye congo red and textile effluent. *J. Photochem. Photobiol., B* 200, 111655. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.111655>.
- Strik, D.P.B.T.B., Hamelers, H.V.M., Buisman, C.J.N., 2010. Solar energy powered microbial fuel cell with a reversible bioelectrode. *Environ. Sci. Technol.* 44 (1), 532–537. <https://doi.org/10.1021/es902435v>.
- Sun, J., Hu, Y., Li, W., Zhang, Y., Chen, J., Deng, F., 2015. Sequential decolorization of azo dye and mineralization of decolorization liquid coupled with bioelectricity generation using a pH self-neutralized photobioelectrochemical system operated with polarity reversion. *J. Hazard. Mater.* 289, 108–117. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.02.010>.
- Wang, Z., Zheng, Y., Xiao, Y., Wu, S., Wu, Y., Yang, Z., Zhao, F., 2013. Analysis of oxygen reduction and microbial community of air-diffusion biocathode in microbial fuel cells. *Bioresour. Technol.* 144, 74–79. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.06.093>.
- Xie, Q., Lu, Y., Tang, L., Zeng, G., Yang, Z., Fan, C., Wang, J., Atashgahi, S., 2020. The mechanism and application of bidirectional extracellular electron transport in the field

- of energy and environment. *Crit. Rev. Env. Sci. Technol.* 1–46. <https://doi.org/10.1080/10643389.2020.1773728>.
- Yang, G., Huang, L., You, L., Zhuang, L.i., Zhou, S., 2017. Electrochemical and spectroscopic insights into the mechanisms of bidirectional microbe-electrode electron transfer in *Geobacter soli* biofilms. *Electrochem. Commun.* 77, 93–97. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2017.03.004>.
- Yang, L.-H., Zhu, T.-T., Cai, W.-W., Haider, M.R., Wang, H.-C., Cheng, H.-Y., Wang, A.-J., 2018. Micro-oxygen bioanode: An efficient strategy for enhancement of phenol degradation and current generation in mix-cultured MFCs. *Bioresour. Technol.* 268, 176–182. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.07.025>.
- Yin, Q., Miao, J., Li, B.o., Wu, G., 2017. Enhancing electron transfer by ferroferric oxide during the anaerobic treatment of synthetic wastewater with mixed organic carbon. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 119, 104–110. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.09.023>.
- Yong, X.-Y., Yan, Z.-Y., Shen, H.-B., Zhou, J., Wu, X.-Y., Zhang, L.-J., Zheng, T., Jiang, M., Wei, P., Jia, H.-H., Yong, Y.-C., 2017. An integrated aerobic-anaerobic strategy for performance enhancement of *Pseudomonas aeruginosa*-inoculated microbial fuel cell. *Bioresour. Technol.* 241, 1191–1196. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.050>.
- Yu, Y., Wu, Y., Cao, B., Gao, Y.-G., Yan, X., 2015. Adjustable bidirectional extracellular electron transfer between *Comamonas testosteroni* biofilms and electrode via distinct electron mediators. *Electrochem. Commun.* 59, 43–47. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2015.07.007>.
- Yun, H., Liang, B., Kong, D., Wang, A., 2018. Improving biocathode community multifunctionality by polarity inversion for simultaneous bioelectroreduction processes in domestic wastewater. *Chemosphere* 194, 553–561. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.12.030>.
- Zheng, M., Xu, C., Zhong, D., Han, Y., Zhang, Z., Zhu, H., Han, H., 2019. Synergistic degradation on aromatic cyclic organics of coal pyrolysis wastewater by lignite activated coke-active sludge process. *Chem. Eng. J.* 364, 410–419. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.01.121>.

## 5 Conclusion du chapitre 3

Le cheminement expérimental décrit dans ce chapitre est parti d'une cathode flottante, dont on a constaté les limites, et a évolué vers une électrode capable de TEE bidirectionnels. Le milieu des eaux usées domestiques n'est pas assez chargé en matière organique pour permettre la formation d'une anode microbienne performante mais est déjà trop chargé pour aider au développement d'une cathode microbienne. Après avoir étudié la possibilité de former une anode microbienne puis de la basculer en cathode, les différents paramètres de l'expérience ont été fixés afin d'aboutir à une électrode bidirectionnelle performante présentée dans l'article n°3.

Les densités de courant obtenues en oxydation sont de l'ordre de  $6,4 \text{ A/m}^2$ , c'est-à-dire au niveau des meilleures performances reportées dans la bibliographie dans des eaux usées domestiques réelles, sans ajout de substrat. Lorsque l'aération débute, la densité de courant chute rapidement jusqu'à atteindre des valeurs cathodiques négatives. La densité de courant cathodique se stabilise aux alentours de  $-0,10 - -0,15 \text{ A/m}^2$  pour les réacteurs ouverts durant les phases anodiques contre  $-0,05 \text{ A/m}^2$  maximum pour les réacteurs sous azote en phases anodiques. Les réacteurs sous azote pendant les phases anodiques montrent une moindre capacité à passer en mode cathodique. Comme déjà signalé dans la bibliographie, les courants anodiques sont considérablement plus élevés que les courants cathodiques, que l'accepteur d'électrons soit de l'oxygène (Blanchet et al., 2014) ou non (Yang et al., 2017).

L'étude des populations microbiennes montre que le biofilm évolue peu au cours du temps et est peu sensible aux changements de bullage (air / azote), ce qui donne une électrode bidirectionnelle robuste qui maintient ses performances au cours du temps. La diversité, très élevée dans le milieu de culture, diminue au niveau du biofilm électroactif. Les espèces présentes dans le biofilm sont un mélange d'espèces généralement retrouvées dans des biofilms anodiques et dans des biofilms cathodiques.

Le fait d'avoir des réacteurs ouverts, sans bullage d'azote, donne des courants anodiques moins élevées mais cela est dû à la consommation parasite du substrat par les espèces aérobies et non aux performances du biofilm. Les courants cathodiques sont eux plus importants avec les réacteurs ouverts. Ces résultats démontrent qu'il est possible de former une électrode bidirectionnelle performante dans les eaux usées domestiques en alternant des phases sans bullages avec le réacteur ouvert et de courtes phases de bullages d'air.

Dans le chapitre suivant, ce système d'électrode capable de TEE bidirectionnels sera mis en place dans un réacteur de type biotuba en alternant des phases de bullage d'air et des

phases sans bullage avec le réacteur ouvert. Les performances électrochimiques et les populations microbiennes seront étudiées en parallèle.



## ***Chapitre 4 : Biotuba aéré en eaux usées domestiques***



## 1 Objectifs et choix de l'étude

Nous avons démontré dans le chapitre 3 qu'il est possible de former une électrode capable de TEE bidirectionnels dans les eaux usées domestiques, sans ajout de substrat, avec des réacteurs laissés à l'air libre, et que cette électrode résiste très bien aux courtes périodes de bullage d'air effectuées pendant les phases cathodiques. Le même système est mis en application ici dans une configuration biotuba. Le principe du biotuba est décrit dans la partie 6.1 du chapitre 1, il peut être considéré comme une pile à combustible microbienne (PCM) mise en court-circuit et se présente généralement sous la forme d'une électrode unique avec une partie haute cathodique et une partie basse anodique (Figure 5.1).

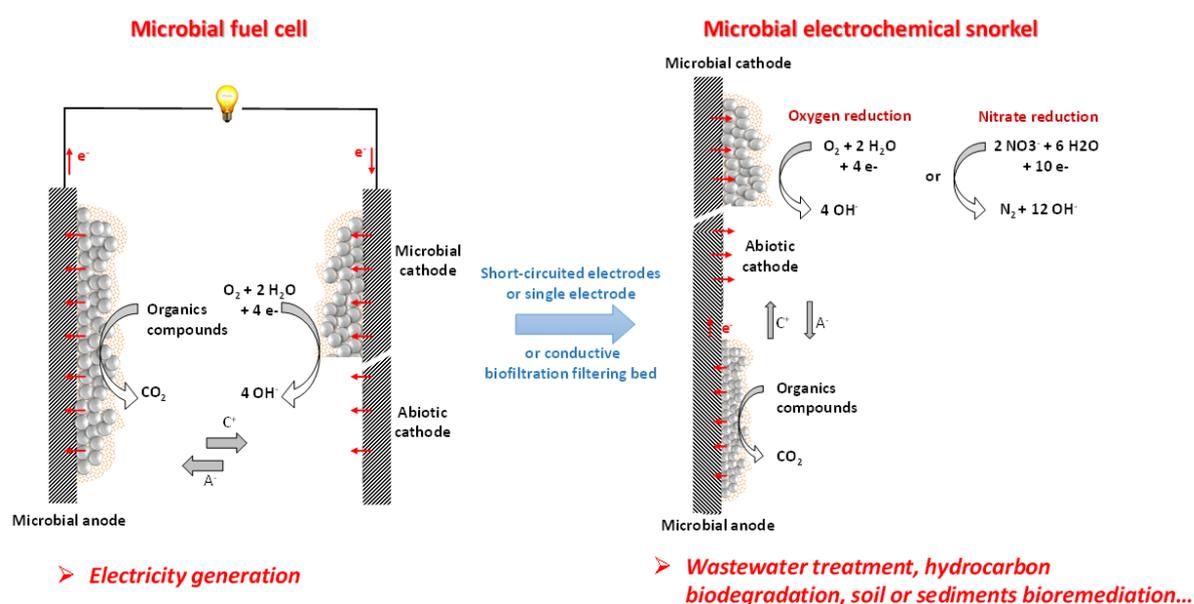


Figure 4.1 : De la PCM au biotuba (Hoareau et al., 2019).

Les expériences présentées dans ce chapitre ont pour objectif de concevoir un biotuba aéré. Deux stratégies sont utilisées : la première est une aération continue de la partie haute, la partie basse restant anaérobie. Ce type de biotuba est couramment décrit dans la bibliographie. La deuxième stratégie consiste en une aération séquentielle de l'ensemble du biotuba ou uniquement de la partie haute, c'est-à-dire la succession de périodes avec aération et de périodes sans aération. Cette configuration se rapproche de celle utilisée dans le chapitre 3 pour les électrodes bidirectionnelles. Il s'agit alors un biotuba aéré capable d'EET bidirectionnels.

La suite de ce chapitre s'articule en trois parties. Deux types de biotubas ont été utilisés, nommés Biotuba\_26 et Biotuba\_48 selon la hauteur maximale d'électrode dont ils sont équipés, 26 ou 48 cm (chapitre 2 – partie 2.1.2).

Dans la partie 2, qui suit, le Biotuba\_26 est d'abord utilisé avec une aération en continu, qui n'a pas convenu.

Le Biotuba\_26 est ensuite testé dans la partie 3 avec une aération séquentielle, dans tout le réacteur ou uniquement dans la partie haute. Ce biotuba de 26 cm de haut s'est avéré trop court pour assurer des zones aérobie et anaérobie distinctes et stables. Le Biotuba\_48 a donc été conçu avec une électrode de 48 cm de haut, afin de favoriser la présence de zones aérobie et anaérobie. L'expérience acquise a conduit à mettre en œuvre le Biotuba\_48 avec une aération séquentielle en partie haute. La fin de la partie 3 progresse vers l'optimisation de l'abattement de la matière organique, décrite dans l'Article n°4, soumis au journal *Electrochimica Acta*.

La partie 4 présente l'ajustement des phases de l'aération séquentielle du Biotuba\_48, ainsi qu'une analyse des populations microbiennes.

Les détails des montages expérimentaux utilisés dans ce chapitre sont décrits dans le chapitre 2 : le montage électrochimique de type biotuba dans la partie 2.3 et les réacteurs Biotuba\_26 et Biotuba\_48 dans la partie 2.1.2. Les techniques électrochimiques, de mesure de la DCO et de l'oxygène dissout ainsi que les méthodes d'analyse des populations microbiennes sont présentées dans le chapitre 2, partie 3. Toutes les expériences de ce chapitre sont démarrées avec des eaux usées réelles non hydrolysées inoculées avec 5% de boues activées (chapitre 2 – parties 1.1.1 et 1.2.2). Lorsque des changements de réservoirs sont indiqués, ces derniers sont remplis d'eaux usées hydrolysées.

## 2 Biotuba\_26 avec aération continue

### 2.1 Expériences préliminaires sans biotuba, essais 1 à 6

Les réacteurs utilisés pour les Biotubas\_26 sont des cylindres de 4 cm de diamètre et 27 cm de haut. La première phase du travail a consisté à évaluer le transport de l'oxygène dans ces réacteurs grâce à six essais successifs. Ces essais sont réalisés en batch, avec 350 mL d'eaux usées inoculées avec 5% de boues activées, sans électrode, en faisant varier les conditions d'aération et d'agitation à l'aide d'un barreau magnétique (Tableau 4.1). Pour

ces essais, l'aération est réalisée grâce à une pompe d'aquarium, reliée à un tuyau de 4,8 mm de diamètre, lui-même relié à une aiguille de diamètre 0,4 ou 0,8 mm. L'objectif de ces essais est de régler les conditions d'aération et d'agitation afin de stabiliser un profil de concentration en oxygène dissout avec une partie haute aérobie et une partie basse anaérobie, chacune d'environ la moitié du réacteur.

Les mesures de la concentration d'oxygène dissout ont été réalisées tous les 5 cm sur une hauteur de 25 cm. Pour l'aération « en haut », l'aiguille est placée 2 cm en dessous de la surface de la solution. Pour les cinq premiers essais il n'a pas été possible de créer le profil de concentration en oxygène recherché (Tableau 4.1). En aérant avec l'aiguille de 0,8 mm de diamètre, et bien qu'il n'y ait pas d'agitation supplémentaire de la solution, la concentration en oxygène est uniforme à 7-8 mg/L dans tout le réacteur au bout d'une heure. La valeur de 7-8 mg/L est légèrement inférieure à la solubilité maximale de l'oxygène dans l'eau pure à 20 °C (9,09 mg/L).

Lorsque l'aération est associée à l'agitation de la solution, la concentration en oxygène reste nulle dans le réacteur tout au long de l'essai. En l'absence d'agitation, une sédimentation des boues activées est observée. Lorsque le milieu est agité, il n'y a pas de sédimentation visible. Les microorganismes sont donc répartis sur toute la hauteur et la consommation par les bactéries aérobies est alors bien plus rapide que le transfert de l'oxygène au sein de la solution.

Tableau 4.1 : Profils de concentration en oxygène dissout en fonction des conditions d'aération lors des essais préliminaires sans électrode.

Montage expérimental				
Réacteur « Biotuba_26 »		1 seul réacteur en batch		
Sans électrode		Milieu : eaux usées entrée + 5% de boues activées (350 mL)		
Essai	Aération	Ø Aiguille (mm)	Agitation	Oxygène dissout
1	En haut	0,8	Non	Profil uniforme à 7-8 mg/L en 1h dans tout le réacteur
2	Au milieu	0,8	Non	Profil uniforme à 7-8 mg/L en 1h dans tout le réacteur

Essai	Aération	Ø Aiguille (mm)	Agitation	Oxygène dissout
3	Absente	-	Non	Concentration quasi nulle dans tout le réacteur
4	Absente	-	Oui	Concentration quasi nulle dans tout le réacteur
5	En haut	0,8	Oui	Concentration quasi nulle dans tout le réacteur
6	En haut	0,4	Non	Profil de concentration intéressant (Figure 4.2)

Pour l'essai n°6, l'aération est réalisée avec une aiguille de 0,4 mm de diamètre. En réduisant le diamètre et en laissant le débit constant, la vitesse du train de bulles est plus rapide et les bulles plus petites. L'aiguille est placée en haut du réacteur (2 cm sous la surface de la solution) et la solution n'est pas agitée. Le profil de concentration en oxygène recherché est enfin obtenu (Figure 4.2). Durant les 2 heures 30 minutes de l'essai, la concentration est quasi nulle au fond du réacteur et jusqu'à 15 cm de hauteur. A 20 et 25 cm de hauteur, la concentration augmente pendant les 20 premières minutes jusqu'à se stabiliser aux alentours de 3 et 4 mg/L, respectivement. Malgré la chute de la concentration en oxygène de 3 à 2 mg/L à 20 cm de hauteur entre 80 et 140 minutes, le profil présente tout de même une stabilité satisfaisante pour environ deux heures (entre 20 et 140 minutes).

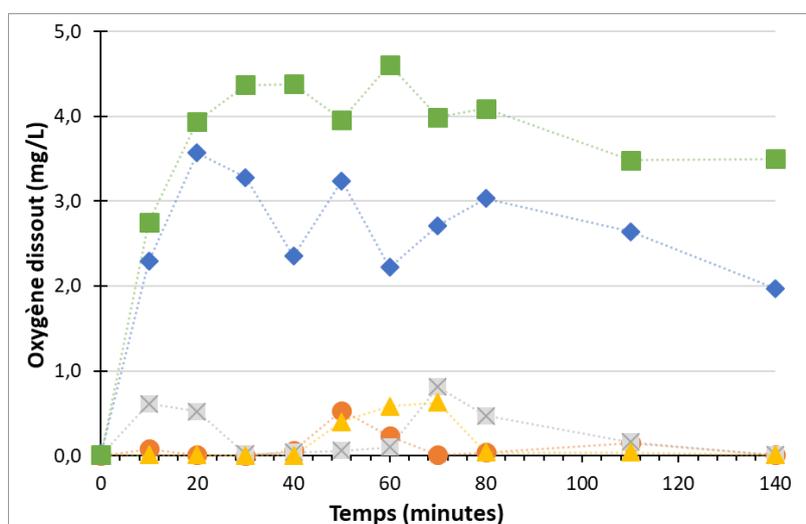


Figure 4.2 : Essai préliminaire n°6 sans électrode. Concentrations en oxygène dissout mesurées à différentes hauteurs en fonction du temps.

L'essai préliminaire n°6 étant encourageant, ces conditions : aération à l'aide d'une aiguille de 0,4 mm de diamètre en haut du réacteur et sans agitation de la solution, sont retenues pour la suite des travaux.

## 2.2 Expériences avec le Biotuba\_26

Le mode d'aération continu retenu à la suite des expériences préliminaires a été mis en œuvre dans deux expériences successives réalisées dans un réacteur Biotuba\_26 (Tableau 4.2). L'électrode avait alors une hauteur de 26 cm et le réacteur contenait 27 cm de mélange eaux usées + 5% de boues activées (EU + BA) soit environ 300-350mL.

Tableau 4.2 : Conditions expérimentales communes aux expériences Biotuba\_26.1 et 26.2.

<b>Montage expérimental (chapitre 2 – parties 2.1.2 et 2.3)</b>	
<b>Réacteurs « Biotuba_26 »</b>	Electrode de travail : feutre de carbone +tige en titane Electrode de référence : ECS
<b>Technique électrochimique (chapitre 2 – partie 3.1.2)</b>	
<b>OCP</b>	Mesure toutes les 10 minutes durant toute l'expérience

### 2.2.1 Biotuba\_26.1

La première expérience (Biotuba\_26.1) ne dure que 3 heures et n'utilise qu'un seul réacteur en batch. Elle est réalisée dans le but de confirmer que les conditions d'aération sélectionnées restent adaptées en présence de l'électrode.

En présence de l'électrode, le profil de concentration en oxygène dissout est similaire à celui obtenu dans l'essai préliminaire n°6. L'oxygène est absent de 0 à 15 cm et sa concentration est de 3 à 7 mg/L à 20 et 25 cm (Figure 4.3A). Quelques différences sont cependant à noter : la concentration à 25 cm est plus élevée avec des valeurs proches du maximum, entre 5 et 7 mg/L et ce jusqu'à la fin de l'expérience. A 20 cm, la concentration atteint 3 mg/L au bout de 30 minutes puis chute rapidement. Au bout de 90 minutes la concentration en oxygène à 20 cm est nulle, jusqu'à la fin de l'expérience.

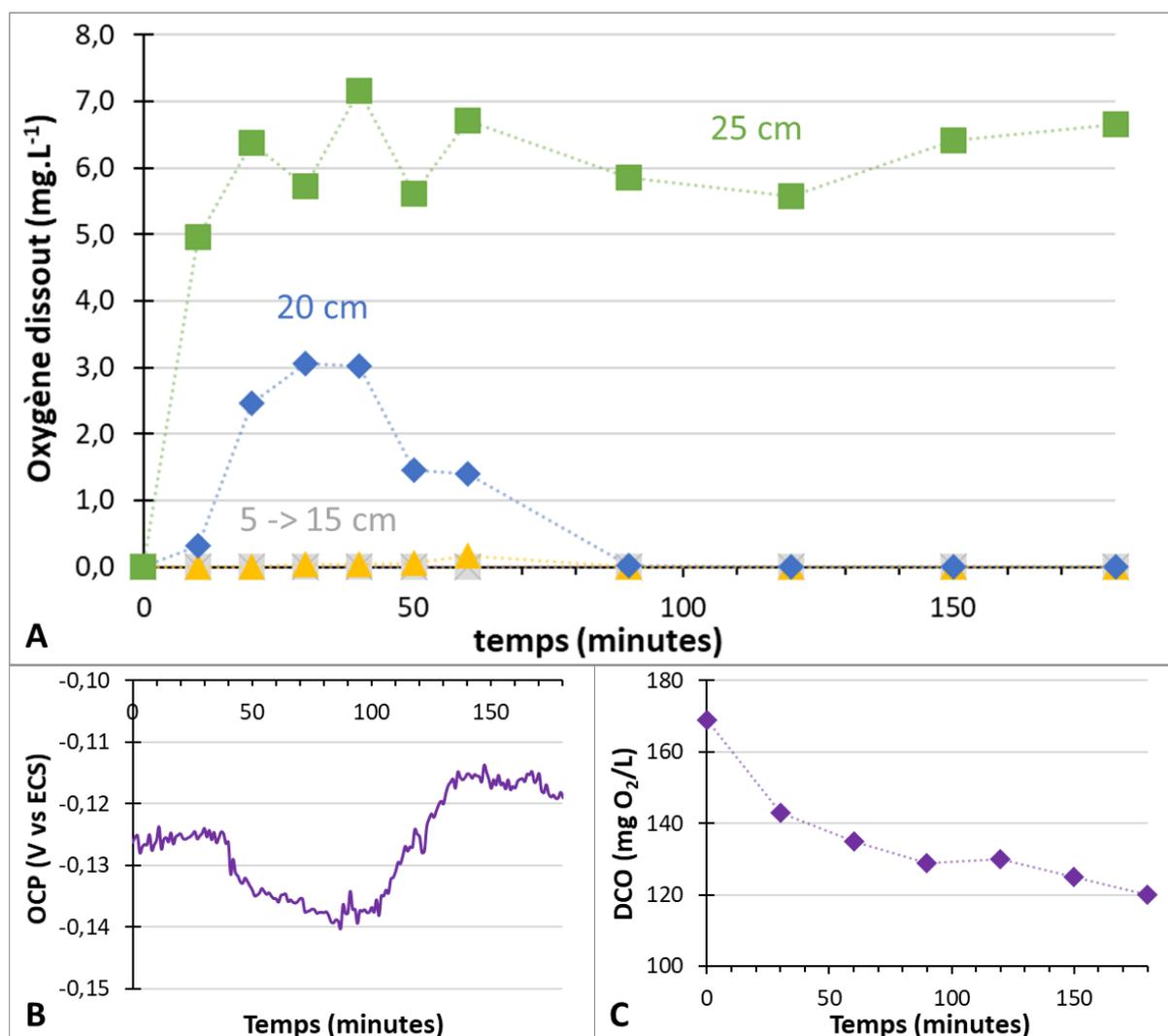


Figure 4.3 : Biotuba\_26.1 avec aération continue. (A) Concentrations en oxygène dissout mesurées à différentes hauteurs en fonction du temps (B) Suivi de l'OCP du biotuba en fonction du temps, (C) DCO soluble en fonction du temps.

L'OCP du biotuba varie entre -0,14 et -0,11 V vs ECS (Figure 4.3B). Ces potentiels sont dans la gamme d'OCP mesurée sur les cathodes à air bidirectionnelles lors des périodes d'aération, à savoir entre -0,2 et 0,3 V vs ECS (alors que les valeurs étaient inférieures à -0,3 V vs ECS en l'absence d'aération). Un abattement de 29% de la DCO soluble (DCO<sub>s</sub>) est observé, avec des valeurs passant de 169 à 120 mg d'O<sub>2</sub>/L en 3 heures (Figure 4.3C). Il faut toutefois noter que, l'expérience ayant duré 3 heures, cette dégradation est certainement une dégradation aérobie de la matière organique par les bactéries des boues activées en présence de l'aération forcée. En effet, le laps de temps est trop court pour qu'un biofilm électroactif ait pu commencer à se former sur l'électrode.

### 2.2.2 Biotuba\_26.2

A partir des expériences préliminaires et de l'expérience Biotuba\_26.1, une première expérience de Biotuba\_26 aéré est menée sur une longue durée (63 jours) dans des réacteurs de type Biotuba\_26, en recirculation. La boucle de recirculation (réacteur + réservoir) contient 2 L d'un mélange EU + BA dont 27 cm dans le réacteur (300-350 mL). Un ensemble de 8 réacteurs est installé, avec deux réacteurs identiques (duplicats) pour chaque condition : biotuba et contrôle sans électrode, chacun avec et sans aération (Tableau 4.3). L'aération en continu est toujours réalisée en haut du réacteur avec une aiguille de diamètre 0,4 mm. Au jour 58, l'aiguille est remplacée par une aiguille de diamètre 0,8 mm dans un réacteur avec électrode et un contrôle sans électrode jusqu'à la fin.

A partir de cette expérience et sauf mention contraire, les flèches noires sur les graphes signalent les changements de réservoirs d'eaux usées.

Tableau 4.3 : Conditions expérimentales de l'expérience Biotuba\_26.2.

Electrode	Aération	Nombre de réacteurs
Oui	Aération en continu	2
Oui	Sans aération	2
Non	Aération en continu	2
Non	Sans aération	2
Conditions de recirculation (chapitre 2 – partie 2.1.3)		
<b>Réservoir</b>	Débit de recirculation : 1,5 mL/min	
<b>Flacon en verre de 2L</b>	HRT ≈ 4h	

Le suivi de l'OCP des biotubas, avec et sans aération met en lumière deux profils. Au début de l'expérience, le potentiel se stabilise aux alentours de -0,4 V vs ECS pour les biotubas non aérés, alors qu'il se situe entre -0,2 et 0 V vs ECS pour les biotubas aérés (Figure 4.4). Il a cependant été difficile de maintenir le profil d'aération obtenu lors des précédents essais pendant 63 jours, sans doute à cause du développement du biofilm. Cela se traduit par un manque de stabilité de l'OCP des réacteurs aérés : l'OCP varie de +0,2 dans de bonnes conditions d'aération à -0,5 V vs ECS, un potentiel qui est même inférieur aux valeurs enregistrées sans aération forcée.

Des floccs microbiens ont tendance à se former autour des aiguilles, à cause de la concentration élevée en oxygène qui favorise le développement bactérien. Ces amas gênent le transfert de l'oxygène, entraînant la chute du potentiel. Lorsque ces amas sont retirés, l'OCP remonte. Vers la fin de l'expérience, au jour 58, l'aiguille de bullage est changée dans un des réacteurs, passant d'un diamètre de 0,4 à 0,8 mm (dernière flèche noire, courbe jaune, Figure 4.4). Une remontée du potentiel est observée à ce moment-là, contrairement au duplicat dont l'aiguille n'a pas été changée. Dans un des réacteurs sans aération, un problème de pompe au jour 45 a entraîné la mise à l'air de la partie haute de l'électrode et une remontée du potentiel. L'importance de ce phénomène accidentel est commentée dans la section suivante.

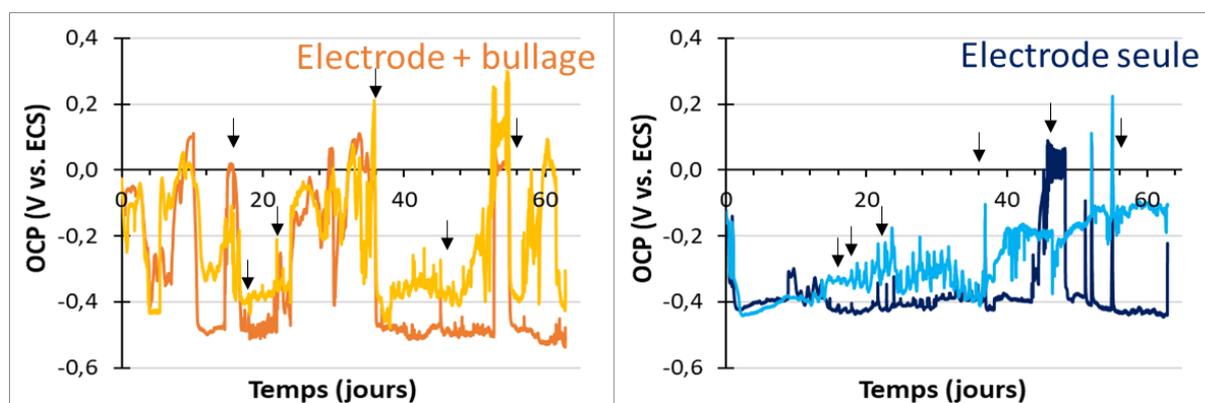


Figure 4.4 : Formation d'un Biotuba<sub>26</sub> aéré en continu. Suivi de l'OCP du biotuba en fonction du temps dans les réacteurs (à gauche) avec aération forcée et (à droite) sans, en duplicats, lors de l'expérience Biotuba<sub>26.2</sub>.

Les difficultés à maintenir une aération conséquente dans la partie haute du réacteur tout en gardant la partie basse anaérobie sur le long terme deviennent flagrantes lorsqu'on consulte les mesures en oxygène dissout au cours du temps (Figure 4.5). Dans les réacteurs avec électrode, les valeurs varient de 0 à 4,5 mg/L à une hauteur de 25 cm. Ces valeurs, plus basses que précédemment, indiquent que le transfert de l'oxygène est plus difficile, même proche de la zone de bullage (l'aiguille du bullage est placée tout en haut, à 2 cm de la surface libre).

Dans l'un des réacteurs avec électrode (n°1 sur la Figure 4.5), la concentration est même nulle sur toute la hauteur à partir du jour 36 et jusqu'à la fin. Dans le réacteur n°2, le passage à une aiguille deux fois plus grosse (flèche rose) au jour 58 permet à la concentration d'atteindre à nouveau 4,5 mg/L mais pour seulement quelques jours, puisqu'au jour 63 la concentration est à nouveau nulle dans tout le réacteur.

Dans les réacteurs de contrôle, l'absence d'électrode permet un meilleur transfert de l'oxygène, entraînant parfois le problème inverse avec une concentration de 3,5 mg/L au fond du réacteur, partie censée être anaérobie. De la même façon, l'aiguille de plus grand diamètre provoque l'augmentation transitoire de la concentration en oxygène. Il reste très difficile de stabiliser le profil de concentration d'oxygène souhaité.

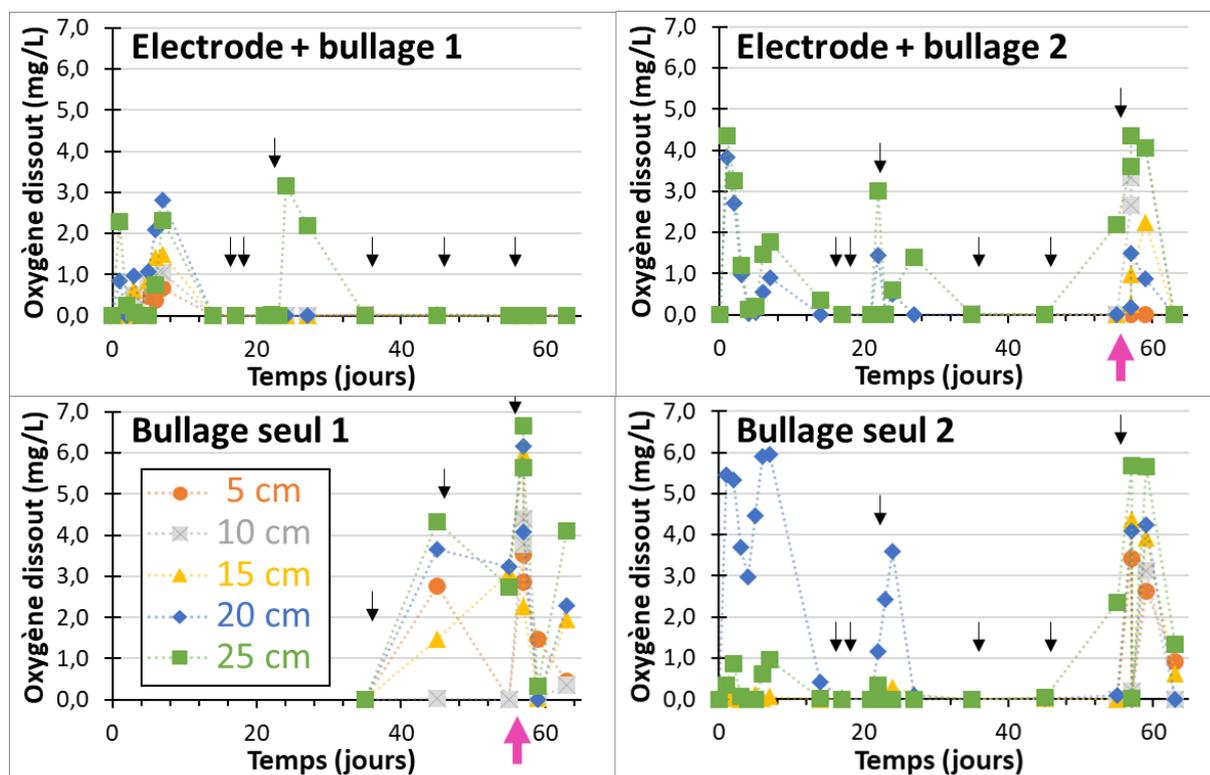


Figure 4.5 : Biotuba\_26.2 avec aération continue. Profils de concentration en oxygène dissout à différentes hauteurs en fonction du temps. Deux réacteurs avec électrode et deux contrôles sans électrode. Le passage d'une aiguille de diamètre 0,4 mm à 0,8 mm dans deux réacteurs au jour 58 est indiqué par une flèche rose.

Les mesures de DCO<sub>s</sub> (Figure 4.6) montrent un effet de l'aération d'une part et de la présence de l'électrode d'autre part. Les réacteurs aérés et équipés d'une électrode permettant d'obtenir la DCO la plus faible. Dans ce cas, une valeur minimale de 27 mg d'O<sub>2</sub>/L est atteinte au jour 36, soit 14 jours après le changement de réservoir. L'effet combiné de l'électrode et de l'aération est significatif puisque les valeurs minimales en DCO<sub>s</sub> se situent entre 48 mg d'O<sub>2</sub>/L pour l'électrode seule (sans aération) ou le bullage seul (aération sans électrode) et 64 mg d'O<sub>2</sub>/L pour le contrôle sans bullage ni électrode.

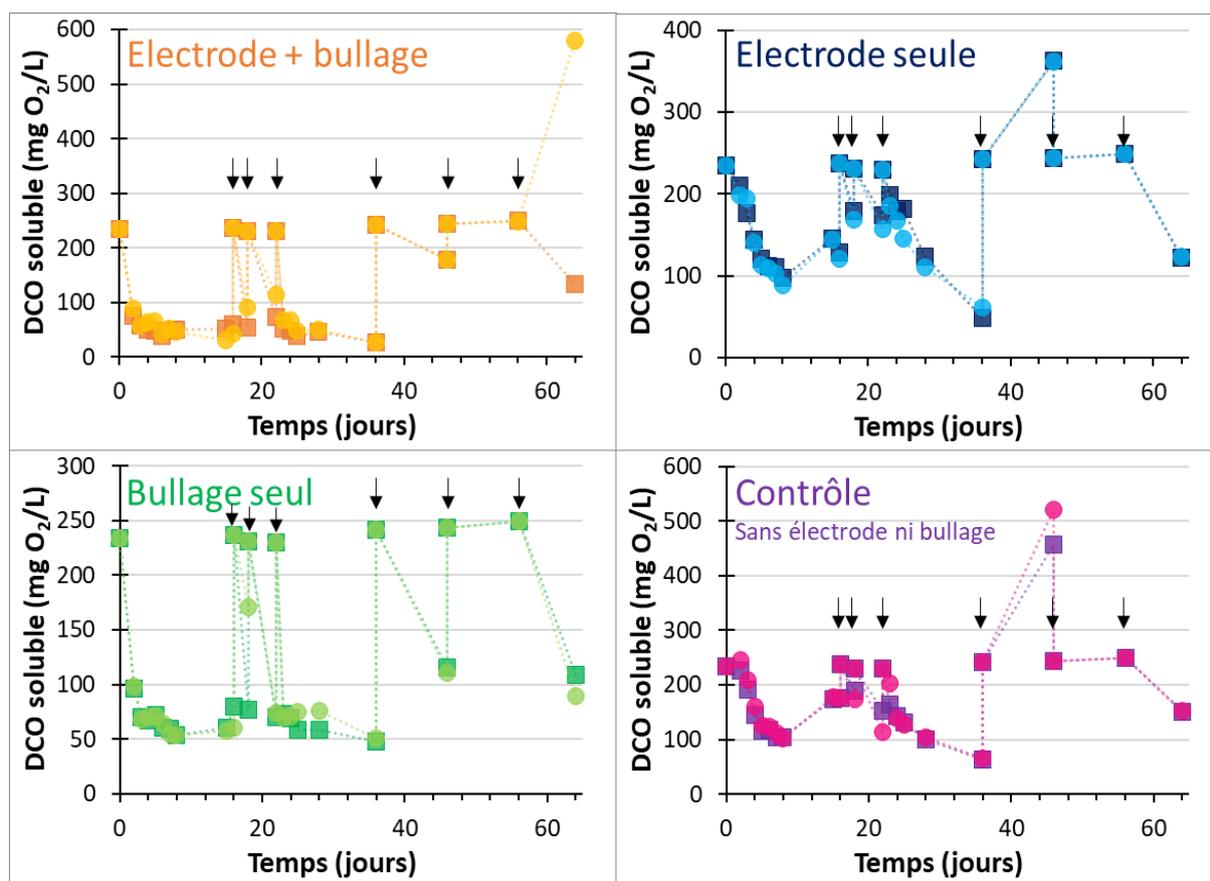


Figure 4.6 : Biotuba\_26.2 avec aération continue. DCO soluble en fonction du temps en sortie du réacteur avant le changement de réservoir (valeurs basses) et dans le nouveau réservoir mis en place (valeurs hautes + flèches), en duplicats.

La même tendance est observée pour la DCO totale ( $DCO_T$ ), même si les variations entre les mesures sont plus importantes. La valeur minimale obtenue avec électrode et aération est de 33 mg d'O<sub>2</sub>/L, toujours au jour 36 (Figure 4.7). Dans les autres réacteurs, les tendances sont les mêmes que pour la DCO<sub>s</sub> mais avec une variabilité beaucoup plus grande entre les duplicats. Les valeurs minimales moyennées entre les duplicats sont de 153 ± 31 mg d'O<sub>2</sub>/L pour l'électrode seule, 124 ± 70 mg d'O<sub>2</sub>/L pour le bullage seul et 132 ± 4 mg d'O<sub>2</sub>/L pour le contrôle.

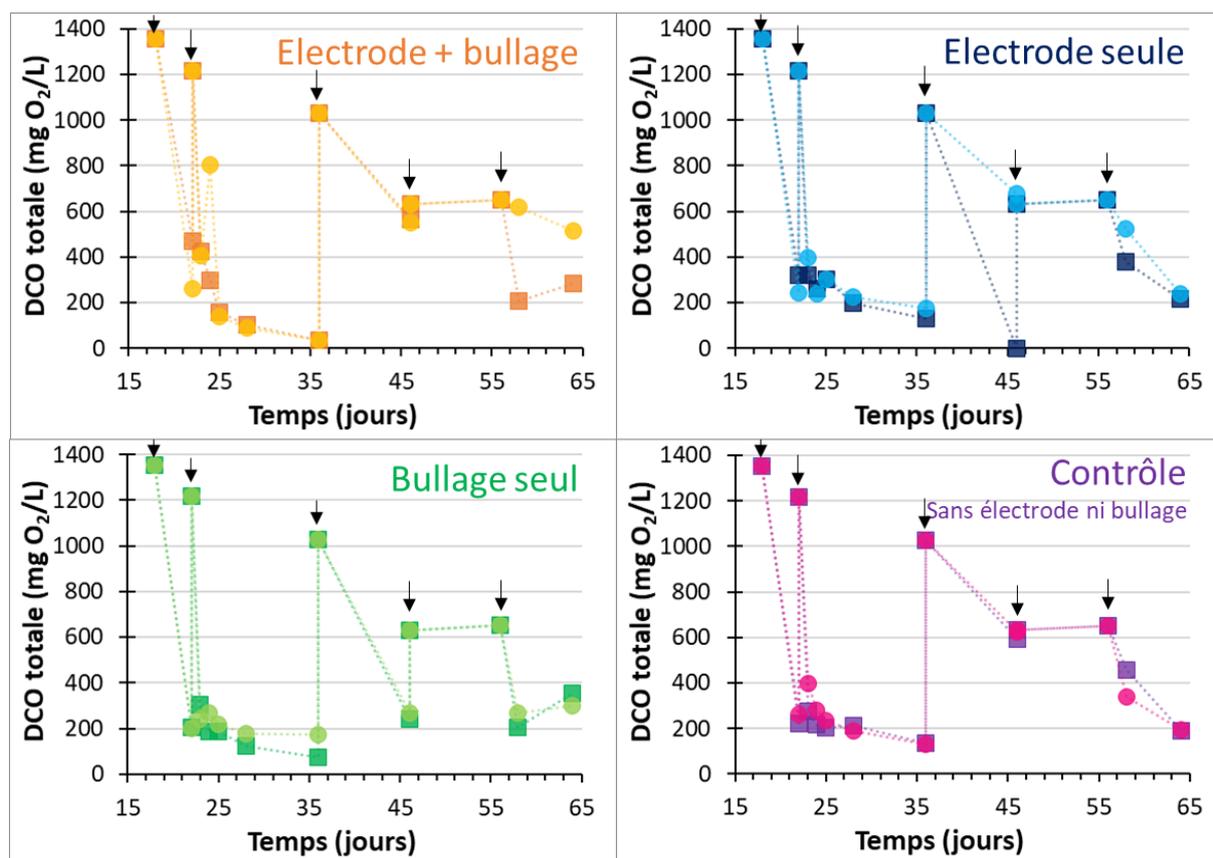


Figure 4.7 : Biotuba\_26.2 avec aération continue. DCO totale en fonction du temps en sortie du réacteur avant le changement de réservoir (valeurs basses) et dans le nouveau réservoir mis en place (valeurs hautes + flèches), en duplicats.

Face à la grande variabilité de la DCO<sub>T</sub>, des tests de reproductibilité de la méthode de mesure et du prélèvement ont été réalisés dans certains réacteurs lors de l'expérience Biotuba\_26.2 (Tableau 4.4). Pour tester la reproductibilité de la mesure, un prélèvement unique est réalisé puis trois mesures de DCO sont faites à partir de cet unique prélèvement. Pour le test de reproductibilité du prélèvement, trois prélèvements successifs sont réalisés et une seule mesure est faite pour chaque prélèvement.

Ces tests montrent que la mesure de DCO<sub>S</sub> est fiable puisque l'écart-type n'excède pas 7 mg d'O<sub>2</sub>/L pour une valeur moyenne de 249 pour la reproductibilité de la méthode, et 5 mg d'O<sub>2</sub>/L pour une valeur moyenne de 122 pour la reproductibilité du prélèvement. Pour la DCO<sub>T</sub>, en revanche, une grande dispersion est observée, égale à atteint  $\pm 162$  mg d'O<sub>2</sub>/L pour une valeur moyenne de 379 mg d'O<sub>2</sub>/L. Les particules présentes dans le milieu, dont les tailles sont assez hétérogènes, en sont certainement la principale cause. Il suffit qu'une particule de matière organique de taille plus importante passe dans le prélèvement pour obtenir une valeur aberrante. Pour tenter d'améliorer la reproductibilité, la DCO<sub>T</sub> sera mesurée par la suite après

une étape de sédimentation permettant d'éliminer les particules les plus importantes qui, de toute façon, ne sont pas consommées par le biofilm. L'échantillon est laissé au repos pendant 30 minutes avant d'effectuer la mesure de DCO<sub>T</sub> avec le surnageant.

Tableau 4.4 : Expérience Biotuba\_26.2 avec aération continue. Tests de reproductibilité de la méthode (un prélèvement, trois mesures) et du prélèvement (trois prélèvements, trois mesures) des mesures de DCO soluble et totale.

DCO	Prélèvement	Réacteur	DCO (mg O <sub>2</sub> / L)				Ecart-Type
			1	2	3	Moyenne	
Soluble	Unique	Eaux usées seules	239	254	255	<b>249</b>	<b>7</b>
	Trois successifs	Electrode +bullage	135	131	137	<b>134</b>	<b>2</b>
		Electrode seule	119	118	129	<b>122</b>	<b>5</b>
Totale	Unique	Electrode +bullage	277	170	179	<b>209</b>	<b>48</b>
		Electrode seule	606	292	238	<b>379</b>	<b>162</b>
	Trois successifs	Electrode +bullage	312	278	265	<b>285</b>	<b>20</b>
		Electrode seule	181	207	255	<b>214</b>	<b>31</b>

L'expérience Biotuba\_26.2 a mis en lumière la difficulté de maintenir des conditions d'aération stables sur le long terme avec une partie haute aérobie et une partie basse anaérobie. Au fil du temps, la formation de floccs microbiens proche du lieu d'aération bloque le transfert de l'oxygène dans le milieu. La stratégie est donc modifiée pour l'essai suivant : l'aération en continu est remplacée par une aération séquentielle, de la même façon que pour les électrodes bidirectionnelles présentées au chapitre précédent.

### 3 Biotuba\_26 avec aération séquentielle

#### 3.1 Biotuba\_26.3

Pour l'expérience Biotuba\_26.3, réalisée sur 78 jours, l'aération séquentielle est réalisée avec une aiguille de 0,8 mm de diamètre. L'expérience comprend huit réacteurs menés en parallèle. Chaque réacteur contient une électrode de 26 cm et la hauteur du

mélange EU + BA est de 27 cm. Il y a donc 1 cm de solution au-dessus de l'électrode. Une recirculation est mise en place et le couple réacteur + réservoir contient au total 2 L de solution. Deux réacteurs ont une aération séquentielle tout au fond du réacteur, 2 réacteurs ont une aération séquentielle 2 cm en dessous de la surface de la solution, deux réacteurs sans aération sont polarisés et 2 contrôles ne sont pas équipés d'électrode et ont une aération séquentielle au fond (Tableau 4.7).

Les deux réacteurs qui sont polarisés à -0,1 V vs ECS sont équipés d'un montage à trois électrodes avec électrode de travail, contre électrode et électrode de référence. La contre électrode avait alors une surface d'environ 13 cm<sup>2</sup>. La configuration des réacteurs n'a pas permis de concevoir un système électrochimique totalement correct, notamment avec une électrode auxiliaire qui serait au moins aussi grande que l'électrode de travail et serait disposée autour de cette dernière. Il existe par conséquent de forts gradients de potentiel au sein de ces systèmes. Ici, l'objectif des réacteurs avec polarisation n'était pas d'aller vers une analyse des processus mais seulement d'évaluer l'intérêt éventuel d'une étape de formation du biofilm sous polarisation. Malgré l'imperfection du système d'un point de vue de l'ingénierie électrochimique, il devrait permettre de détecter un effet de la polarisation même si elle ne s'exerce que sur une partie de l'électrode.

Tableau 4.7 : Conditions expérimentales pour l'expérience Biotuba\_26.3 avec aération séquentielle.

<b>Montage expérimental (chapitre 2 – parties 2.1.2, 2.1.3 et 2.3)</b>	
<b>Réacteurs « Biotuba_26 »</b>	Electrode de travail : feutre de carbone +tige en titane
<b>78 jours</b>	Electrode de référence : ECS
	Contre électrode : grille de platine (2 réacteurs polarisés)
<b>Réservoir</b>	Débit de recirculation : 1,5 mL/min
<b>Flacon en verre de 2L</b>	HRT ≈ 4h
<b>Milieu de culture + inoculum (chapitre 2 - parties 1.1.1 et 1.2.2)</b>	
<b>Milieu initial</b>	Eaux usées réelles non hydrolysées + 5% de boues activés
<b>Changements de milieu</b>	Eaux usées réelles hydrolysées
<b>Volume</b>	27 cm dans le réacteur, 300-350mL

Electrode	Aération séquentielle	Nombre de réacteurs
Oui	Aération séquentielle en bas, aiguille Ø 0,8 mm	2
Oui	Aération séquentielle en haut, aiguille Ø 0,8 mm	2
Oui	Sans aération, polarisé	2
Non	Aération séquentielle en bas, aiguille Ø 0,8 mm	2
Techniques électrochimiques (chapitre 2 – parties 3.1.1 et 3.1.2)		
<b>OCP</b>	Mesure toutes les 10 minutes durant toute l'expérience	
<b>CA</b>	E = -0,1 V vs ECS	

Le lien entre aération et OCP est décrit plus en détail dans la partie 3.3 de ce chapitre puisqu'il s'agit de la base de notre article intitulé « *Oxygen Supply Management to Intensify Domestic Wastewater Treatment by a Microbial Electrochemical Snorkel (MES)* ». En quelques mots, les périodes d'aération sont destinées à atteindre un potentiel haut aux alentours de 0 V vs ECS lorsque la concentration en oxygène est à saturation. Lorsque la phase d'aération est stoppée, le potentiel évolue plus ou moins rapidement vers des valeurs basses de l'ordre -0,4 et -0,5 V vs ECS lorsque la concentration en oxygène est nulle (Figure 4.8A). Au début de l'expérience, l'aération est démarrée ou arrêtée manuellement lorsque le potentiel haut ou bas est atteint. Après 36 heures, des phases automatiques d'aération sont mises en place, comprenant 2 heures avec aération pour 4 heures sans. Les potentiels haut et bas restent stables au gré des périodes avec et sans aération sur les 5 premiers jours de l'expérience, indépendamment du positionnement de l'aération, en bas du réacteur (Figure 4.8B) ou en haut (Figure 4.8C).

Evidemment, l'objectif est de maintenir le plus longtemps possible le biotuba à un potentiel élevé, car c'est aux potentiels élevés que l'oxydation de la matière organique est la plus rapide, tout en effectuant des phases d'aération les plus courtes et les plus espacées possibles, puisque ce sont ces phases qui consomment de l'énergie dans un procédé de traitement d'eaux usées.

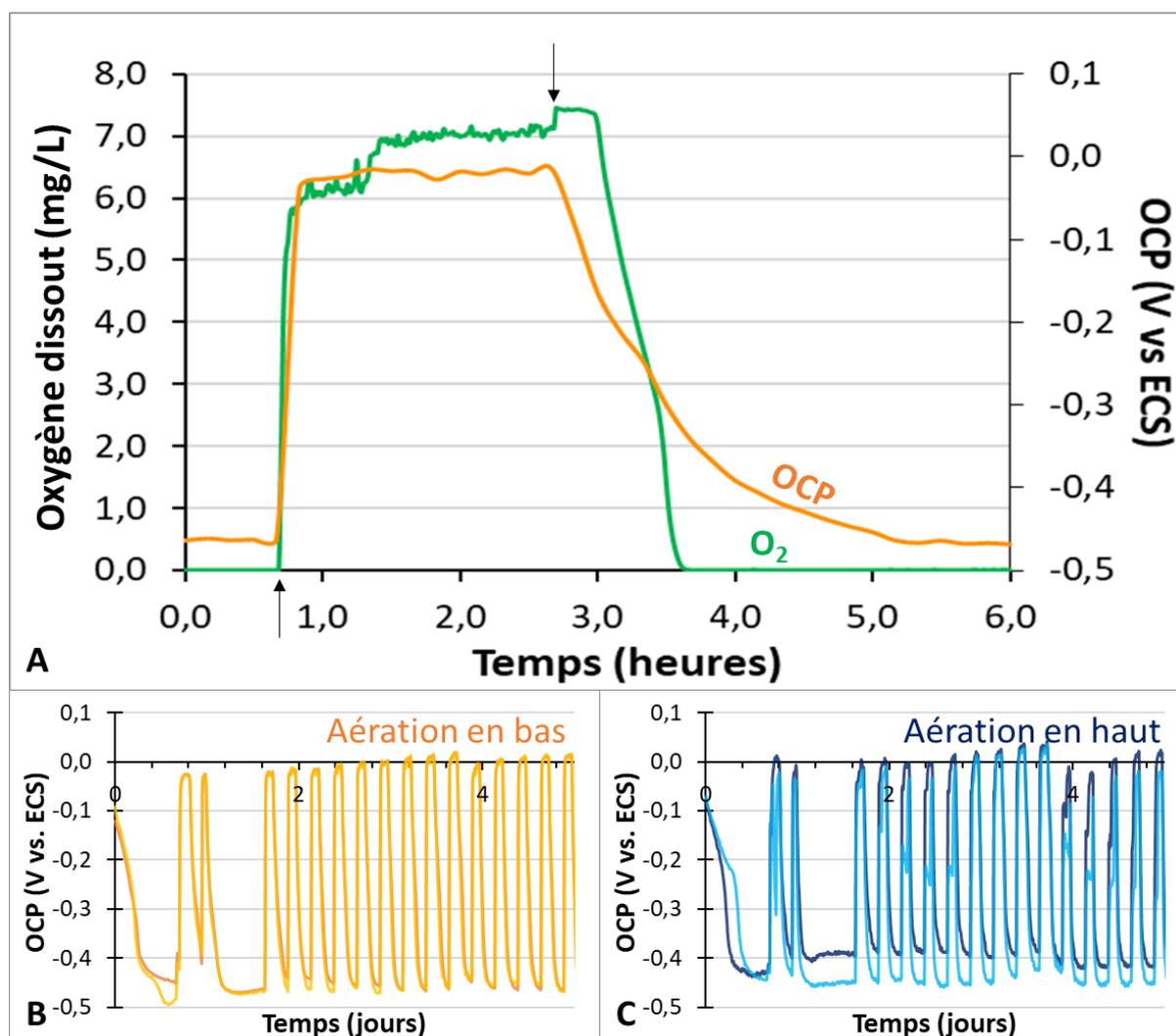


Figure 4.8 : Biotuba\_26.3 avec aération séquentielle. (A) Evolution de l'OCP et de la concentration en oxygène dissout pendant 6 heures lors du démarrage (flèche vers le haut) et de l'arrêt (flèche vers le bas) de l'aération. (B) Suivi de l'OCP du biotuba pendant 5 jours dans les réacteurs avec aération en bas ou (C) en haut ; les diagrammes de (B) et (C) présentent des duplicats.

La Figure 4.9, similaire à la Figure 4.8B et C, est très compactée car elle s'étend sur toute la durée de l'expérience. Son intérêt est de montrer que, dans les réacteurs avec aération en bas, le potentiel varie bien entre une borne haute et une borne basse selon l'aération dont les valeurs sont stables durant presque toute la durée de l'expérience.

En revanche, pour les réacteurs avec l'aération en haut, l'amplitude de variation du potentiel diminue à cause de la diminution de la borne haute. Comme précédemment, des floccs microbiens se développent au niveau de l'aiguille d'aération et gênent le transfert de

l'oxygène. Au jour 43, un nettoyage des réacteurs (les flocs sont retirés et les tuyaux de recirculation nettoyés) permet de retrouver l'alternance des potentiels haut et bas mais pour seulement une semaine environ. A partir du jour 43, à chaque changement de réservoir, les tuyaux des pompes sont changés pour maintenir une recirculation efficace et les amas sont enlevés. Malgré ces efforts, l'amplitude entre les potentiels hauts et bas est difficile à maintenir. Une aération haute n'assure pas une surface cathodique suffisante pour maintenir le potentiel du biotuba à des valeurs élevées.

Un point important à noter ici est le problème de pompe survenu entre les jours 60 et 64 qui a entraîné une vidange partielle d'un réacteur (courbe bleue claire sur la Figure 4.8). Une partie de l'électrode était donc exposée à l'air. Le potentiel à ce moment-là remonte à des valeurs positives, similaires à celles attendues lors des phases d'aération. Ce phénomène, déjà observé lors de l'expérience Biotuba\_26.2, suggère que la partie émergée de l'électrode puisse jouer le rôle de cathode et ainsi maintenir le potentiel du tuba à des valeurs hautes. Cet incident est à l'origine du concept d'électrode émergée présenté dans les chapitres 5 et 6 de ce manuscrit.

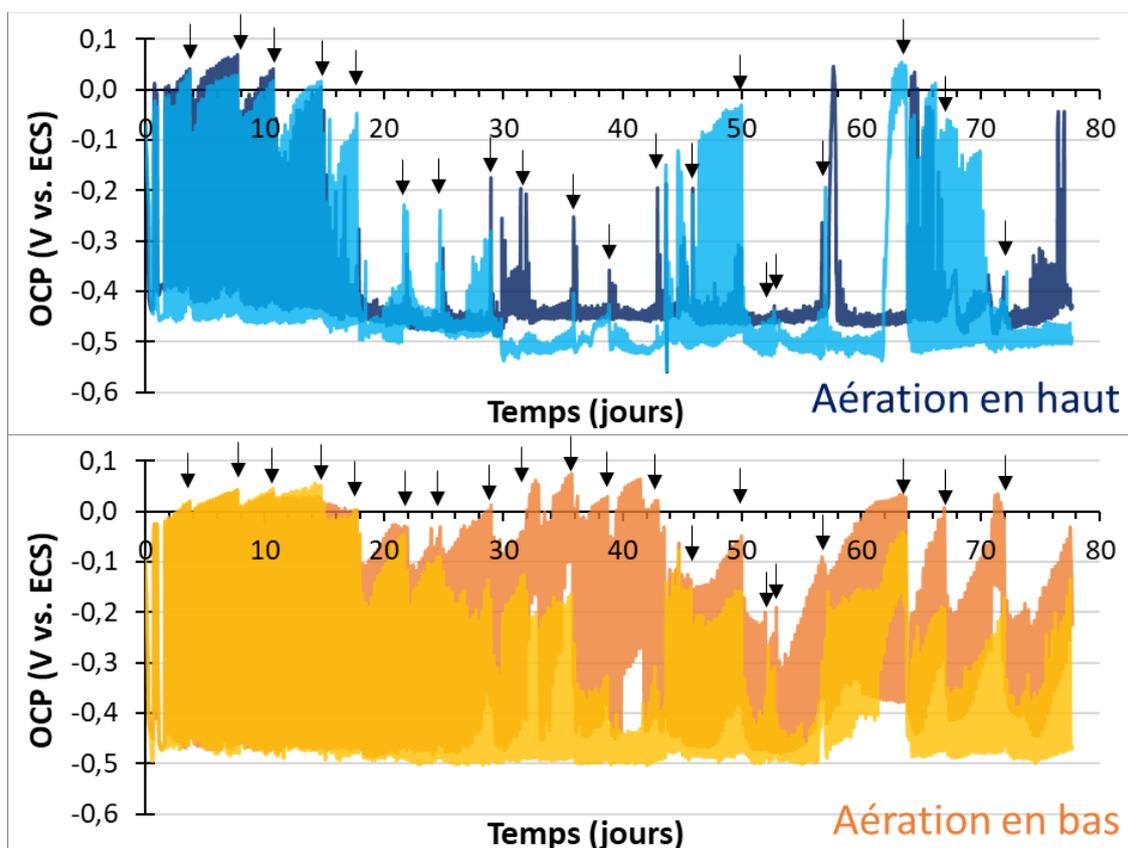


Figure 4.9 : Biotuba\_26.3 avec aération séquentielle. Suivi de l'OCP du biotuba sur toute la durée de l'expérience dans les réacteurs (haut) avec aération en haut ou (bas) en bas ; chaque diagramme présente des duplicats.

Au cours de l'expérience Biotuba\_26.3, deux réacteurs ne sont pas des biotubas puisqu'ils sont polarisés à  $-0,1$  V vs ECS grâce à un montage à trois électrodes. Il est difficile de tirer des conclusions sur ces réacteurs. La configuration est loin d'être optimale : l'électrode de travail qui occupe toute la hauteur du réacteur est beaucoup plus grande que la contre-électrode constituée d'une grille en platine placée à l'extrémité haute du réacteur. Le potentiel de l'électrode de travail n'est probablement fixé à  $-0,1$  V vs ECS qu'à proximité de la référence et de la contre-électrode.

Les courbes de polarisation montrent des courants très faibles entre  $0$  et  $0,5$  A/m<sup>2</sup> mais stables pour l'un des réacteurs, et plus élevés, jusqu'à  $3$  A/m<sup>2</sup>, pour le second mais pas stables (Figure 4.10). De plus, un développement d'algues est observé dans ces réacteurs, de même qu'une dégradation du feutre dans l'un des deux. De petites fibres solides du feutre sont retrouvées en grande quantité en suspension dans le réacteur puis dans tout le circuit de recirculation. Une telle désagrégation du feutre de carbone n'est pas usuelle et n'avait encore jamais été observée dans notre équipe, mêmes lors de travaux sur de longues périodes. Pourrait-elle être due au gradient de potentiel établi dans cette configuration atypique ? Difficile finalement de le savoir. Ces réacteurs ont tout simplement été arrêtés avant les autres, au jour 64, car jugés inexploitable.

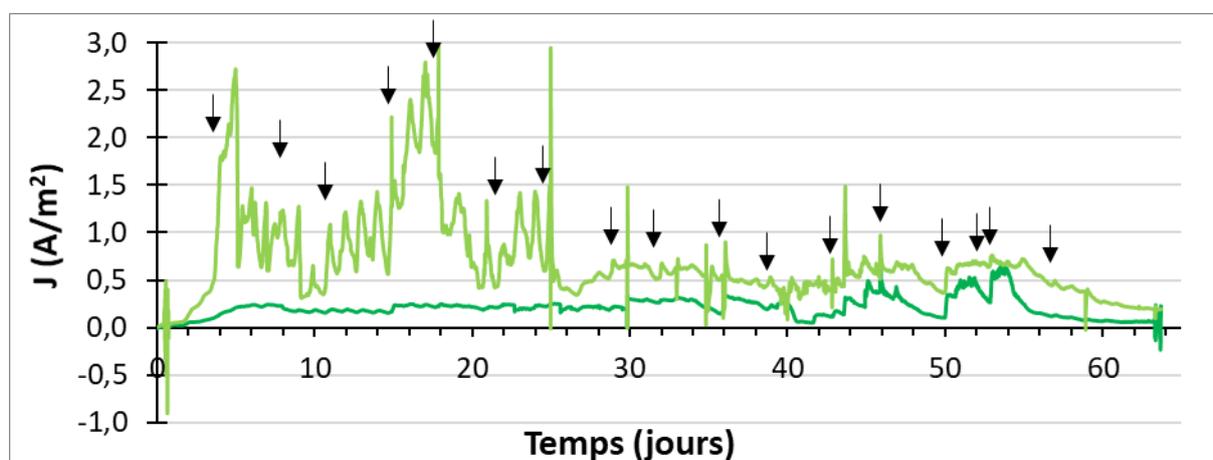


Figure 4.10 : Formation d'une anode microbienne lors de l'expérience Biotuba\_26.3. CA avec polarisation à  $-0,1$  V vs ECS sans aération.

Les mesures de DCO soluble (Figure 4.11) et totale (Figure 4.12) sont réalisées à chaque changement de réservoir, tous les 3 à 4 jours. Deux mesures sont effectuées systématiquement : en sortie du réacteur avant le changement de réservoir (valeur la plus faible) et dans le nouveau réservoir. La DCO avant changement de réservoir est plus en plus

faible dans les réacteurs polarisés (de 300 à 100 mg d'O<sub>2</sub>/L pour la DCO<sub>S</sub>). Ceci traduit une augmentation de l'efficacité de l'électrode polarisée au cours du temps.

Au contraire, il n'y a pas d'évolution de la DCO au cours du temps pour les autres configurations. Cette stabilité s'explique probablement par le temps laissé entre deux prélèvements qui est trop long pour suivre la cinétique d'abattement. En 3 à 4 jours, ce sont 12 à 16 périodes d'aération qui ont eu lieu et ont permis l'abattement de la quasi-totalité de la matière biodégradable. Seule la DCO réfractaire non dégradabile par le biofilm est mesurée. Il est donc impossible de distinguer l'effet de l'aération et l'apport éventuel de l'électrode ou d'évaluer une cinétique d'abattement de la DCO.

Il faut tout de même noter que les réacteurs avec aération en bas atteignent des valeurs minimales de 41 mg d'O<sub>2</sub>/L de DCO<sub>S</sub> et 77 mg d'O<sub>2</sub>/L de DCO<sub>T</sub>, qui sont deux à trois fois plus faibles que celles obtenues pour les autres réacteurs.

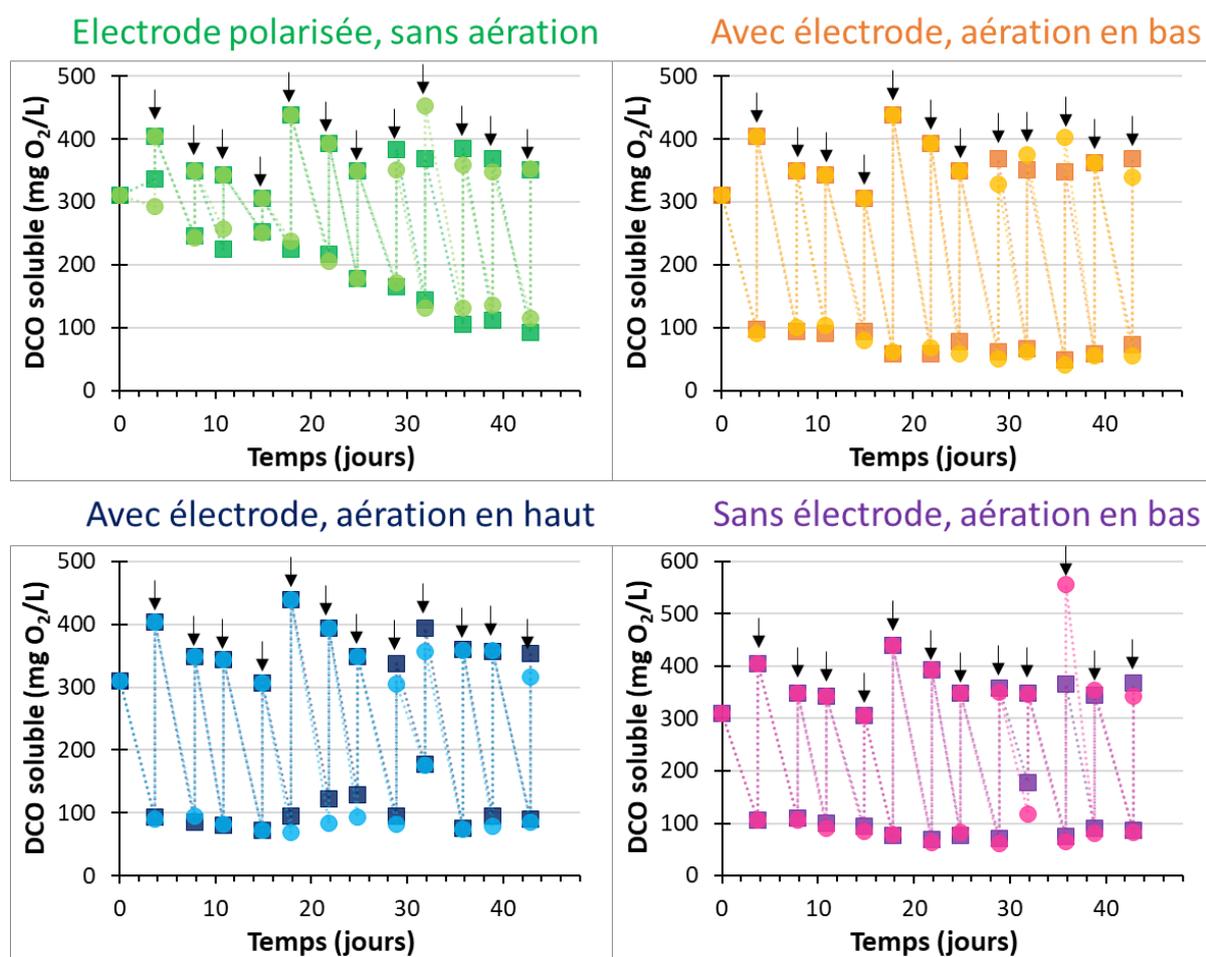


Figure 4.11 : Biotuba\_26.3 avec aération séquentielle. DCO soluble en fonction du temps en sortie du réacteur avant le changement de réservoir (valeurs basses) et dans le nouveau réservoir mis en place (valeurs hautes + flèches), en duplicats.

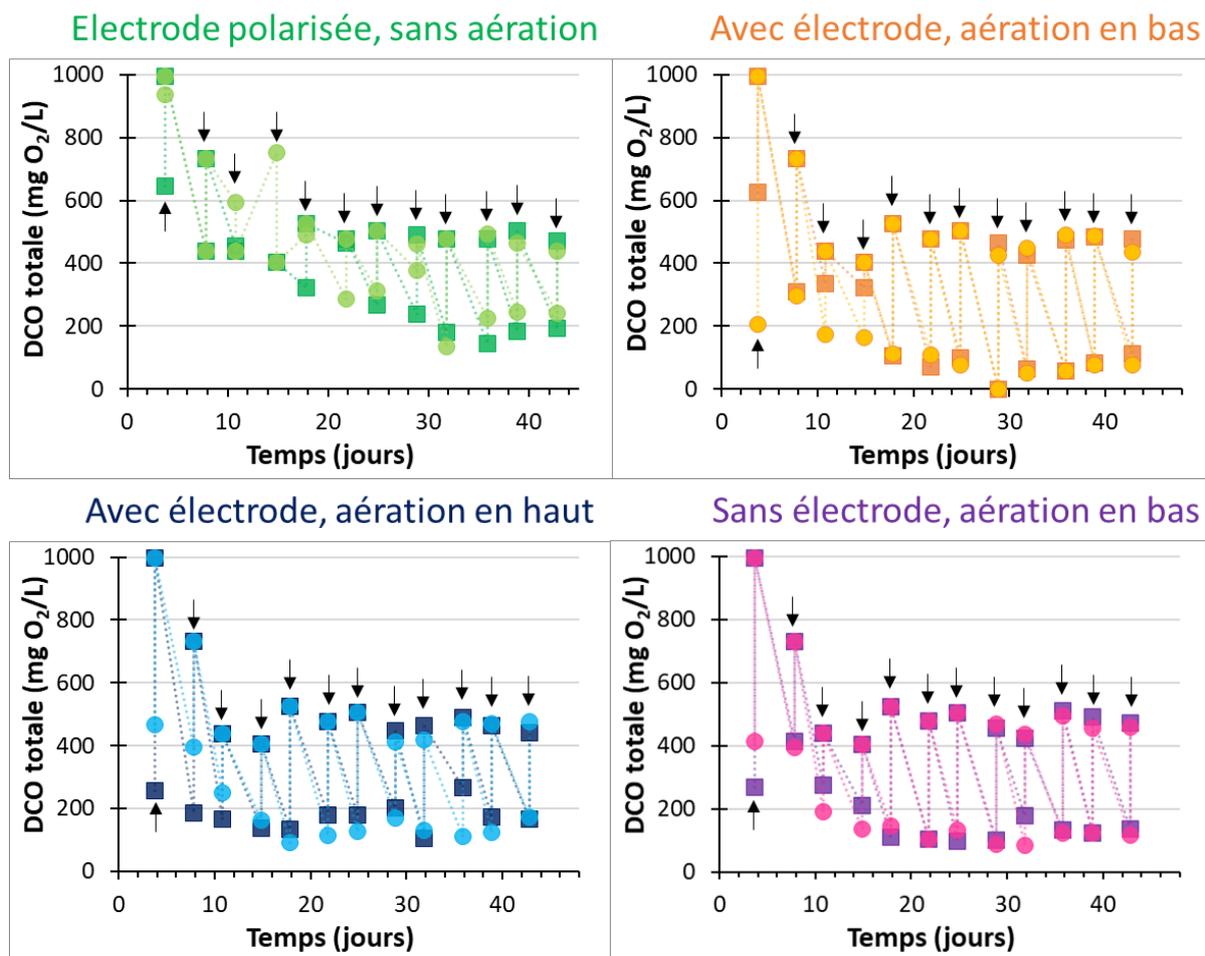


Figure 4.12 : Biotuba\_26.3 avec aération séquentielle. DCO totale en fonction du temps en sortie du réacteur avant le changement de réservoir (valeurs basses) et dans le nouveau réservoir mis en place (valeurs hautes + flèches), en duplicats.

Au jour 45, un nouveau type de suivi de DCO est réalisé. Au lieu de mesurer l'abattement entre deux changements de réservoir, l'abattement est mesuré entre l'entrée et la sortie du réacteur. La mesure est réalisée soit à la fin d'une période d'aération lorsque la concentration en oxygène est maximale, soit à la fin d'une période sans aération, lorsque la concentration en oxygène est nulle. Les mesures effectuées au même moment dans les réacteurs polarisés permettent d'avoir une comparaison sans aération. En outre la  $DCO_T$  est maintenant mesurée après une étape de sédimentation du prélèvement décrite à la fin de la partie 2.2.2.

Logiquement, l'abattement est plus important à la fin de la phase d'aération (Figure 4.13). Les réacteurs avec électrode et bullage en bas fonctionnent le mieux. Ils assurent jusqu'à  $84 \pm 3\%$  d'abattement à la fin des phases d'aération. Au cours de la phase sans

aération, l'abattement pour les réacteurs avec électrode et bullage en bas est de  $45 \pm 7\%$ , ce qui reste significativement supérieur à celui obtenu avec les contrôles sans électrode qui ne donnent que  $16 \pm 2\%$ .

Curieusement, les réacteurs polarisés sans aération présentent un abattement négatif pour la première mesure, puis des valeurs de  $24 \pm 1$  et  $22 \pm 1\%$  pour les mesures suivantes, identiques ou inférieures aux contrôles sans électrode. Les réacteurs avec aération en haut ne donnent pas de résultats significativement meilleurs que les contrôles sans électrode, ils sont même moins bons à la fin des deux périodes d'aération avec des valeurs de  $44 \pm 2$  et  $43 \pm 10\%$  contre  $66 \pm 1$  et  $57 \pm 1\%$  pour les contrôles.

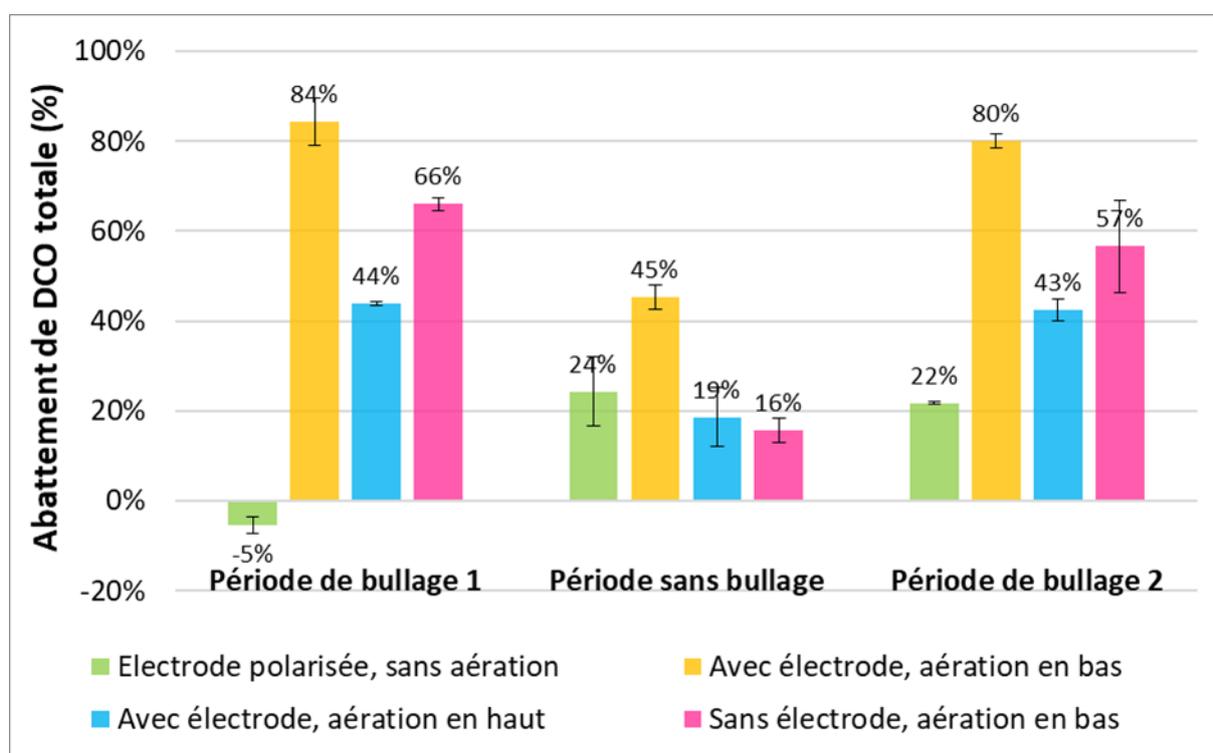


Figure 4.13 : Biotuba\_26.3 avec aération séquentielle. Abattement en DCO totale entre l'entrée et la sortie des réacteurs après 30 minutes d'aération (dans les réacteurs aérés) et après 5h30 sans aération, en duplicats.

Un suivi identique de  $DCO_T$  est réalisé au jour 65 (Figure 4.14). Les réacteurs polarisés ont été arrêtés avant ces mesures car, comme précisé précédemment, l'électrode d'un des réacteurs se désagrègeait. Les résultats confirment un effet du biotuba, notamment celui avec l'aération en bas avec un abattement de  $66 \pm 1\%$  contre  $54 \pm 1\%$  dans les réacteurs aérés en haut et  $48 \pm 16\%$  dans les contrôles sans électrode aérés en bas.

A cause de la grande incertitude sur les contrôles, due à la différence entre les duplicats, le gain d'abattement de DCO est tout juste significatif pour les biotubas avec aération en bas. Ces résultats confirment la nécessité de travailler plutôt avec la DCO soluble qui présente des incertitudes moins importantes et est moins susceptible de varier d'un prélèvement à l'autre. Il faut cependant noter que ces résultats confirment bien un effet du biotuba par rapport au contrôle sans électrode. Un autre point qui peut être soulevé ici concerne le transfert de l'oxygène qui est probablement meilleur dans les réacteurs de contrôle puisque ceux-ci ne sont pas encombrés par l'électrode. Dans ces conditions il est difficile d'évaluer l'apport intrinsèque du biotuba qui doit être sous-évalué dans les conditions de l'étude.

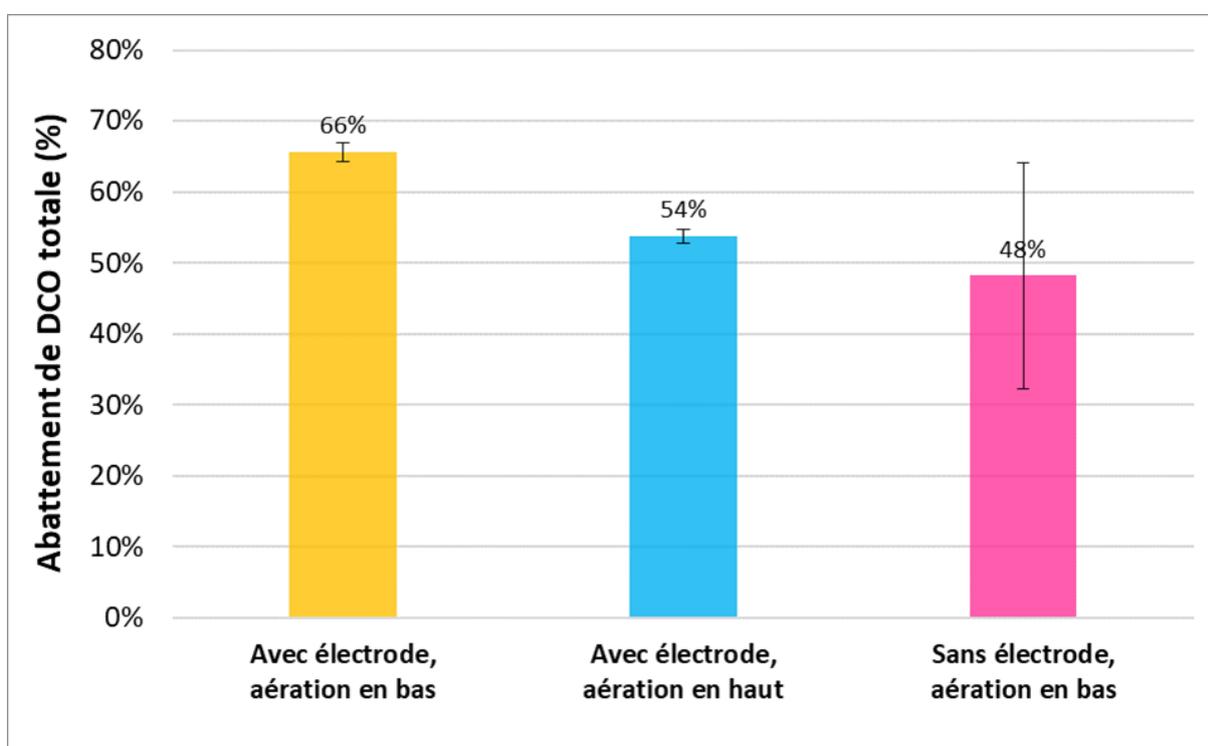


Figure 4.14 : Biotuba\_26.3 avec aération séquentielle. Abattement en DCO totale entre l'entrée et la sortie des réacteurs, après une période de 24 heures (30 minutes avec aération, 5h30 sans), en duplicats.

### 3.2 Conclusion sur le Biotuba\_26

La première information apportée par les expériences Biotuba\_26.1 et 26.2 en aération continue est la difficulté à stabiliser sur le long terme des zones aérobies et anaérobies bien définies dans les réacteurs. Nous avons donc abandonné pour un temps l'aération continue au profit de l'aération séquentielle (Biotuba\_26.3).

L'aération séquentielle a démontré l'intérêt du biotuba pour accélérer l'abattement, lorsque l'aération est réalisée en bas du réacteur. Une aération haute ne permet pas d'avoir une surface cathodique suffisante pour maintenir le potentiel du biotuba à des valeurs élevées. Il faut en outre noter la difficulté de maintenir les performances sur le long terme à cause de la formation de floccs microbiens dans les réacteurs.

Ces constatations nous ont amené à concevoir le Biotuba\_48. L'électrode est presque deux fois plus haute (48 cm) que celle du Biotuba\_26 afin de pouvoir intensifier l'aération dans la partie haute sans rompre l'anoxie dans la partie basse. On espère ainsi combiner l'effet d'une partie basse qui reste anoxique, avec une aération séquentielle intense en partie haute, tout en ayant une partie haute suffisante pour tirer les potentiels vers les valeurs élevées. Dans ces réacteurs, l'aération séquentielle est réalisée directement avec un tuyau de 4,8 mm de diamètre interne, sans aiguille, afin d'éviter la formation de floccs bloquant. L'aération est réalisée au niveau du quart haut du réacteur (12,5 cm de hauteur) pour préserver la zone anaérobie.

La deuxième information est la performance des contrôles sans doute favorisée par un meilleur transfert de l'oxygène dans les réacteurs qui ne sont pas équipés avec une électrode. L'effet positif du Biotuba\_26 a bien été observé mais sans doute sous-évalué du fait des différences d'encombrement stérique entre biotubas et contrôles. Pour pallier ce problème, une grille de plastique de même taille et de même forme que l'électrode sera placée dans les prochains contrôles, afin de reproduire l'encombrement de l'électrode. On peut noter qu'une approche pragmatique justifierait la comparaison entre les biotubas « encombrés » de leur électrode et les contrôles libres de tout encombrement, puisque cela correspond à la comparaison de deux types de procédés : les biotubas d'une part et les bioréacteurs aérées d'autre part. Toutefois, dans un objectif plus tourné vers la compréhension des phénomènes que la comparaison brute de deux procédés, nous avons préféré reproduire l'effet stérique du biotuba dans les contrôles. Les différences qui seront observées par la suite seront ainsi uniquement imputables à l'apport du processus bioélectrochimique dans des conditions de transfert d'oxygène similaires. En outre, on peut espérer qu'il se forme un biofilm sur la structure de plastique dont seront équipés les contrôles pour focaliser encore plus précisément la comparaison sur l'effet bioélectrochimique.

La troisième information apportée par ces essais est la difficulté d'obtenir des mesures de DCO reproductibles. Pour la suite des travaux, les mesures de DCO totale seront abandonnées au profit de la mesure uniquement de la DCO soluble. Cette dernière donne des résultats plus fiables, non liés au prélèvement. De plus, la DCO soluble est celle qui peut être

assimilée par le biofilm, et est donc couramment utilisée dans les travaux sur les systèmes électro-microbiens.

Enfin, les essais précédents nous ont fait mesurer la difficulté de distinguer l'abattement dû au biotuba de celui dû à l'aération ou même dû à la diffusion de l'oxygène dans le milieu au niveau de la boucle de recirculation. Un nouveau protocole de mesure est donc mis en place. Les phases de suivi de la DCO seront effectuées en batch, c'est-à-dire après avoir arrêté la pompe de recirculation, et sans aération. Pendant les mesures de DCO seul l'effet du Biotuba\_26 affectera l'abattement de la DCO et non l'aération ou la recirculation.

### 3.3 Transition du Biotuba\_26 au Biotuba\_48 (Article 4)

Les résultats des expériences Biotuba\_26.3 et Biotuba\_48.1 ont mis en évidence les liens entre le potentiel mixte du biotuba, la concentration en oxygène dissout et l'abattement en matière organique. Les résultats de cette étude ont donné lieu à un article soumis au journal *Electrochimica Acta* et intitulé « *Oxygen Supply Management to Intensify Domestic Wastewater Treatment by a Microbial Electrochemical Snorkel (MES)* »

Les conditions opératoires de la première partie de l'étude, portant sur le lien entre le potentiel et la concentration en oxygène dissout, sont déjà décrites dans la partie 3.1 de ce chapitre. Pour la seconde partie, quatre réacteurs Biotuba\_48 sont mis en œuvre, deux avec une électrode et deux contrôles avec une grille de plastique. Chacun des réacteurs est disposé dans une boucle de recirculation. L'aération séquentielle est basée sur une période de 2 heures d'aération pour 4 heures sans aération. Au bout de 6 jours, les périodes passent à 30 minutes avec aération pour 5h30 sans. L'aération séquentielle et la recirculation sont arrêtées avant les phases de suivi de la DCO en batch, selon les étapes suivantes :

1. Fin de la période d'aération, arrêt des pompes d'aération et de recirculation,
2. Vidange et remplissage du réacteur sous azote avec des eaux usées hydrolysées,
3. Arrêt de l'azote et démarrage de la phase de suivi de l'abattement en DCO, avec le prélèvement à  $t_0$  dans le réacteur,
4. Relance des pompes d'aération et de recirculation avec un nouveau réservoir à la fin de la phase batch.

Les principales conclusions de cette étude sont :

- Sans aération, la concentration en oxygène dissout est nulle et le potentiel du Biotuba\_26 se stabilise à un potentiel compris entre -0,4 et -0,5 V vs ECS. Lorsque l'aération commence, le potentiel augmente rapidement jusqu'à se stabiliser à un potentiel élevé, entre 0 et +0,1 V vs ECS, lorsque la concentration d'oxygène est à sa valeur maximale, soit 7 mg/L dans la partie haute du réacteur.
- Les valeurs haute et basse de la concentration en oxygène dissout et du potentiel sont restés identiques pendant les 4 jours de mesure, cycle après cycle pour le Biotuba\_26. De la même façon, le potentiel reste stable pour le Biotuba\_48 pendant 27 jours. Ces valeurs hautes et basses de potentiel et d'oxygène dissout sont stables dans le temps.
- Jusqu'au 6<sup>ème</sup> jour, les cycles comprennent 2 heures avec aération et 4 heures sans aération. Après le jour 6, la période d'aération du Biotuba\_48 réduite à 30 minutes suffit pour atteindre la valeur élevée du potentiel. Les cycles comprennent alors une période de 30 minutes avec aération et 5h30 sans.
- Le premier suivi de la DCO, en batch, montre un effet du Biotuba\_48 puisque l'abattement est de  $25 \pm 0,3\%$  pour les biotubas après 24 heures contre  $4 \pm 6\%$  pour les contrôles. La superposition des enregistrements de l'abattement de la DCO et du potentiel montre qu'il n'y a plus d'abattement à partir du moment où la valeur basse du potentiel est atteinte.
- Les deuxième et troisième batchs ont permis de déterminer la période d'activité du Biotuba\_48, qui ne dure que 30 minutes environ après le début de la phase batch. Cela correspond au temps nécessaire pour que l'électrode, qui a libéré ses électrons pendant la phase d'aération (potentiel haut), se recharge en électrons. Une fois que l'électrode a retrouvé sa charge d'électrons (potentiel bas atteint), l'oxydation s'arrête car l'électrode ne peut plus collecter d'électrons provenant de la matière organique.
- Pour les trois batchs, le Biotuba\_48 a accéléré l'abattement de la matière organique par rapport aux réacteurs sans biotuba. Pour le premier batch, les biotubas ont éliminé 6,3 fois plus de DCO que les contrôles, 5,7 fois plus pour le deuxième batch et 3 fois plus pour le troisième. Ces résultats sont encourageants compte tenu du fait que le Biotuba\_48 ne fonctionne que sur une période d'environ 30 minutes après la fin de l'aération.

## Oxygen supply management to intensify wastewater treatment by a microbial electrochemical snorkel

Morgane Hoareau, Luc Etcheverry, Benjamin Erable, Alain Bergel

Laboratoire de Génie Chimique, Université de Toulouse, CNRS, INP, UPS, Toulouse, France

Corresponding author: [alain.bergel@toulouse-inp.fr](mailto:alain.bergel@toulouse-inp.fr) (A. Bergel)

### Abstract

The microbial electrochemical snorkel (MES) is a low-cost, low-maintenance technology that could considerably reduce wastewater treatment costs by reducing the need for aeration. An MES is a single electrode. The lower part, in the anoxic zone of the bioreactor, oxidizes organic matter by transferring electrons to the electrode. The upper part, in the oxic zone, releases the electrons by reducing dissolved oxygen. This study gives new insights into the correlation between the MES potential, the concentration of dissolved oxygen, and COD abatement, so that the aeration zone and the aeration frequency can be adjusted for optimal operation.

Aeration promoted the cathodic reaction and increased the MES potential to a maximum, in the range of 0.0 to 0.1 V/SCE. After aeration stopped, the potential dropped to a minimum lower than -0.4 V/SCE. With 26 cm high MESs, sequential aeration at the top was not sufficient to support an effective cathodic zone, while aeration at the bottom was detrimental to the formation of the microbial anode. With MESs 48 cm high and aeration set up at the highest quarter, 30 minutes of aeration every 4.5 hours gave potential variations that were stable for weeks. The MESs continued to oxidize organic matter 30 minutes after the aeration had stopped. In this period, the MESs removed 3 to 6.3 times more COD than the control reactors. Increasing the electrode capacitance is consequently suggested as an effective way to further decrease the aeration cost by decreasing the aeration frequency.

### Keywords

Bioremediation; electroactive biofilm; microbial electrochemical system; microbial fuel cell; bioelectrochemical system.

## 1. Introduction

Wastewater treatment plants consume large amounts of energy, which represent a significant portion of municipalities', and thus countries', electricity consumption [1], reaching, for example, 1% of the total energy consumed by Germany or Italy [2]. In this framework, supplying oxygen is the most cost-intensive operation of the aerobic biological treatment plants. The microbial electrochemical snorkel (MES) is a lowcost, low-maintenance technology that could considerably reduce the cost of the oxygen supply.

An MES can be defined simply as a single electrode in an environment where the composition of oxidizing and reducing species is spatially heterogeneous. In the context of wastewater treatment, the lower part of the MES is positioned in the lower, anoxic part of the bioreactor and ensures the oxidation of the organic matter it contains [3,4]. Anaerobic bacteria spontaneously form an electroactive biofilm on the surface of that part of the MES and oxidize organic matter by transferring electrons to the electrode. This part of the MES forms the anode, which acts as the electron acceptor for the exoelectrogenic bacteria. The upper part of the MES, located in the aerobic upper zone of the bioreactor, releases the electrons from the electrode by reducing oxygen. It constitutes the cathode. Different types of organic matter can be oxidized at the anode part, such as volatile fatty acids and hydrocarbons [5,6], and other electron acceptors than oxygen, e.g. nitrates [7], can be used at the cathode part. An MES can be considered as the simplest possible microbial fuel cell with short-circuited anode and cathode. As the anode and cathode are short-circuited, an MES does not produce any power but it supports the highest possible electrochemical reaction rates that an MFC could reach.

The purpose of the present work was to optimize the oxygen supply in an MES. The challenge was to provide the MES with the amount of oxygen required for the extraction of electrons without hindering the oxidation reaction, which requires anoxic conditions. Two strategies for doing this were investigated.

In strategy 1, the objective is to establish a stable profile of dissolved oxygen inside a bioreactor with a lower anoxic zone and an upper oxic one. The cathode develops in the upper zone, which is sequentially aerated while, hopefully, the anoxic bottom is not reached by oxygen. In this way, it should be possible to achieve significant cost savings in wastewater treatment plants by aerating only the upper part of a bioreactor equipped with an MES.

In strategy 2, the whole bioreactor is aerated sequentially, as is currently done in usual aerobic WW bioreactors. In this case, the whole electrode sequentially behaves as an anode, when it is not aerated, and as a cathode, when it is aerated. When placed in anoxic conditions,

the electrode oxidizes organic matter by accepting electrons (anode). Conversely, when placed in oxic conditions, the electrode releases the electrons by reducing oxygen (cathode). So-called bidirectional microbial electrodes have been shown to be efficient for both oxygen reduction and organic matter oxidation [15,16]. In the strategy 2, the hope is that the presence of the MES, acting as a bidirectional electrode, will reduce the frequency of aeration compared to current WW treatment bioreactors with no MES.

Besides checking these two strategies, this work demonstrated that the potential of the MES and the soluble oxygen concentration are closely related. Furthermore, the efficiency of the COD abatement by MES also depended on the potential. The MES potential is thus shown to be the key parameter that should be monitored in order to optimize the MES operating protocol.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Media and electrochemical set-up

Domestic wastewater (WW) was collected from the aerobic tank of a WW treatment plant (Castanet-Tolosan, near Toulouse, France) and used without any addition. When indicated, it was inoculated with 5% (v/v) of activated sludge (AS) collected from the same aerobic tank. In some cases, when indicated, hydrolysed WW was used to stabilize the soluble COD (Chemical Oxygen Demand) content. Hydrolysis consisted of maintaining fresh WW under anaerobic conditions during one week at room temperature. This process increased the soluble COD from 150-250 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup> in fresh WW to 250-350 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup> in hydrolysed WW.

Two different MES configurations were used, called MES\_26 and MES\_48. They were equipped with electrodes 26 cm and 48 cm high, respectively. MES\_26 electrodes were made of two strips of carbon felt sheet (RVG 4000, Mersen, France) 4 cm wide, 0.5 cm thick and 26 cm high, assembled in a cross shape with a titanium rod (1 mm in diameter) in their centre over their whole height. The MES\_26 reactors were glass cylinders 4.2 cm in diameter, which contained WW to a height of 27 cm, i.e. the solution surface was 1 cm above the electrode.

The MES\_48 electrodes were similar to the MES\_26 ones but with a height of 48 cm and a width of 3 cm. The MES\_48 reactors were glass cylinders 3 cm in diameter, which contained WW to a height of 50 cm, i.e. with 2 cm of solution above the electrode.

Each MES reactor was included in a closed hydraulic loop including a peristaltic pump (Masterflex®, Cole-Parmer, USA) and a 2 L storage tank. The recirculation was set up at 1.5 mL.min<sup>-1</sup>. Forced aeration was achieved with air pumps, which bubbled air vigorously into the solution.

The titanium rod in the centre of the electrode was used to connect the electrode to the electrical circuit. The potential of each MES was monitored vs. a saturated calomel reference electrode (SCE, Sentek, Australia, 0.24 V/SHE) using a multichannel potentiostat (MPG, EClab software, Bio-Logic SA). All potentials were expressed vs. SCE.

## **2.2. Biofilm formation and operation**

Preliminary oxygen concentration measurements were carried out in batch in an MES\_26 reactor filled with WW, without the MES electrode inside. Forced aeration was set up on the top of the reactor, 2 cm from the free surface, for 3 hours.

The first experimental run implemented four MES\_26 in parallel, with air bubbling set on the top in two of them (as in the preliminary experiment), and at the bottom in the others. After a stabilization period of 0.7 day without aeration, forced aeration sequencing was applied manually. After 1.6 day, automatic sequential aeration was set up: 2 hours with aeration and 4 hours without. The loop initially contained 2 L of WW inoculated with 5% (v/v) AS. The storage tanks were first changed after 4 days and then replaced every 3 to 4 days with tanks containing 2L of only WW without AS.

The second experimental run implemented four MES\_48 in parallel, two with an MES electrode and two controls with a plastic grid to replace the electrode (same size and shape). For all 4 reactors, the aeration was set up in the upper quarter of the reactor, 12.5 cm from the free surface. At the beginning of the experiment, the aeration sequence was 2 hours with aeration and 4 hours without. At day 6, it was changed to 30 minutes with aeration and 5.5 hours without. The loop initially contained 2 L of WW inoculated with 5% (v/v) AS. The storage tanks were changed on days 9 and 16 and replaced with tanks containing 2 L of WW only.

Three batch sessions were used to evaluate the removal of organic matter. For each batch, at the end of the 30 minute aeration period, the hydraulic recirculation pumps were stopped, the reactors were emptied and then refilled with around 300 mL of hydrolysed WW. The emptying and refilling operations were performed under a constant flux of nitrogen in order to avoid parasitic aerobic consumption of the COD. The organic matter removal was then

monitored by taking successive samples from the middle of the MES reactor. COD removal rates ( $\Delta\text{COD}$ ) were calculated as:

$$\Delta\text{COD (\%)} = \frac{\text{COD}_0 - \text{COD}_t}{\text{COD}_0} \times 100 \quad (1)$$

where  $\text{COD}_t$  is the COD value at time  $t$  and  $\text{COD}_0$  the initial value of the first sampling just after medium change.

### 2.3. Analytical procedures

The concentration of dissolved oxygen was measured using self-adhesive oxygensensitive spots (SP-PSt3-SA23-D5-YOP-US, PreSens, Germany), which were glued on the glass reactor wall at heights of 5, 10, 15, 20 and 25 cm. The reading was taken through a polymer optical fibre (POF-L2.5-2SMA, PreSens, Germany).

The soluble COD was measured after filtering the samples with a syringe filter (0.22  $\mu\text{m}$ ) using the Hach Lange LCK 314 system for concentrations ranging from 15 to 150  $\text{mg O}_2\cdot\text{L}^{-1}$  and LCK 514 microkits for concentrations ranging from 100 to 2,000  $\text{mg O}_2\cdot\text{L}^{-1}$ .

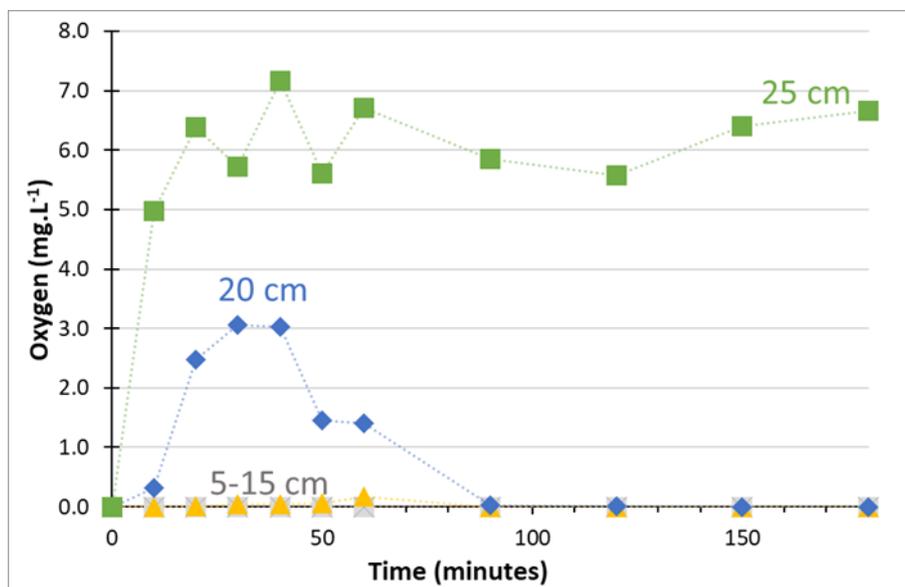
## 3. Results and discussion

### 3.1. Oxidic/anoxic profile (strategy 1) vs. bidirectional electrode (strategy 2)

Preliminary measurements of the dissolved oxygen concentration profile were carried out in an MES<sub>26</sub> reactor, filled with 27 cm WW without the electrode inside. Measurements were performed in batch with continuous aeration on the top of the reactor, 2 cm from the free surface. Oxygen concentration reached 6.4  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  in 20 minutes at the top of the reactor (height 25 cm). Then the value remained fairly stable at the top with 6.2  $\pm 0.6$   $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  for more than 2 hours (Figure 1). At 20 cm height, the oxygen concentration rose to a maximum of 3.1  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  at 30 minutes but then dropped again to 0 until the end. All the other measurements at 15, 10 and 5 cm height showed a nil concentration during the 3 hours.

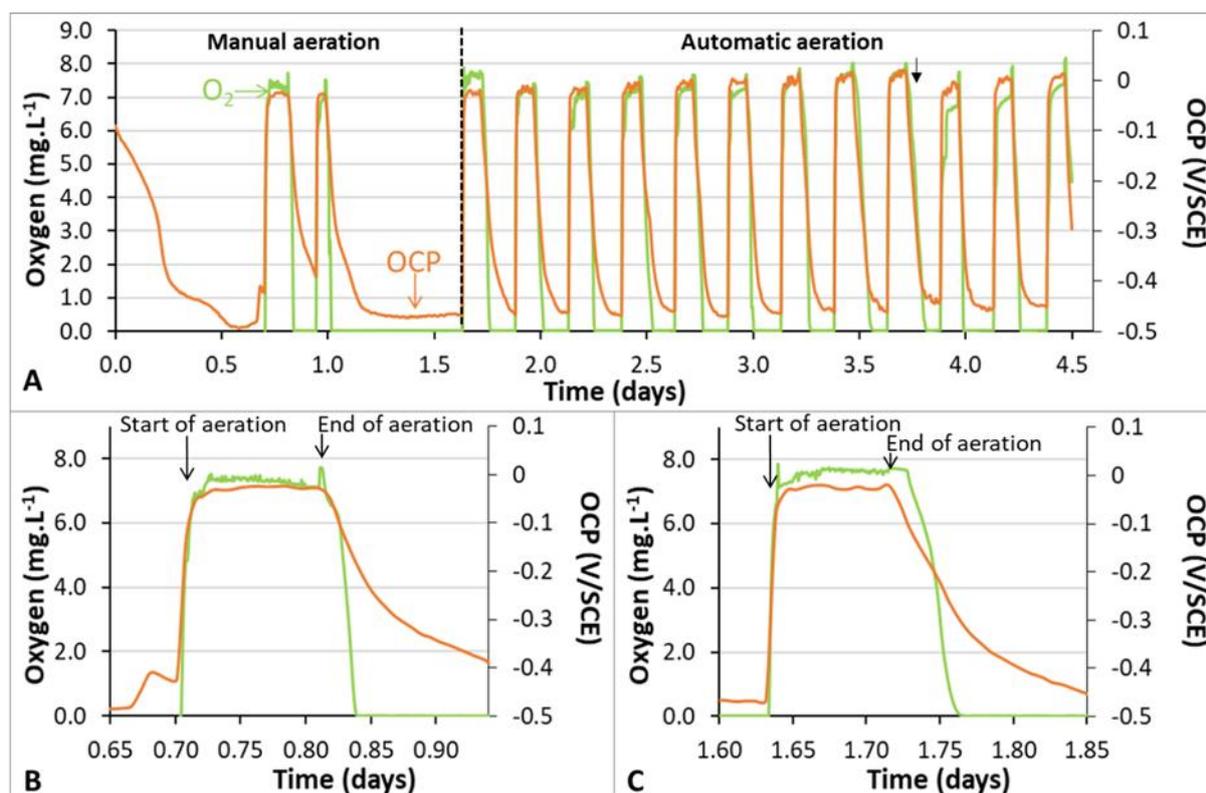
The aeration system used here made it possible to create a stable profile of dissolved oxygen with an upper oxidic zone and a lower anoxic part in the MES<sub>26</sub> reactor. It was

consequently decided to run two MES\_26 with this aeration system, in order to assess strategy 1 (see Introduction) and two other MES\_26 with aeration at the bottom of the reactor to compare with Strategy 2. In both cases, the objective was to optimize the sequence of aeration.



**Figure 1: Concentration of dissolved oxygen as a function of time at different heights (from the bottom) of an MES\_26. Batch mode, aeration 2 cm below the free surface.**

After 0.7 day under constant hydraulic recirculation and without any aeration, the potentials of the four MES\_26, which were run in parallel, were stable at  $-0.42 \pm 0.01$  V/SCE (Figure 1A). The oxygen concentration was monitored in one reactor that was aerated at the bottom. After 0.7 day, the concentration of dissolved oxygen was nil. As the measurement was made at the top of the reactor (25 cm high), 2 cm under the free surface of the solution, this implies that the oxygen concentration was nil in the whole reactor. When the aeration was started at 0.7 day, the potential increased rapidly, reaching  $-0.13 \pm 0.01$  V/SCE within 10 minutes, and then stayed stable at  $-0.05 \pm 0.07$  V/SCE during the aeration period (Figure 2B). The oxygen concentration rose from 0 to  $5.8 \text{ mg.L}^{-1}$  within 10 minutes and then stabilized at  $7.31 \pm 0.1 \text{ mg.L}^{-1}$  during the aeration period. Aeration was then stopped and the oxygen concentration dropped to 0 within 20 minutes. It took more time, around 2.5 hours, for the potential to drop to  $-0.41 \pm 0.01$  V/SCE.



**Figure 2: Potential and oxygen concentration as a function of time in an MES\_26 with aeration at the bottom. (A) first four days with switch to automatic aeration at day 1.8, (B) focus on the first aeration period with manual control, and (C) focus on the first aeration period with automatic control; the black arrow indicates replacement of the storage tanks.**

As explained elsewhere [4], the potential of an MES is a mixed potential, which results from the large potential gradient along the electrode, from the anode part at the bottom to the cathode part at the top. Here, the variation from the minimal value below -0.4 V/SCE in anoxic conditions, to the maximal value close to 0.0 V/SCE during the forced aeration period, means that the MES was driven by its anode or cathode function, respectively.

Studies on bidirectional microbial electrodes have observed similar potential variations according to aeration conditions with a high potential in the aerated cathodic phase and a low potential in the anoxic anodic phase. A similar amplitude, with a potential ranging from -405 mV/SCE during the anodic phase to 195 mV/SCE during the cathodic phase, has been observed in a solar energy powered MFC [17]. Greater amplitude, ranging from -450 to 300 mV/SCE, has been reported for dye treatment with an MFC [18]. Larger amplitudes of potential can be measured in MFCs because the anode and the cathode are separated, so the potential

is measured on an electrode that functions strictly as an anode or strictly as a cathode. In contrast, the potential of an MES is most often a mixed potential.

The objective for WW treatment is that the MES should operate at high potential in order to promote the oxidation of organic matter. The aeration periods must drive the potential to high values. Then the non-aerated periods must not leave the potential at low values for too long because, at low potential values, the MES is no longer active for the oxidation of organic matter.

With this rule in mind, the first two aeration periods, which were managed manually, showed that an aeration period of 2 hours, coupled with a period of 4 hours without aeration seemed to be a suitable sequence. Accordingly, the automatic aeration was started after 39 hours (1.6 days) with this sequence and maintained until the end of the experiment. The maximal and minimal values of potential and dissolved oxygen concentration showed fair stability during the 14 cycles (Figure 2A). The MES worked in an appropriate way, reaching high values of potential during forced aeration and not staying at minimal potential values for too long.

As described for the first aeration period (Figure 2B), the potential response was always delayed with respect to oxygen concentration when the aeration stopped. For instance, during the third aeration period (Figure 2C) the oxygen concentration dropped to 0 within 1 hour, while the potential dropped from  $-0.01 \pm 0.01$  V/SCE to  $-0.43 \pm 0.03$  V/SCE within 2.5 hours. The potential of the MES continued to decrease, when there was no longer any oxygen in solution. This showed that the MES remained able to accept electrons from organic matter even when there was no longer oxygen in solution to release them. This capacity of the MES is important because it makes it possible to lengthen the period without aeration, and thus to minimize the aeration cost. Increasing the capacitance of the MES should be a key objective for future research in order to decrease the frequency of the forced aeration phases.

The potential of the MESs monitored for 15 days showed some changes of the value of the maximal potential just after the storage tank replacement (Figure 3). For the MESs with aeration at the top, after the tank change, the maximal potential dropped by  $0.10 \pm 0.03$  V/SCE compared to the values before the change. For the MESs with aeration at the bottom, it only dropped by  $0.04 \pm 0.02$  V/SCE (Table 1).

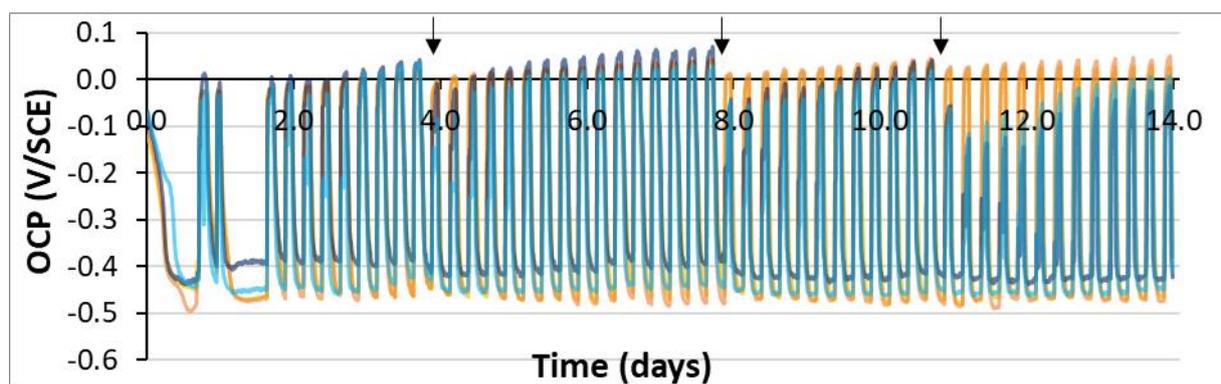


Figure 3: Potential of the four MES\_26 as a function of time. Two MES\_26 had aeration at the top (blue) and two at the bottom (orange); black arrows indicate the tank changes

Table 1: Maximal potential before and after tank changes

Moment	Measure	Tank change	Aeration on top	Aeration at the bottom
Max. Potential (V/SCE)	Before tank change	1	0.02 ±0.01	0.04 ±0.01
		2	0.04 ±0.03	0.04 ±0.01
		3	0.03 ±0.02	0.04 ±0.01
	After tank change	1	-0.12 ±0.04	-0.02 ±0.01
		2	-0.04 ±0.01	0.01 ±0.01
		3	-0.06 ±0.01	0.02 ±0.01

After each tank change, the MESs with aeration at the top had more and more difficulty in recovering high maximal values. For instance, after the second tank replacement, around 6 aeration cycles were necessary to recover a maximal potential around 0.0 V/SCE, whereas 9 were necessary after the third tank replacement (Figure 3). This means that the cathode had more and more difficulty in raising the potential to high values when the MES was supplied with organic matter. This was due to the progressive improvement of the anode part, which became increasingly efficient and pulled the potential down when the MES was provided with organic matter. This evolution was not observed with the MESs aerated at the bottom, probably because the oxic conditions throughout the reactor hindered the formation of an efficient microbial anode.

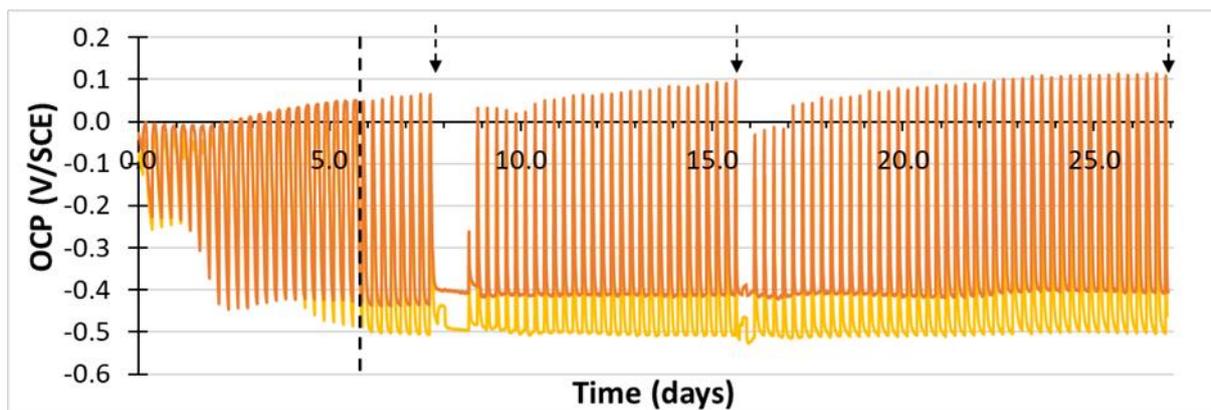
It should be noted that the literature reports several bidirectional microbial electrodes [15] that showed efficient anode properties and accepted full exposure to aerated conditions. However, all these bidirectional microbial electrodes were formed with an initial anode phase of several days, sometimes several weeks, performed under anaerobic conditions. Here, in the MESs aerated at the bottom, the phases of full aeration started from the beginning of the experiment. Such early aeration phases were certainly not appropriate to develop efficient microbial anodes.

Aeration from the bottom could remain a possible alternative after a first phase of microbial anode formation, which should be performed with aeration at the top. Nevertheless, this would make the set-up and protocol much more complex, particularly if the development of full sized MESs in WW treatment bioreactors is envisioned. This led us to abandon Strategy 2 based on full aeration of the MES.

### **3.2. Domestic wastewater treatment**

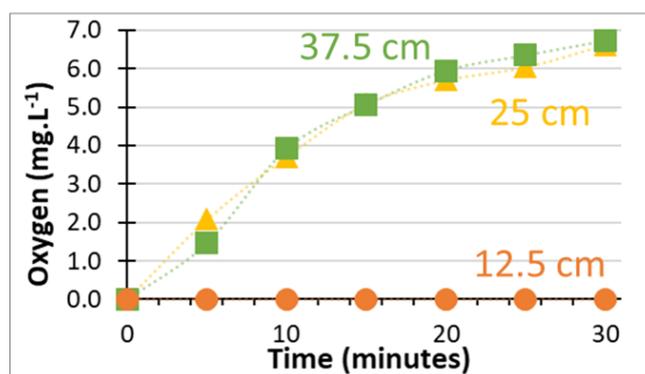
Strategy 1 was pursued with longer MESs (MES\_48). The aeration zone was enlarged in order to obtain stronger cathodes, able to balance even fully developed anode parts. Actually, the results obtained with the MES\_26 showed that the cathodes formed by aeration 2 cm below the free surface were no longer efficient enough to drive the potential to high values when the anode became more efficient. The MES\_48 were consequently aerated at the upper quarter of the reactor, 12.5 cm from the free surface.

Until day 6, the aeration sequence included 2 hours with aeration and 4 hours without, based on the results of MES\_26. After day 6, the aeration period was decreased to 30 minutes as this was sufficient to reach the high potential. The cycles then included a period of 30 minutes with aeration and 4.5 hours without. The potential showed the same general trend as with the MES\_26, with fair stability (Figure 4). A slight drop in potential after the storage tank changes showed that the anode parts were efficient. Nevertheless, the cathode parts managed to maintain the potential above 0.0 V/SCE almost all the time, which showed that enlarging the aeration zone had a positive effect.



**Figure 4: Potential of the two MES\_48 as a function of time. On day 6 (dashed line), the aeration sequence changed from 2 hours with air bubbling / 4 hours without to 30 minutes with / 5.5 hours without. COD monitoring in batch took place at days 7, 15 and 27 (dashed arrows).**

At the end of the experiment, oxygen concentration was measured as a function of time at different heights of the MES. At the end of the period without aeration, the oxygen concentration was zero in the whole reactor. After 30 minutes of aeration, the concentration remained zero at the bottom of the MES, but had increased in the middle and reached 6.7 mg.L<sup>-1</sup> from 25 cm high to the top (Figure 5). It can be concluded that the 30 minutes of aeration managed to establish the desired profile of dissolved oxygen concentration, with an upper fully oxic zone and a lower zone remaining anoxic.

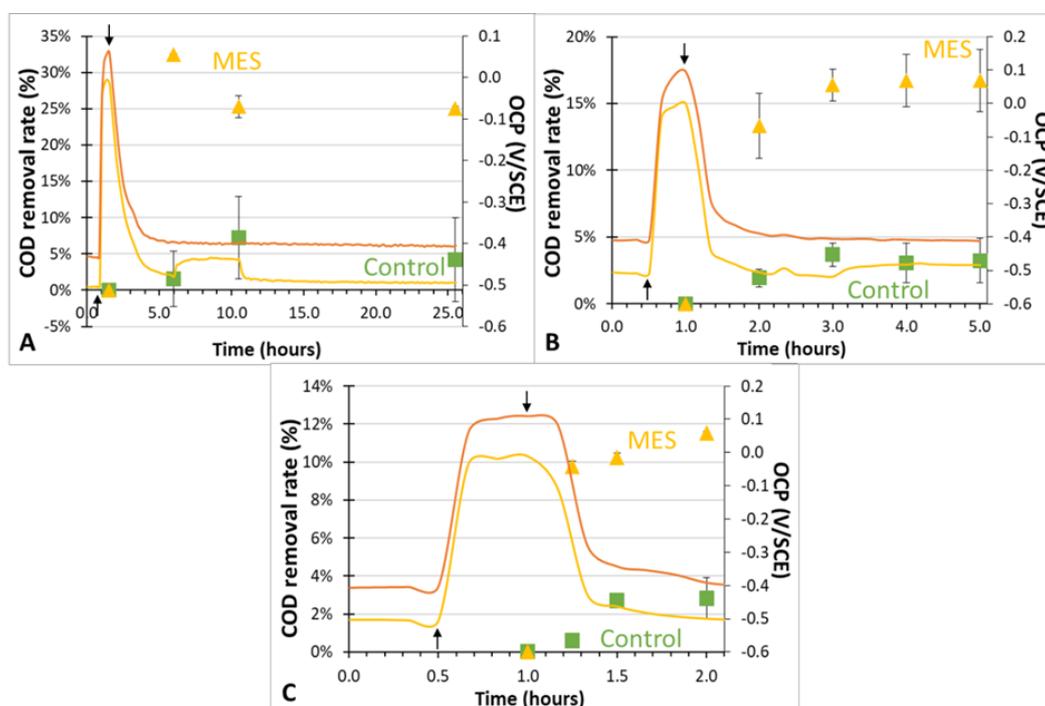


**Figure 5: Oxygen concentration versus time at different heights (from the bottom) of an MES\_48 during the aeration period**

MES\_48s showed high stability during the 27 days of operation (Figure 4). The aeration periods allowed the MESs to reach maximal potential between 0 V/SCE, immediately after the

tank changes, and +0.1 V/SCE when the substrate was low. The minimal potential of  $-0.45 \pm 0.07$  V/SCE was very stable during the anoxic phases. Even the pauses in aeration and recirculation, which were set to monitor the COD abatement in batch, did not cause any variation in the maximal and minimal potential values, which returned to the same values at the end of the batch phases.

Batch phases were set just after the changes of the storage tanks in order to monitor COD abatement in batch conditions. In the first batch phase, the initial COD measurement (DCO0 in equation 1) was made just after the tank change ( $t = 1$  hour in Figure 6A) and the second 5 hours later ( $t = 6$  hours in Figure 6A). COD removal was  $2 \pm 4\%$  in the controls equipped with plastic structures and  $32 \pm 0\%$  in the MES\_48. The snorkel effect was thus obvious. Nevertheless, COD abatement did not increase afterwards. On the contrary, it tended to decrease, with a value of  $25 \pm 0.3\%$  in the MES\_48 after 24 hours (less than  $4 \pm 6\%$  in the control reactors). This apparent decrease of COD removal may have been due to the solubilization of solid COD or release of organic matter from the biofilm. Looking at the COD abatement in parallel with the potential evolution (Figure 6A) reveals that there was no further abatement from the time the minimal potential was reached. The second batch therefore focused on this 4 hour period of time and the third batch focused on the first hour.



**Figure 6: Potential and average COD removal rate in the MES\_48 and controls as a function of time in batches 1, 2 and 3 (A, B, C respectively). Aeration started at 0.5 hours (arrow up) and stopped 30 minutes later (arrow down), the medium was then changed, recirculation was stopped and COD measurements began**

Batch 2 showed that there was no longer any COD abatement 2 hours after aeration was stopped. At this time the potential just recovered its minimal value (Figure 2B). Batches 2 and 3 gave similar COD removal rates 1 hour after the aeration was stopped ( $2 \pm 1\%$  and  $12 \pm 2\%$  in the MES\_48 and the controls, respectively). Batch 3 showed that the period of the main COD abatement was about 30 minutes after the aeration was stopped. During these 30 minutes, the potential had completed about 90% of its drop from its maximal to its minimal value (Figure 6C). The potential drop was directly correlated to the MES activity.

Physically, the electrode is emptied of electrons during the aeration phase and thus reaches its maximal potential value. When the aeration phase is stopped, the electrode collects electrons by oxidizing organic matter. The MES is thus active and abates the organic matter. Once the electrode recovers the highest amount of electrons it can contain, the minimal value of the potential is reached and the oxidation can no longer continue.

The three batches showed the efficiency of the MES\_48. COD removal rates were always significantly higher than in the control reactors equipped with a plastic structure. For Batch 1, the MESs removed 6.3 times more COD than the controls did ( $25 \pm 0.3\%$  vs  $4 \pm 6\%$ ). The result was slightly lower for Batch 2, with 5.7 times greater removal rates ( $17 \pm 2\%$  vs  $3 \pm 2\%$  4 hours after aeration was stopped). Batch 3 led to 3 times greater removal rates with the MES ( $12 \pm 1\%$  vs  $3 \pm 0.1\%$ ) 1 hour after aeration was stopped.

These COD abatement rates seem modest compared to some high values reported in the literature, for instance, the 60-75% obtained with an MES for wastewater treatment [3]. However, the data presented here are very encouraging considering that the MES\_48 worked for only around 2 hours after the cessation of aeration and achieved the majority of the COD abatement in only 30 minutes. Here, the objective was to advance in deciphering the MES behaviour. For this reason, the COD abatement was monitored in batch, during the period of non-aeration, in order to really identify the MES effect and to distinguish it from the aeration effect. To be fair, the comparison had to be made between the same reactors, operated in the same way and equipped or not with an MES. This comparison showed that the MES multiplied the removal rates by a factor of 3 to 6.3 depending on the batch and the time it lasted.

The approach taken here affords useful information for progress to be made in optimizing the operating conditions of MESs. It can be summed up as follows:

- A clear correlation is pointed out between MES potential, oxygen concentration and MES activity.

- Aeration must pull the MES potential to its maximal value of about 0.1 V/SCE and it can be stopped when this potential is reached.
- During the non-aeration periods, the MES is active for organic matter oxidation as long as the minimal value of the potential is not reached. When the minimal value is reached (-0.4 to -0.5 V/SCE), aeration must be restarted.
- Aeration must be performed in the upper zone of the MES and keep an anoxic zone at the bottom (Strategy 1). Actually, aeration of the whole MES length (Strategy 2) is detrimental to the initial formation of the microbial anode.
- A significant decrease of the value of maximal potential when organic matter is supplied to the MES indicates that the cathode is not strong enough to drive the potential towards high values and that the upper aeration zone must be enlarged.

In addition, it was pointed out that the activity of the MES for organic matter oxidation during the non-aerated periods depends on its capacity to accumulate electrons. Consequently, the more capacitive the electrode is, the more capable it will be of storing electrons, enabling longer non-aerated periods. Increasing the capacitance of the MES material should consequently be a way to space out the aeration periods, and thus to decrease the aeration cost. The interest of capacitive materials has been widely investigated in the domain of microbial fuel cells [19–23]. The considerable experience gained in this context should be very useful in improving MESs by reducing the frequency of aeration.

## **4. Conclusion**

Potential has been demonstrated here to be the key parameter that should be monitored to manage an MES, particularly when setting the aeration zone and controlling the aeration frequency. To the best of our knowledge, this is the first time that a correlation is shown between the MES potential and the dissolved oxygen concentration. The behaviour of the MESs was stable over several weeks with aeration periods ranging from 30 minutes to 2 hours every 5-6 hours. Practical rules could thus be stated for using the potential measurement to control the aeration frequency. The period of activity of the MES after the end of the aeration was about 30 minutes. During these 30 minutes, the MESs abated 3 to 6.3 times more COD than the controls. This active period without aeration corresponds to the time required for the electrode to reach its maximal level of accumulation of the electrons coming from the oxidation of organic matter. Increasing the capacitance of the MES material should consequently be an effective way to decrease the aeration frequency.

## Acknowledgements

This work was supported by the French Agence Nationale de la Recherche (ANR), within the framework of the Biotuba project (ANR-17-CE06-0015).

## Declaration of interests

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

## References

- [1] D. Fang, B. Chen, Linkage analysis for the water–energy nexus of city, *Applied Energy*. 189 (2017) 770–779. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2016.04.020>.
- [2] M. Molinos-Senante, R. Sala-Garrido, A. Iftimi, Energy intensity modeling for wastewater treatment technologies, *Science of The Total Environment*. 630 (2018) 1565–1572. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.02.327>.
- [3] B. Erable, L. Etcheverry, A. Bergel, From microbial fuel cell (MFC) to microbial electrochemical snorkel (MES): maximizing chemical oxygen demand (COD) removal from wastewater, *Biofouling*. 27 (2011) 319–326. <https://doi.org/10.1080/08927014.2011.564615>.
- [4] M. Hoareau, B. Erable, A. Bergel, Microbial electrochemical snorkels (MESs): A budding technology for multiple applications. A mini review, *Electrochemistry Communications*. 104 (2019) 106473. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2019.05.022>.
- [5] C. Cruz Viggi, E. Presta, M. Bellagamba, S. Kaciulis, S.K. Balijepalli, G. Zanaroli, M. Petrangeli Papini, S. Rossetti, F. Aulenta, The “Oil-Spill Snorkel”: an innovative bioelectrochemical approach to accelerate hydrocarbons biodegradation in marine sediments, *Frontiers in Microbiology*. 6 (2015). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00881>.
- [6] U. Marzocchi, E. Palma, S. Rossetti, F. Aulenta, A. Scoma, Parallel artificial and biological electric circuits power petroleum decontamination: The case of snorkel and cable bacteria, *Water Research*. 173 (2020) 115520. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115520>.
- [7] Q. Yang, H. Zhao, H. Liang, Denitrification of overlying water by microbial electrochemical snorkel, *Bioresource Technology*. 197 (2015) 512–514. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.127>.
- [8] A. Aguirre-Sierra, T. Bacchetti-De Gregoris, J.J. Salas, A. de Deus, A. Esteve- Núñez, A new concept in constructed wetlands: assessment of aerobic electroconductive

- biofilters, *Environmental Science: Water Research & Technology*. 6 (2020) 1312–1323. <https://doi.org/10.1039/C9EW00696F>.
- [9] A. Aguirre-Sierra, T. Bacchetti-De Gregoris, A. Berná, J.J. Salas, C. Aragón, A. Esteve-Núñez, Microbial electrochemical systems outperform fixed-bed biofilters in cleaning up urban wastewater, *Environmental Science: Water Research & Technology*. 2 (2016) 984–993. <https://doi.org/10.1039/C6EW00172F>.
- [10] Ramírez-Vargas, C.A. Arias, L. Zhang, H. Brix, Microbial Community Function in Electroactive Biofilm-based Constructed Wetlands, *Biogeosciences Discussions*. (2018) 1–28. <https://doi.org/10.5194/bg-2018-428>.
- [11] C.A. Ramírez-Vargas, C.A. Arias, P. Carvalho, L. Zhang, A. Esteve-Núñez, H. Brix, Electroactive biofilm-based constructed wetland (EABB-CW): A mesocosmscale test of an innovative setup for wastewater treatment, *Science of The Total Environment*. 659 (2019) 796–806. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.12.432>.
- [12] M. Rimboud, M. Barakat, A. Bergel, B. Erable, Different methods used to form oxygen reducing biocathodes lead to different biomass quantities, bacterial communities, and electrochemical kinetics, *Bioelectrochemistry*. 116 (2017) 24–32. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2017.03.001>.
- [13] B. Erable, D. Féron, A. Bergel, Microbial Catalysis of the Oxygen Reduction Reaction for Microbial Fuel Cells: A Review, *ChemSusChem*. 5 (2012) 975–987. <https://doi.org/10.1002/cssc.201100836>.
- [14] M. Rimboud, A. Bergel, B. Erable, Multiple electron transfer systems in oxygen reducing biocathodes revealed by different conditions of aeration/agitation, *Bioelectrochemistry*. 110 (2016) 46–51. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2016.03.002>.
- [15] M. Hoareau, B. Erable, A. Bergel, Oxygen-reducing bidirectional microbial electrodes: A mini-review, *Electrochemistry Communications*. (2021) 106930. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2021.106930>.
- [16] M. Hoareau, B. Erable, O. Chapleur, C. Midoux, C. Bureau, A. Goubet, A. Bergel, Oxygen-reducing bidirectional microbial electrodes designed in real domestic wastewater, *Bioresource Technology*. (2021).
- [17] D.P.B.T.B. Strik, H.V.M. Hamelers, C.J.N. Buisman, Solar Energy Powered Microbial Fuel Cell with a Reversible Bioelectrode, *Environmental Science & Technology*. 44 (2010) 532–537. <https://doi.org/10.1021/es902435v>.
- [18] J. Sun, Y. Hu, W. Li, Y. Zhang, J. Chen, F. Deng, Sequential decolorization of azo dye and mineralization of decolorization liquid coupled with bioelectricity generation using a pH self-neutralized photobioelectrochemical system operated with polarity reversion, *Journal of Hazardous Materials*. 289 (2015) 108–117. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.02.010>.
- [19] A. Deeke, T.H.J.A. Sleutels, A.T. Heijne, H.V.M. Hamelers, C.J.N. Buisman, Influence of the thickness of the capacitive layer on the performance of bioanodes in Microbial Fuel Cells, *Journal of Power Sources*. 243 (2013) 611–616. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2013.05.195>.

- [20] C. Borsje, D. Liu, T.H.J.A. Sleutels, C.J.N. Buisman, A. ter Heijne, Performance of single carbon granules as perspective for larger scale capacitive bioanodes, *Journal of Power Sources*. 325 (2016) 690–696. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2016.06.092>.
- [21] B. Li, J. Zhou, X. Zhou, X. Wang, B. Li, C. Santoro, M. Grattieri, S. Babanova, K. Artyushkova, P. Atanassov, A.J. Schuler, Surface Modification of Microbial Fuel Cells Anodes: Approaches to Practical Design, *Electrochimica Acta*. 134 (2014) 116–126. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2014.04.136>.
- [22] C. Santoro, M. Kodali, S. Kabir, F. Soavi, A. Serov, P. Atanassov, Threedimensional graphene nanosheets as cathode catalysts in standard and supercapacitive microbial fuel cell, *Journal of Power Sources*. 356 (2017) 371–380. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2017.03.135>.
- [23] L. Caizán-Juanarena, C. Borsje, T. Sleutels, D. Yntema, C. Santoro, I. Ieropoulos, F. Soavi, A. ter Heijne, Combination of bioelectrochemical systems and electrochemical capacitors: Principles, analysis and opportunities, *Biotechnology Advances*. 39 (2020) 107456. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107456>.

## 4 Ajustement de l'aération séquentielle et analyses des populations microbiennes

### 4.1 Conditions opératoires

La seconde expérience réalisée avec le Biotuba\_48 (Biotuba\_48.2), est destinée à affiner la durée des périodes d'aération. Il a été observé précédemment qu'une aération de 30 minutes était suffisante pour atteindre la valeur maximale du potentiel et que, corollairement, le biotuba n'était actif que sur cette période de 30 minutes après l'arrêt de l'aération. La séquence d'aération choisie pour cette expérience est donc de 30 minutes avec aération pour 30 minutes sans aération (Tableau 4.6). Plus tard, au jour 37, suite aux premiers résultats, la séquence passe à 30 minutes avec aération pour 1h30 sans aération.

Tableau 4.6 : Conditions expérimentales utilisées pour l'expérience Biotuba\_48.2 avec aération séquentielle.

<b>Montage expérimental (chapitre 2 – parties 2.1.2 et 2.3)</b>	
<b>Réacteurs « Biotuba_48 »</b>	Electrode de travail : feutre de carbone +tige en titane
<b>2 biotubas &amp; 2 contrôles</b>	Electrode de référence : ECS Contrôle : grille de plastique pour simuler l'électrode
<b>Réservoir</b>	Débit de recirculation : 1,5 mL/min – Arrêt de la recirculation
<b>Flacon en verre de 2L</b>	lors des phases de suivi de la DCO en batch
<b>Milieu de culture + inoculum (chapitre 2 - parties 1.1.1 et 1.2.2)</b>	
<b>Milieu initial</b>	Eaux usées réelles non hydrolysées + 5% de boues activés
<b>Changements de milieu</b>	Eaux usées réelles hydrolysées
<b>Volume</b>	27 cm dans le réacteur, 300-350mL
<b>Techniques électrochimiques (chapitre 2 – parties 3.1.2)</b>	
<b>OCP</b>	Mesure toutes les 10 minutes durant toute l'expérience
<b>Conditions d'aération</b>	
<b>Aération séquentielle, au quart haut du réacteur, tuyau Ø 4,8 mm</b>	J0-J37 : 30 min avec bullage, 30 min sans J37-J46 : 30 min avec bullage, 1h30 sans
<b>Analyses des populations microbiennes (chapitre 2 – partie 3.4)</b>	

## 4.2 Résultats électrochimiques et performances d'abattement

Jusqu'au jour 37, les périodes d'aération se succèdent à un rythme de 30 minutes avec bullage et 30 minutes sans. Le potentiel du Biotuba\_48 évolue progressivement vers des valeurs élevées au gré des phases d'aération séquentielle (Figure 4.15). Le potentiel haut varie de 0 V vs ECS au tout début de l'expérience, jusqu'à +0,3 V vs ECS au jour 37, valeur qui n'avait jamais été atteinte jusqu'alors. D'importantes variations sont observées pour le potentiel bas, qui varie entre -0,4 V vs ECS et +0,2 V vs ECS. Le potentiel (que ce soit le potentiel haut ou bas) est ici particulièrement sensible aux changements de réservoir : il est bas juste après le changement de réservoir, lorsque l'apport en substrat est important, puis il remonte et se stabilise à des valeurs positives, probablement lorsque le substrat vient à manquer.

Le premier suivi de la DCO en batch (batch n°1) n'a pas du tout fonctionné : l'abattement de la DCO était nul, tant dans les contrôles que dans les Biotuba\_48. Corrélié au potentiel très haut observé jusqu'alors, il est possible que l'aération séquentielle « 30 minutes avec / 30 minutes sans » n'ait pas permis le développement de la branche anodique, c'est-à-dire la formation d'un biofilm anodique capable d'oxyder la DCO des eaux usées. En effet, les périodes d'aération représentant la moitié du temps, il est fort possible que la DCO ait été abattue par les bactéries aérobies en solution. Ces dernières ont eu assez d'oxygène pour ne pas être contrainte à former un biofilm électroactif qui utiliserait l'électrode pour respirer. Les bactéries aérobies se sont alors développées au détriment des bactéries exo-électrogènes. Suite à ce premier batch, les séquences d'aération sont modifiées en allongeant la période sans aération de 30 min à 1h30, dans l'espoir de favoriser la formation d'un biofilm électroactif exoélectrogène.

On peut remarquer ici que la seule mesure du potentiel du biotuba n'est pas garante de son bon fonctionnement. Comme indiqué plus haut, nous cherchons à faire fonctionner le Biotuba\_48 au potentiel le plus élevé possible afin qu'il abatte la matière organique le plus rapidement possible. Ici le potentiel est élevé mais le biotuba est inefficace. Il faut donc compléter la règle en précisant que le biotuba, muni d'une branche anodique efficace, doit fonctionner au potentiel le plus élevé possible. Ici le potentiel est élevé non pas grâce à une extrême efficacité de la partie cathodique qui tirerait le potentiel vers les valeurs élevées, mais du fait de la déficience de la partie anodique.

Lorsque la période sans aération passe de 30 minutes à 1h30, la gamme de potentiel diminue alors instantanément pour se rapprocher des valeurs observées lors des essais présentés dans l'Article 4 : une valeur haute entre -0,1 et 0 V vs ECS et une valeur basse entre

-0,4 et -0,5 V vs ECS (Figure 4.15 – J37). Le deuxième suivi de la DCO (batch 2) n'a pas permis d'obtenir des résultats pertinents à cause d'une prise d'échantillon initial trop tardive. En effet, le biotuba n'oxydant la matière organique que sur une courte période après l'arrêt de l'aération, un échantillon initial prélevé avec un délai trop long n'est pas représentatif et fausse les calculs d'abattement. Il n'a pas été possible d'obtenir des valeurs d'abattement exploitables pour ce batch.

Le potentiel des biotubas remonte entre le batch 2 et le batch 3 car il n'y a pas eu de changement de réservoir, le manque de substrat entraîne donc une remontée du potentiel. Il revient à des valeurs classiques après le changement de réservoir suite au batch 3.

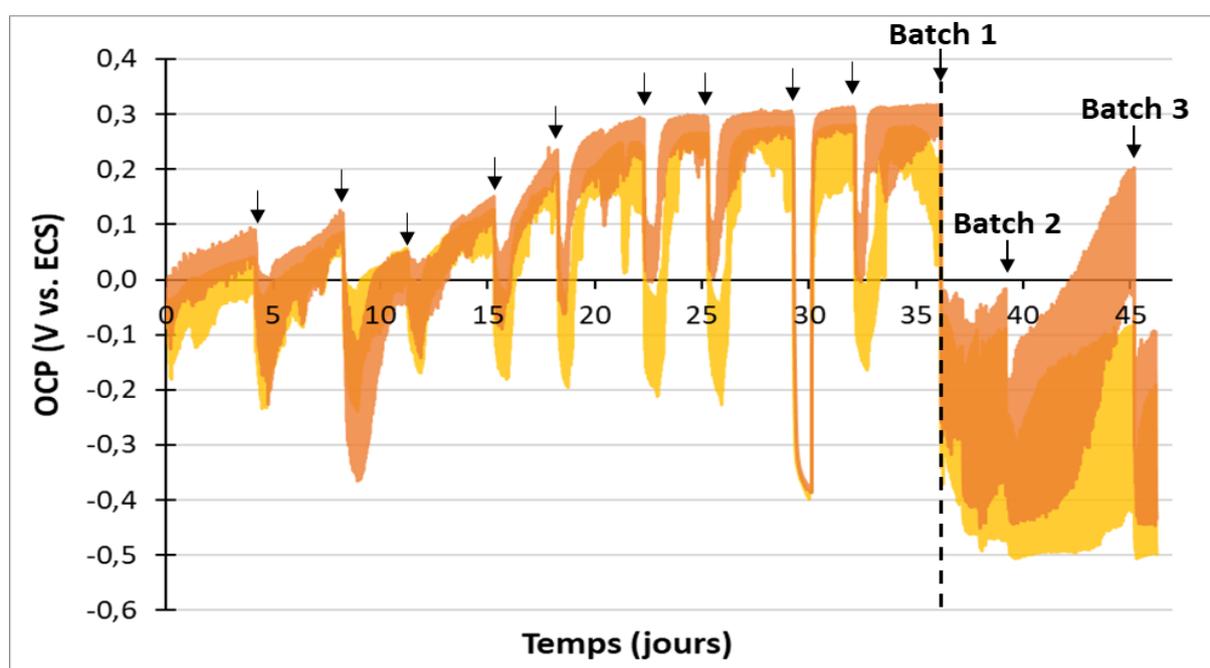


Figure 4.15 : Biotuba\_48.2 avec aération séquentielle. Suivi de l'OCP du biotuba en fonction du temps (duplicats). La ligne pointillée indique le passage de la séquence « 30 min avec aération / 30 min sans » à la séquence « 30 min avec / 1h30 sans ». Les « batch » sont les périodes de suivi de la DCO.

En revanche le troisième suivi de la DCO (batch 3) a bien fonctionné, puisque l'abattement de DCO est trois fois plus important dans les réacteurs Biotuba\_48 que dans les réacteurs de contrôle (Figure 4.16). La période d'activité du biotuba est très courte. Au bout de 15 minutes il n'y a plus d'évolution de la DCO, confirmant l'hypothèse selon laquelle la phase d'abattement a été ratée lors du batch 2.

L'abattement de la DCO pour le batch 3 montre une évolution assez particulière, tant avec le biotuba que sans. L'abattement diminue entre 1,2 h et 1,8 h avant de remonter pour se stabiliser presque au niveau de la valeur initiale au bout de 2 heures. La discussion avec les chercheurs de l'INRAE-PROSE, partenaires du projet Biotuba, a suggéré que ce comportement, qu'ils avaient déjà observé, puisse être dû au biofilm qui retient une partie de la DCO, d'où l'abattement initial, puis la relâche en solution avant que l'oxydation réelle ne se mette en place.

Les biofilms sont connus pour être capables de sorption de matières dissoutes (Späth et al., 1998). Les polymères extracellulaire (EPS), membranes et parois cellulaires, ou le cytoplasme peuvent servir de site de sorption (Flemming, 1995). Ces processus peuvent modifier la distribution des polluants dans des procédés de traitement des eaux usées. Des études sur les cinétiques de sorption/désorption ont démontré que, dans les boues activées, l'équilibre de sorption était atteint en 0,5 à 1 heure (Torresi et al., 2017), ce qui correspondrait à la période observée ici de diminution et augmentation de l'abattement : 1 heure après le changement de milieu et le démarrage du batch.

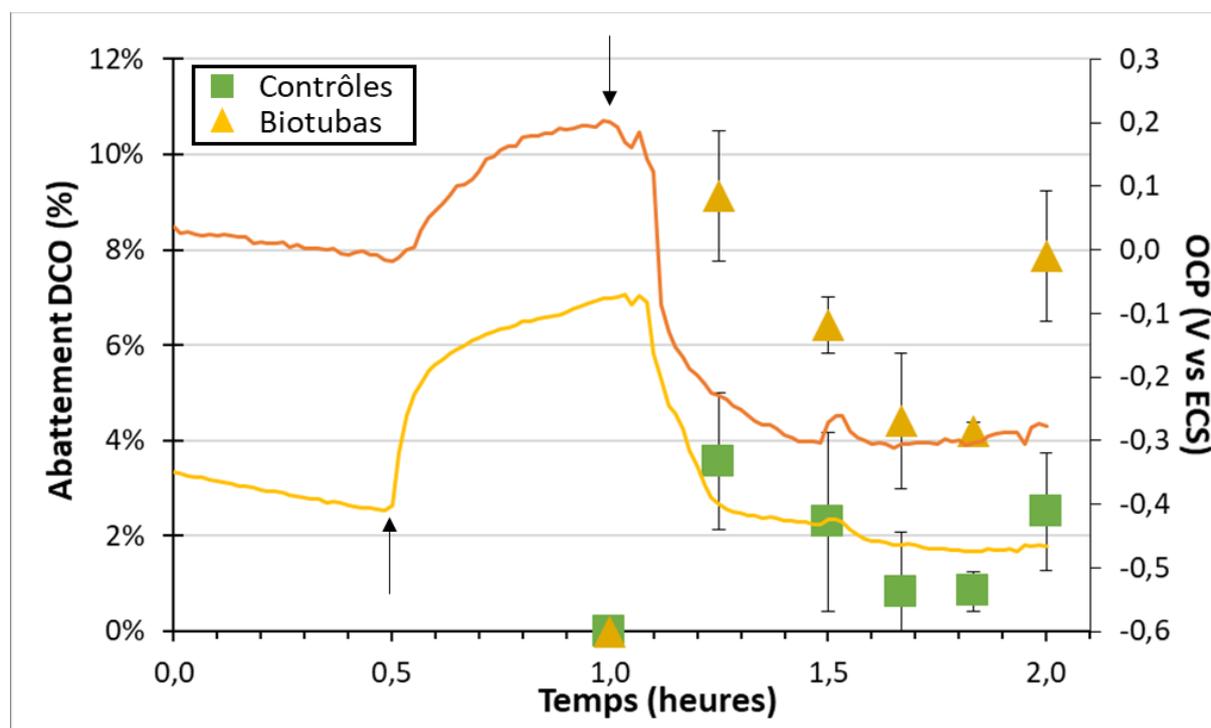


Figure 4.16 : Biotuba\_48.2 avec aération séquentielle. Suivi de l'OCP et de l'abattement moyen de la DCO dans les biotubas et contrôles en fonction du temps. L'aération commence à 0,5 heure (flèche vers le haut) et s'arrête 30 min plus tard en même temps que la recirculation (flèche vers le bas), le milieu est alors changé et le suivi de la DCO commence (batch 3).

Il aurait été intéressant de poursuivre cette expérience mais nous avons été contraints de l'arrêter précipitamment lors du premier confinement de mars 2020. Des échantillons d'électrodes et des eaux usées des réacteurs ont néanmoins été collectés et conservés précieusement au congélateur, et l'analyse des populations microbiennes a pu être effectuée par la suite.

### **4.3 Analyses des populations microbiennes**

L'analyse des populations microbiennes a été réalisée sur des échantillons prélevés selon le protocole décrit dans la partie 3.4 du chapitre 2. Pour les biotubas, des échantillons de biofilm sont prélevés tout en haut et tout en bas de l'électrode, à la surface (biofilm externe) et à l'intérieur du feutre (biofilm interne). Les contrôles n'ont que des biofilms externes vu que le support est en plastique. Des échantillons de milieu, ici des eaux usées, prélevés dans les réacteurs en fin d'expérience sont également analysés. Les populations microbiennes sont identifiées au niveau taxonomique exploitable le plus bas au regard de la forte diversité microbienne identifiée : la famille (Figure 4.17). Le barplot au niveau taxonomique du genre n'est pas présenté ici car de trop nombreux microorganismes n'ont pas pu être identifiés jusqu'à ce niveau.

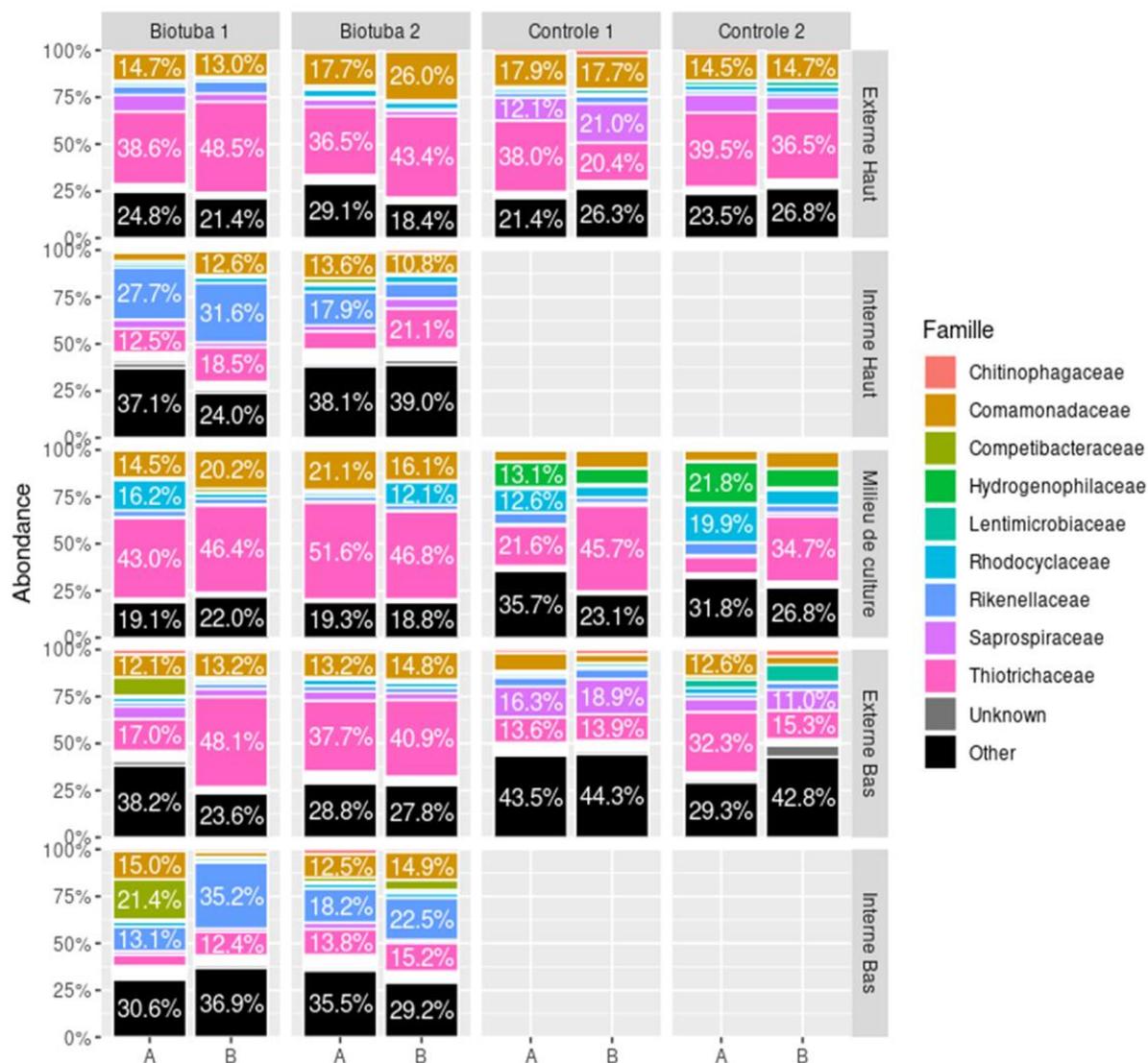


Figure 4.17 : Abondance relative des familles. Les colonnes présentent deux échantillons dupliqués (A et B) pour les Biotubas\_48.2 (nommés Biotuba 1 et 2) et les Contrôles 1 et 2. Les lignes correspondent aux biofilms externes et internes récoltés en haut des électrodes, aux solutions prélevées dans les réacteurs et aux biofilms externes et internes récoltés en bas des électrodes. Pour les contrôles il n'y a pas de biofilm interne puisque le support est en plastique.

Dans les biotubas, la famille des *Thiotrichaceae* est largement majoritaire. Les abondances sont de  $47 \pm 4\%$  en solution,  $41 \pm 6\%$  dans les échantillons de biofilms externes dans la partie haute aérobie et  $36 \pm 13\%$  dans la partie basse anaérobie. Cette famille est bien moins présente dans le biofilm interne avec des valeurs de  $15 \pm 5\%$  et  $12 \pm 4\%$  pour les parties haute et basse, respectivement. Leur abondance est globalement plus faible dans les

réacteurs de contrôle avec  $34 \pm 9\%$  pour le biofilm haut,  $19 \pm 9\%$  pour le biofilm bas et  $28 \pm 16\%$  pour la solution.

La famille des *Thiotrichaceae* appartient à la classe des *Gammaproteobacteria*, largement ubiquitaire. Les *Gammaproteobacteria* comprennent de nombreuses espèces identifiées comme exoélectrogènes (Logan et al., 2019). Sur les 1 166 OTUs identifiées dans ces échantillons, 62 OTUs sont affiliées à la famille des *Thiotrichaceae* et tous appartiennent au genre *Thiothrix*. Les bactéries du genre *Thiothrix* sont majoritairement des sulfato-réductrices qui peuvent être mixotrophes, c'est-à-dire utiliser soit des composés inorganiques ( $H_2$ , thiosulfates, etc.) comme donneur d'électrons et du  $CO_2$  comme source de carbone, soit utiliser des composés organiques (généralement des acides organiques) comme sources de carbone et d'électrons. Elles ont été observées dans des milieux contenant des sulfures (Lin et al., 2018) mais aussi dans des boues activées (Pham et al., 2019). *Thiothrix* a déjà été identifié dans des systèmes électro-microbiens (Li et al., 2021; Pham et al., 2019), notamment comme genre majoritaire présent à 41% dans des biofilms cathodiques formés dans des eaux usées synthétiques inoculés avec des boues activées (Chang et al., 2020).

Leur présence semble aussi être favorisée par la présence de l'électrode grâce à leur électroactivité. Huit de ces OTUs ont pu être affiliées jusqu'à l'espèce *Thiothrix unzii*. Cette espèce n'a jamais été observée dans des systèmes électro-microbiens jusqu'à présent mais elle a été identifiée dans des boues activées (Howarth et al., 1999) et en milieu naturel dans des eaux de sources aux Etats-Unis (Brigmon et al., 2003).

La deuxième famille la plus abondante, particulièrement dans les biotubas, est celle des *Comamonadaceae*, qui fait partie de la classe des *Betaproteobacteria*. Cette famille présente une abondance conséquente dans les biotubas avec  $18 \pm 3\%$  pour la solution,  $18 \pm 6\%$  pour le biofilm externe haut et  $16 \pm 2\%$  pour le biofilm haut du contrôle. Toutes les autres valeurs sont inférieures à 15%. 86 OTUs de cette famille ont été identifiées, répartis parmi 22 genres bactériens (sans compter celles qui n'ont pas pu être affiliées ou qui sont multi-affiliées). Le genre majoritaire est *Sphaerotilus* avec 7 OTUs affiliés à l'espèce *Sphaerotilus natans* sur les 10 correspondant à ce genre. Cette espèce, commune dans les stations d'épurations, est capable de respirer en réduisant des oxydes de fer (Stokes, 1954). C'est une bactérie filamenteuse qui peut entraîner un foisonnement des boues lors du traitement des eaux usées. Dans le cas des systèmes électro-microbiens, cette espèce a été identifiée dans des biofilm cathodiques de réduction de l'oxygène (Li et al., 2021). Il a été montré qu'un foisonnement trop important de ces bactéries pouvaient inhiber l'activité de la cathode microbienne en bloquant le transfert de l'oxygène vers les couches inférieures du biofilm. Des phases d'anaérobioses et de limitation du substrat ont permis de réguler leur population (Li et

al., 2021). Cela se vérifie ici avec la faible abondance de cette famille dans la partie basse anaérobie ainsi que dans le biofilm interne du biotuba.

Quatre autres familles ne sont présentes que dans certains échantillons comme *Rikenellaceae*, commune dans le microbiote de souris (Donaldson et al., 2016) et comportant des espèces électroactives (Quéméner et al., 2018). *Rikenellaceae* est détectée ici dans les échantillons de biofilm interne du biotuba (21 ±11% en haut et 22 ±9% en bas). La famille *Saprospiraceae* est trouvée dans le biofilm des réacteurs de contrôle (13 ±6% en haut et 13 ±5% en bas). Les deux familles précédentes font aussi partie des *Gammaproteobacteria*. Les familles *Hydrogenophilaceae*, connus pour oxyder les sulfures (Garrity et al., 2015) et *Rhodocyclaceae*, capables de dégrader des composés aromatiques (Corteselli et al., 2017), sont présentes dans la solution des contrôles (8 ±2% pour les deux) et appartiennent au phylum des *Bacteroidota*.

Des ACP ont été réalisées sur l'ensemble des données issues du séquençage de la région hyper variable V4-V5 du gène de l'ARNr 16S. Les graphes des individus, représentant chaque échantillon (Figure 4.18A et B), montrent la séparation des différents échantillons après l'ACP (composantes 1, 2 et 3). La composante 1, représentant 32% de la variance entre les échantillons, les sépare en fonction de la localisation de la biomasse (biofilm ou milieu). La composante 2 (21% de la variance) sépare les échantillons des contrôles de ceux des biotubas. La composante 3 (21% de la variance) distingue les biofilms internes et externes de l'électrode.

Les cercles de corrélation ont été utilisés pour relier la répartition des échantillons aux OTUs qui les caractérisent, c'est-à-dire les OTUs ayant le plus d'influence sur la variance entre les échantillons (Figure 4.18C et D). Les cercles de corrélation montrent que les OTUs caractéristiques de la solution appartiennent aux familles *Hydrogenophilaceae* et *Rhodocyclaceae*. Deux familles sont caractéristiques des échantillons de biofilm : *Saprospiraceae* pour les contrôles et *Comamonadaceae* pour les biotubas. Les familles les plus abondantes sont donc aussi celles qui ont le plus d'influence sur les composantes.

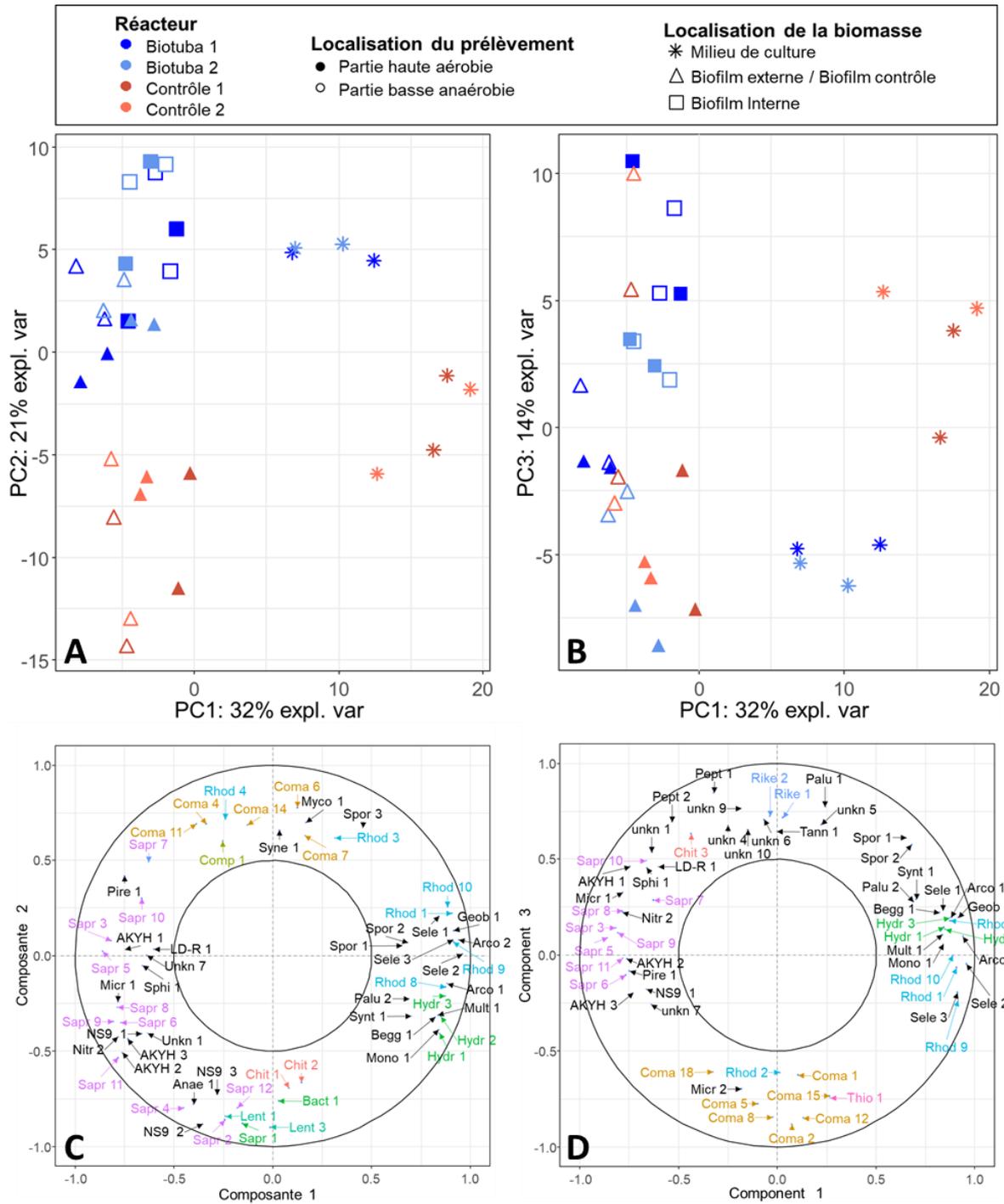


Figure 4.18 : Comparaison des échantillons basée sur la localisation de la biomasse (interne, externe) et le type de réacteur (biotuba ou contrôle), la représentation graphique des individus (A) et le cercle de corrélation (C) ; basée sur la localisation de la biomasse (interne, externe) et du prélèvement (haut, bas), la représentation graphique des individus (B) et le cercle de corrélation (D). NB : Les OTUs sur les cercles de corrélation (C et D) sont nommés et colorés selon la famille bactérienne avec les mêmes couleurs que celles utilisées dans la Figure 4.16.

Bien que ces familles appartiennent aux mêmes phyla que ceux identifiés pour les électrodes bidirectionnelles du Chapitre 3, notamment les *Gammaproteobacteria* et les *Bacteroidota*, de nombreuses différences apparaissent à un rang taxonomique inférieur tel que la classe ou la famille. Une seule famille majoritaire est commune aux deux cas : celles des *Comamonadaceae*, souvent trouvée dans les stations d'épurations. Ainsi, malgré un inoculum à l'origine identique, les conditions expérimentales, passant d'une électrode bidirectionnelle polarisée au Chapitre 3 à un biotuba avec aération séquentielle ici, influencent fortement la sélection des populations microbiennes.

#### 4.4 Conclusion

Ce dernier essai apporte deux informations principales sur le Biotuba\_48 avec aération séquentielle. Tout d'abord, il s'avère qu'une séquence de 30 minutes avec aération et 30 minutes sans aération entraîne un apport d'oxygène trop important qui freine le développement de l'anode microbienne. Cela se traduit par un potentiel très haut qui ne redescend que très peu lors de l'arrêt de l'aération. Nous avons là une information importante pour piloter la formation du biotuba, mais aussi la confirmation que le potentiel est le paramètre pertinent pour suivre son comportement.

Le passage à des périodes de 30 minutes avec aération pour 1h30 sans aération permet d'obtenir des évolutions du potentiel similaires à celles des parties 3.1 et 3.3 avec une valeur haute entre -0,1 et 0 V vs ECS et une valeur basse entre -0,4 et -0,5 V vs ECS. On observe alors une dégradation de la matière organique deux fois plus importante avec le Biotuba\_48 par rapport au contrôle. Nous avons donc déterminé une séquence d'aération qui assure une dégradation de la matière organique significative par le biotuba.

L'analyse des populations microbiennes montre une domination de la famille des *Thiotrichaceae* (genre *Thiothrix*) pour la solution et le biofilm externe, atteignant  $47 \pm 4\%$  dans la partie haute aérobie et  $42 \pm 5\%$  dans la partie basse anaérobie des biotubas. Le biofilm interne est, lui, dominé par la famille *Rikenellaceae*. Les composantes 1, 2 et 3 (représentant respectivement 32%, 21% et 14% de la variance) font ressortir une influence de la localisation de la biomasse (milieu, biofilm interne ou externe), du type de réacteur (biotuba ou contrôle) et de la localisation du prélèvement (haut ou bas) sur la sélection des populations microbiennes. Ces analyses ont aussi montré qu'au-delà de la nature ou de l'origine de la communauté initiale, les conditions locales telles que la présence d'oxygène, l'organisation en

biofilm ou le support (feutre ou plastique) ont une grande influence sur les populations microbiennes.

## 5 Conclusion du chapitre 4

Ce chapitre est fondé sur le suivi de trois paramètres essentiels : la concentration en oxygène dissout, le potentiel mixte du biotuba et l'abattement en DCO. Il a mis en évidence des corrélations entre eux et en a tiré des règles pour le pilotage du biotuba. Il a été difficile de maintenir les performances sur le long terme du Biotuba\_26, à cause de la difficulté à stabiliser des zones aérobies et anaérobies bien définies. La formation de floccs microbiens dans le réacteur en est sans doute la cause essentielle.

La faible hauteur des Biotubas\_26 était un autre handicap. Nous l'avons pallié en doublant sa hauteur avec le Biotuba\_48. De plus, l'effet du biotuba était sans doute amoindri par l'encombrement dû aux électrodes qui gênent le transfert de l'oxygène alors que l'absence de structure interne dans les premiers réacteurs de contrôle permettait un transfert de l'oxygène plus efficace. Une grille de plastique de même taille et de même forme que l'électrode a été ajoutée dans les contrôles suivants, afin de reproduire l'encombrement de l'électrode. Le protocole de suivi de la DCO a été modifié, il est maintenant effectué en batch et sans aération afin de rendre les mesures fiables et interprétables.

L'ensemble des résultats confirme le potentiel comme le paramètre clé de pilotage du biotuba. Il doit osciller entre des valeurs basses comprises entre -0,4 et -0,5 V vs ECS lorsque le milieu est majoritairement anoxique et des valeurs hautes comprises entre 0 et +0,1 V vs ECS, lorsque la concentration en oxygène est à sa valeur maximale. Des valeurs plus élevées indiquent une déficience de la partie anodique. L'objectif est de mettre en place une aération séquentielle qui maintienne le potentiel le plus longtemps possible proche des valeurs maximales. Evidemment, la période d'aération doit être la plus courte possible afin de minimiser les coûts de traitement.

Une aération séquentielle dans le Biotuba\_48 de 30 minutes avec bullage pour 1 heure 30 sans aération a permis un fonctionnement satisfaisant du biotuba qui assure un abattement de la DCO jusqu'à 3 fois plus important que dans les contrôles aérés suivant la même séquence. Une période trop longue sans aération n'est pas utile puisque le biotuba n'est actif que durant environ 30 minutes après la fin de l'aération. Une aération trop importante, à l'inverse, empêche le développement du biofilm anodique.

La famille des *Thiotrichaceae* est dominante dans le milieu de culture et le biofilm externe alors que la famille est *Rikenellaceae* est dominante dans le biofilm interne. La localisation de la biomasse, interne au feutre de carbone ou en surface, est le facteur ayant le plus d'impact sur les populations microbiennes. Le fait que le réacteur soit un Biotuba\_48 avec une électrode conductrice ou un contrôle avec une structure en plastique exerce aussi un impact significatif, de même que la localisation du prélèvement en haut ou en bas de l'électrode. L'influence des paramètres expérimentaux sur les populations microbiennes est aussi flagrante lorsque l'on compare les populations microbiennes des électrodes bidirectionnelles du Chapitre 3 et celles du biotuba aéré ici. Malgré un inoculum identique, les populations varient sous l'effet des conditions expérimentales.

L'autre évènement important à noter est le résultat d'un problème de pompe survenu lors des expériences Biotuba\_26.2 et 26.3. La baisse involontaire du volume dans les réacteurs a laissé une partie du biotuba exposée à l'air libre. Le potentiel est alors remonté aux valeurs normalement observées lors des phases d'aération forcée. Il semblerait donc que laisser une partie de l'électrode émergée permettrait d'obtenir la même évolution du potentiel que l'aération de la solution. Les chapitres suivants exploreront cette hypothèse grâce à la mise en place de biotubas avec une électrode en partie émergée.



***Chapitre 5 : Biotuba avec  
électrode capillaire émergée en  
milieu synthétique***



## 1 Objectifs et choix de l'étude

Le chapitre 3 a décrit la mise en place d'électrodes capables de TEE bidirectionnels dans les eaux usées domestiques et le chapitre 4 leur mise en application dans une configuration de type biotuba avec aération séquentielle. Dans le chapitre 4, la baisse involontaire du niveau de solution dans les réacteurs, laissant une partie du biotuba à l'air libre, a conduit à la même évolution du potentiel du biotuba que celle observée lors de l'aération de la solution. L'émersion partielle de l'électrode constitue alors une nouvelle stratégie d'accès à l'oxygène qui permet de maintenir l'activité microbienne grâce à la capillarité qui assure l'hydratation et l'apport en substrat. Les chapitres 5 et 6 qui suivent décrivent le développement de cette nouvelle stratégie nommée « biotuba avec électrode capillaire émergée ». Ce chapitre 5 se concentre sur l'optimisation des conditions d'émersion (hauteur et durée maximale en émersion), en travaillant dans des milieux bien maîtrisés par l'équipe du LGC (lixiviat de terreau) ou dans des milieux synthétiques (tampon phosphate, eaux usées synthétiques).

Les lignes générales des protocoles expérimentaux sont présentées dans la première partie de ce chapitre.

En amont des expériences avec une électrode capillaire émergée, nous nous sommes concentrés sur la formation du biofilm anodique. Pour cela, nous avons adapté le protocole, mis au point il y a quelques années par Diana Pocaznoi, appelé « polarisation retardée » (Pocaznoi et al., 2012). Ce protocole consiste à laisser un certain temps, typiquement plusieurs jours, une électrode en circuit ouvert (Open Circuit, OC) avant de lui appliquer un potentiel et suivre l'évolution du courant. Nous avons tenté de déterminer si le temps passé en circuit ouvert a un impact sur le courant produit par la suite lors de la polarisation et, si oui, quelle est la durée optimale. Ces essais sont présentés dans la seconde partie du chapitre.

La durée optimale en circuit ouvert déterminée pour les anodes est ensuite utilisée pour concevoir les cathodes capillaires émergées dont la caractérisation électrochimique vis-à-vis de la réduction de l'oxygène fait l'objet de la troisième partie du chapitre. Cette partie étudie l'influence de différents paramètres tels que le prétraitement de l'électrode (trempage, désaération), la conductivité du milieu et son caractère biotique ou abiotique. Les expériences réalisées dans les deuxième et troisième parties utilisent des montages classiques à trois électrodes.

L'ensemble des résultats issus des essais de formation du biofilm anodique et de conception de la cathode capillaire émergée est ensuite mis à profit pour concevoir des

premiers biotubas avec électrode capillaire émergée. La quatrième partie présente les performances électrochimiques et d'abattement de la matière organique de ces biotubas et décrit les variations de populations microbiennes en fonction du type de réacteur (contrôle ou biotuba) et de la localisation de l'échantillon (milieu de culture, électrode en zone émergée ou immergée).

Les détails des montages expérimentaux utilisés dans ce chapitre, les techniques électrochimiques et analytiques, les méthodes d'observation et les protocoles d'analyse des populations microbiennes sont décrits dans le chapitre 2.

## **2 Formation et caractérisation de l'anode microbienne par polarisation retardée**

### **2.1 Conditions opératoires**

Le milieu utilisé, du lixiviat de terreau, l'électrode en tissu de carbone et les conditions de polarisation sont les mêmes que ceux utilisés par Diana Pocaznoi dans son protocole de « polarisation retardée » (Pocaznoi et al., 2012). Le protocole commence par une période en circuit ouvert (OC) suivie d'une étape de polarisation à  $-0,2$  V vs ECS. L'étude de Diana Pocaznoi montre que des anodes microbiennes efficaces peuvent être formées sans polarisation, avec des densités de courant atteignant rapidement  $9,4$  A/m<sup>2</sup> lorsqu'elles sont polarisées après 22 jours en OC. L'objectif des expériences décrites ici est de déterminer le temps minimal en OC nécessaire pour la formation d'une anode microbienne efficace pour l'oxydation de l'acétate.

Plusieurs dispositifs à 3-électrodes sont mis en œuvre avec des périodes en OC différentes : 3 minutes pour les contrôles et de 3 heures à 8 jours pour les autres réacteurs. Les électrodes de travail sont ensuite polarisées à  $-0,2$  V vs ECS pendant 3 heures. L'étape de polarisation est utilisée comme le moyen d'évaluer l'activité électrocatalytique du biofilm formé durant la période en OC. Des CVs sont enregistrées après les 3 heures de polarisation afin d'évaluer la cinétique d'oxydation de l'acétate, notamment en mesurant le potentiel de démarrage du courant anodique.

Pour le premier essai, une CV supplémentaire est réalisée juste après la période en OC (avant les 3 heures de polarisation) pour évaluer l'impact des 3 heures de polarisation sur l'activité électrocatalytique du biofilm. Ne semblant pas apporter d'information supplémentaire,

cette CV avant polarisation est abandonnée jusqu'au dernier essai. Pour le dernier essai, elle est à nouveau réalisée et confirme les conclusions du premier essai.

Le détail des conditions opératoires est reporté dans le Tableau 5.1.

Tableau 5.1 : Conditions expérimentales communes aux essais de formation d'un biofilm électroactif avec une polarisation retardée.

<b>Montage « Electrode immergée 1 » (chapitre 2 – parties 2.1.1 et 2.2.2)</b>	
	Electrode de travail : tissu de carbone 9 cm <sup>2</sup> + fil de platine
<b>Réacteurs « standards »</b>	Contre électrode : Grille de platine 16 cm <sup>2</sup> & Electrode de référence : ECS 15 min de bullage initial à l'azote puis réacteurs maintenus à 40°C
<b>Techniques électrochimiques (chapitre 2 – partie 3.1)</b>	
<b>OC</b>	Durée variable, de 3 minutes (contrôles) à 8 jours
<b>CA</b>	3 heures, E = -0,2 V vs ECS
<b>CV</b>	3 cycles à 1 mV/s de -0,5 à 0,2 V vs ECS
<b>Milieu de culture + inoculum (chapitre 2 – parties 1.2.1)</b>	
<b>Lixiviat de terreau</b>	1,5 L de terreau de jardin + 2,25 L KCl 60 mM, 700 mL par réacteur 20 mM acétate

## 2.2 Essai 1 : 3 heures en circuit ouvert

Pour le premier essai, 4 réacteurs sont mis en œuvre : deux réacteurs de contrôle dont l'électrode n'est maintenue que 3 minutes en OC et deux réacteurs dont l'électrode est maintenue 3 heures en OC avant la polarisation. La valeur du potentiel libre (OCP) de l'ordre de 0,05 et 0,01 V vs ECS pour chacun des duplicats évolue peu pendant les 3 heures (Figure 5.1). Les chronoampérométries qui suivent (Figure 5.2) n'indiquent pas de différence significative suivant que les électrodes ont été laissées seulement 3 minutes ou 3 heures en OC.

Pour mémoire, et pour les futurs doctorants, il n'est sans doute pas inutile de noter que, dans le paramétrage du logiciel EClab, la gamme de courants (I range) était de 100 mA et la gamme de potentiels (E range) de -10 V ; +10 V. Ces valeurs trop importantes par rapport aux

courants et potentiels mesurés sont certainement à l'origine du bruit observé sur les courbes. Ce paramétrage inadéquat a aussi pu causer un décalage entre les courbes de CA, de  $0,01 \text{ A/m}^2$  pour les réacteurs de contrôle et de  $0,02 \text{ A/m}^2$  pour les électrodes maintenues 3 heures en OC.

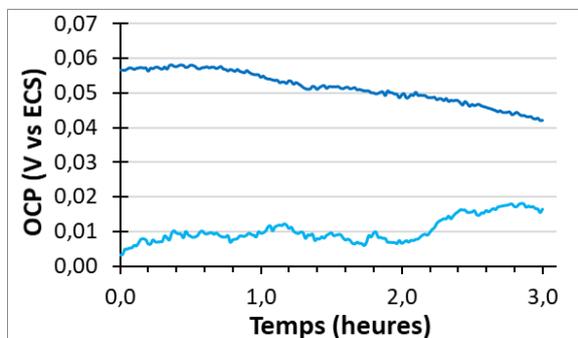


Figure 5.1 : Essai n°1 - 3 heures en OC. Suivi de l'OCP en fonction du temps (duplicats).

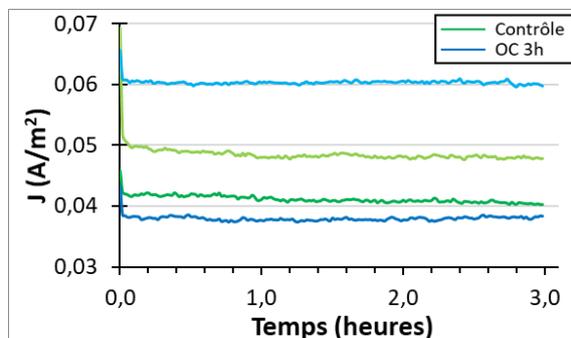


Figure 5.2 : Essai n°1 - CAs à  $-0,2 \text{ V vs ECS}$  après 3 minutes (contrôle) ou 3 heures en OC (duplicats pour chaque condition).

Pour le premier réacteur de contrôle les voltammétries (CV) enregistrées avant et après les 3 heures de polarisation sont identiques (Figure 5.3 gauche). Pour le second, la CV après les 3 heures de polarisation présente un signal de réduction entre  $-0,1$  et  $-0,5 \text{ V vs ECS}$ . Ce signal est caractéristique de la réaction de réduction de l'oxygène qui pourrait être due à une entrée indésirable d'oxygène dans le réacteur. En oxydation, les CVs enregistrées avant et après les 3 heures de polarisation ont la même allure mais avec un décalage de  $0,02 \text{ A/m}^2$ , similaire au décalage observé sur les CAs (Figure 5.3 droite). Ces résultats semblent indiquer que la période de 3 heures de polarisation n'a pas d'impact significatif sur le biofilm. C'est un résultat positif puisqu'il signifie que les 3 heures de polarisation, utilisées ici comme méthode d'évaluation du biofilm formée en OC, n'influencent pas les caractéristiques électrocatalytiques du biofilm. La méthode de mesure n'affecte pas l'objet de la mesure. Les CVs peuvent donc n'être enregistrées qu'en fin d'expérience, c'est-à-dire après la période de polarisation.

Les valeurs de courant au potentiel de  $-0,2 \text{ V vs ECS}$  sont identiques sur les CVs et sur les CAs, indiquant que la vitesse de balayage des CVs était suffisamment faible pour donner une représentation correcte du comportement stationnaire des électrodes.

Les décalages de  $0,01 \text{ A/m}^2$  observés sur les CAs pour les électrodes de contrôle et de  $0,02 \text{ A/m}^2$  pour les électrodes maintenues 3 heures en OC se retrouvent à l'identique sur les CVs (Figure 5.3). Ces décalages s'expliquent par un paramétrage inapproprié de la gamme de courant sur le potentiostat.

La période de 3 heures en circuit ouvert est insuffisante pour observer une quelconque différence significative comparée aux contrôles. Elle a été portée à 48 heures pour l'essai suivant. De plus, les gammes de mesure du courant et du potentiel ont été adaptées sur le potentiostat (I range : 1 mA et E range : -1 V ; +1 V) pour obtenir des mesures plus fiables et précises.

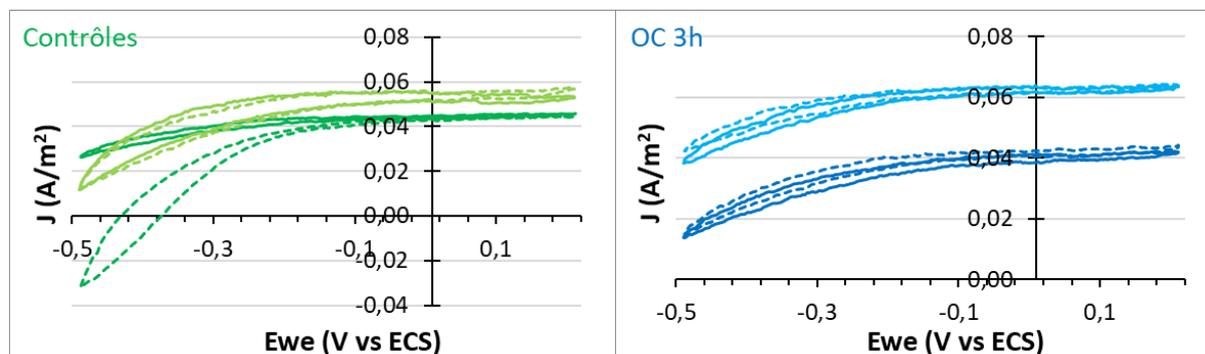


Figure 5.3 : Essai n°1 - CVs (trait pointillé) avant et (trait plein) après 3 heures de polarisation à -0,2 V vs ECS des électrodes ayant passé 3 minutes (contrôle) ou 3 heures en OC (duplicats). Vitesse de balayage 1 mV/s entre -0,5 et +0,2 V vs ECS.

## 2.3 Essai 2 : 48 heures en circuit ouvert

La période en OC de 48 heures permet d'observer une évolution progressive du potentiel en circuit ouvert de  $0,07 \pm 0,01$  à  $-0,40 \pm 0,09$  V vs ECS (Figure 5.4). Pendant les 3 heures de CA à -0,2 V vs ECS, malgré des courants restant très faibles, les électrodes ayant passé 48 heures en OC présentent une densité de courant finale de  $0,01 \pm 0,00$  A/m<sup>2</sup> en oxydation, alors que le courant des contrôles reste légèrement négatif (Figure 5.5). Les duplicats présentent des valeurs de courant similaires, le choix de la nouvelle gamme de mesure du courant sur le potentiostat est donc approprié. Les CVs confirment l'intérêt de rallonger la période en OC (Figure 5.6). Le potentiel de démarrage du courant anodique (potentiel à partir duquel le courant est positif sur la CV) est plus bas pour les électrodes ayant passé 48 heures en OC, avec une valeur de  $-0,24 \pm 0,07$  V vs ECS contre  $-0,06 \pm 0,21$  V vs ECS pour les contrôles.

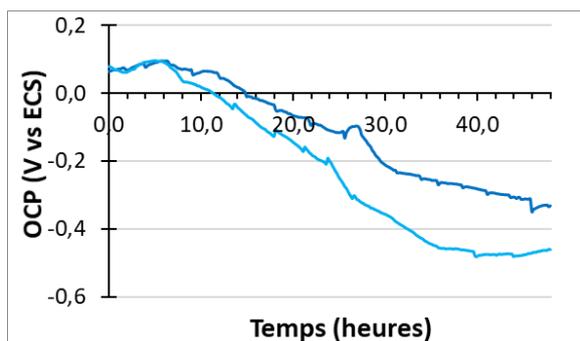


Figure 5.4 : Essai n°2 - 48 heures en OC. Suivi de l'OCP en fonction du temps (duplicats).

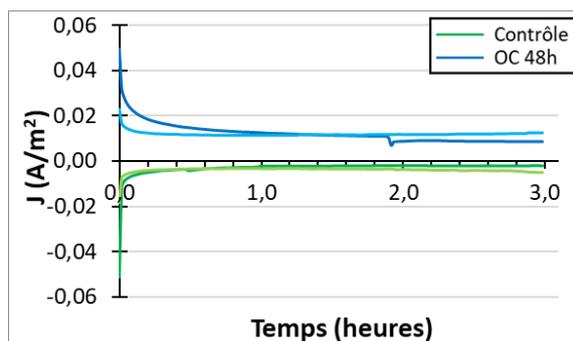


Figure 5.5 : Essai n°2 - CAs à -0,2 V vs ECS après 3 minutes (contrôle) ou 48 heures en OC (duplicats pour chaque condition).

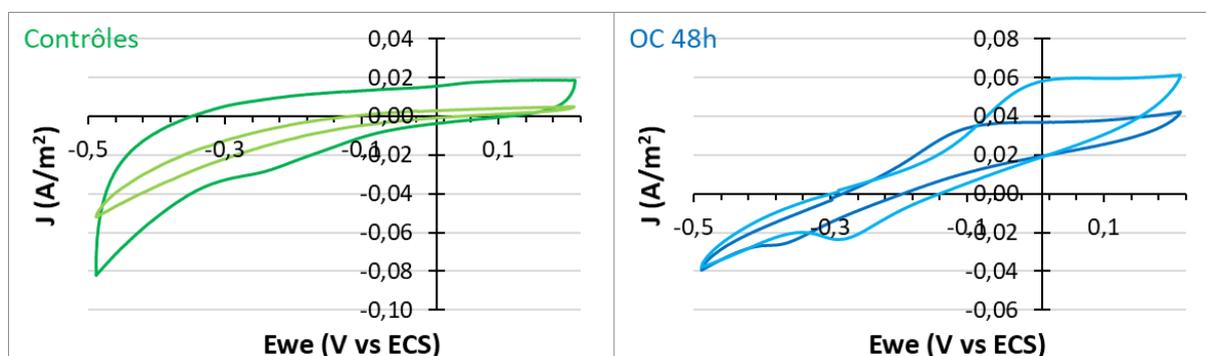


Figure 5.6 : Essai n°2 - CVs après 3 heures de polarisation à -0,2 V vs ECS des électrodes ayant passé 3 minutes (contrôle) ou 48 heures en OC (duplicats). Vitesse de balayage 1 mV/s entre -0,5 et +0,2 V vs ECS.

## 2.4 Essai 3 : 1 à 8 jours en circuit ouvert

Les résultats précédents étant encourageants, des durées en OC de 1, 2, 4, 6 et 8 jours sont testées selon le même protocole. Les mesures d'OCP montrent une diminution du potentiel en circuit ouvert, d'une valeur initiale de  $0,18 \pm 0,03$  V vs ECS jusqu'à une valeur stable de  $-0,40 \pm 0,06$  V vs ECS atteinte au bout de deux jours (Figure 5.7). L'électrode qui a passé 8 jours en OC a eu un comportement singulier visible dès la fin du premier jour : le potentiel qui évoluait comme pour les autres électrodes le premier jour remonte ensuite à des valeurs positives, puis se stabilise à  $-0,08$  V vs ECS jusqu'à la fin de l'essai. Il est fort probable qu'il y ait eu une entrée d'air dans le réacteur.

Les CAs indiquent que la durée en OC de 1 jour est insuffisante pour catalyser la réaction d'oxydation car le courant est nul, comme dans les réacteurs de contrôle (Figure 5.8). Il y a bien eu un problème dans le réacteur maintenu 8 jours en OC car le courant négatif ( $-0,02 \text{ A/m}^2$ ) indique l'hégémonie de la réaction de réduction, très certainement la réduction de l'oxygène. Pour les trois autres électrodes, le courant augmente avec la durée en OC. Les valeurs finales sont de 0,04, 0,05 et 0,06  $\text{A/m}^2$  pour des durées en OC de 2, 3 et 6 jours. Les courbes n'ont pas la même allure. Le courant augmente progressivement tout au long des 3 heures de CA après 2 et 3 jours en OC, alors qu'il se stabilise très rapidement après 6 jours en OC.

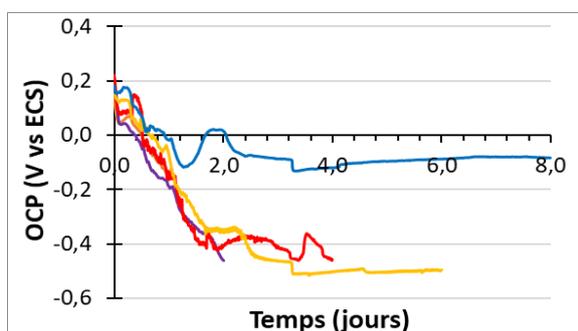


Figure 5.7 : Essai n°3 - 1 à 8 jours en OC. Suivi de l'OCP en fonction du temps.

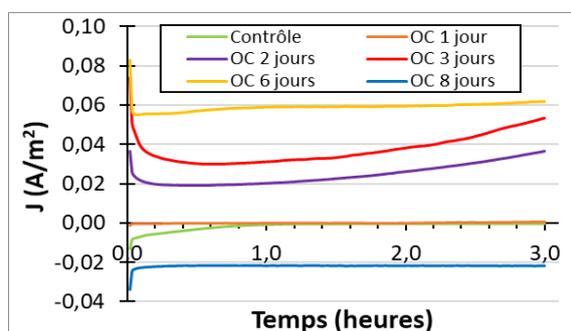


Figure 5.8 : Essai n°3 - CAs à  $-0,2 \text{ V vs ECS}$  après 3 minutes (contrôle) à 8 jours en OC.

Sur les CVs, les électrodes de contrôle et celles maintenues 1 jour en OC ont le même comportement, avec un courant anodique qui démarre à  $-0,20 \pm 0,09 \text{ V vs ECS}$  mais qui reste proche de 0 (Figure 5.9). Le potentiel auquel débute le courant anodique est plus faible après 2, 3 et 6 jours en OC avec une valeur moyenne de  $-0,41 \pm 0,09 \text{ V vs ECS}$ . Une durée de 2 à 6 jours en OC permet donc de former les prémices d'un biofilm favorisant l'oxydation de l'acétate.

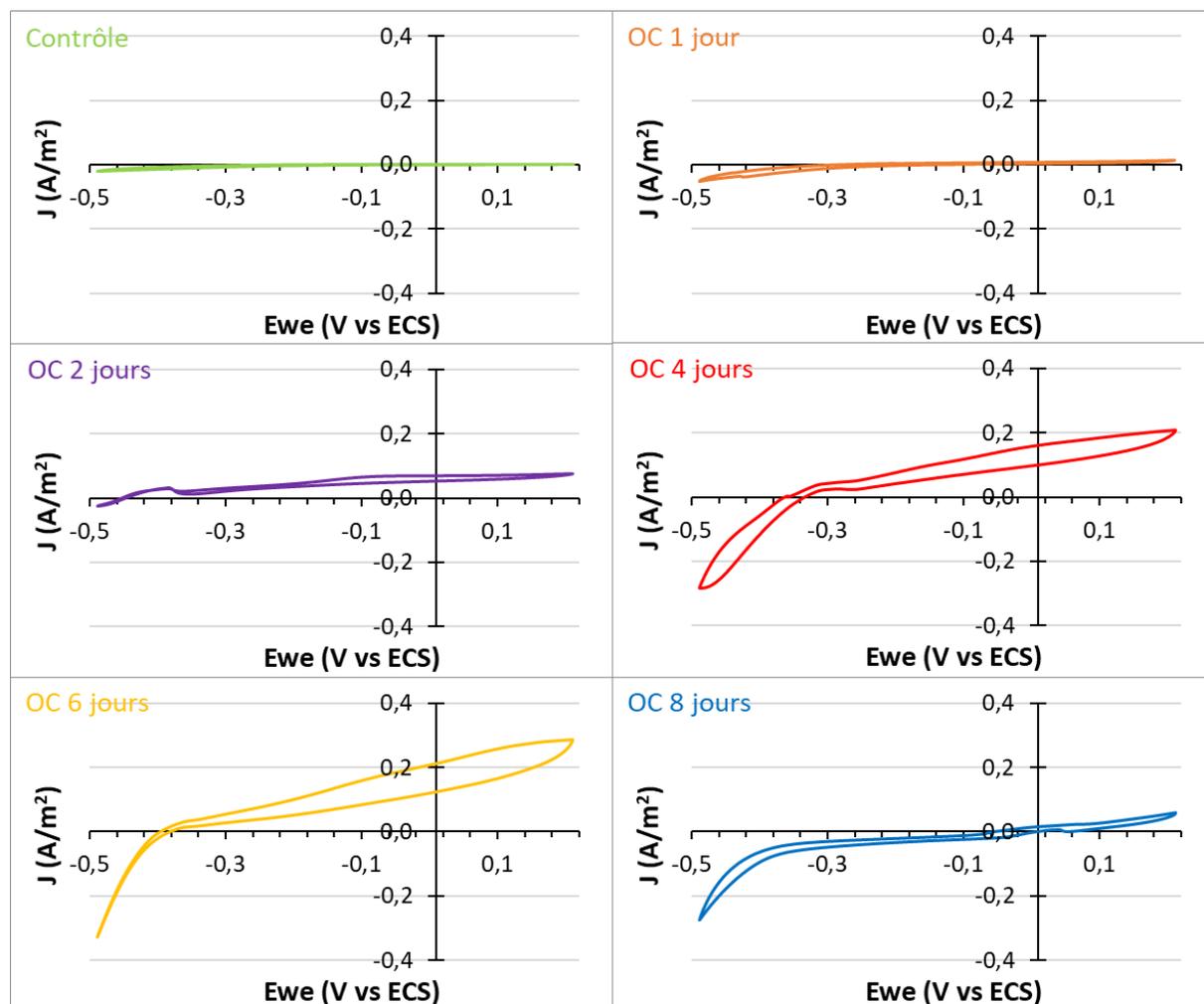


Figure 5.9 : Essai n°3 - CVs après 3 heures de polarisation à  $-0,2$  V vs ECS des électrodes ayant passé 3 minutes (contrôle) à 8 jours en OC. Vitesse de balayage  $1$  mV/s entre  $-0,5$  et  $+0,2$  V vs ECS.

## 2.5 Essai 4 : 2 à 8 jours en circuit ouvert

Pour ce quatrième essai, seules les durées en OC de 2, 3, 6 et 8 jours sont conservées. Le protocole est légèrement modifié par rapport aux essais précédents. A la fin de la période en OC, la concentration en acétate est mesurée et réajustée à  $20$  mM. L'électrode maintenue 8 jours en OC semble avoir eu le même problème que précédemment, un peu avant la fin du jour 2 (Figure 5.10). Le temps nécessaire à la stabilisation de l'OCP semble un peu plus variable que pour l'essai précédent. Le potentiel libre de l'électrode ne s'est pas complètement stabilisé après 2 jours.

Les électrodes ayant passé 3 et 6 jours en OC ont des potentiels qui se stabilisent respectivement à  $-0,51 \pm 0,01$  V vs ECS au bout de 1,5 jour et à  $-0,49 \pm 0,02$  V vs ECS au bout

de 3 jours. Pour l'électrode maintenue 3 jours en OC, une hausse du potentiel est visible à la toute fin de la période. Elle pourrait correspondre à une entrée d'air dans le réacteur lors du prélèvement pour le dosage de l'acétate ou lors du réajustement de sa concentration.

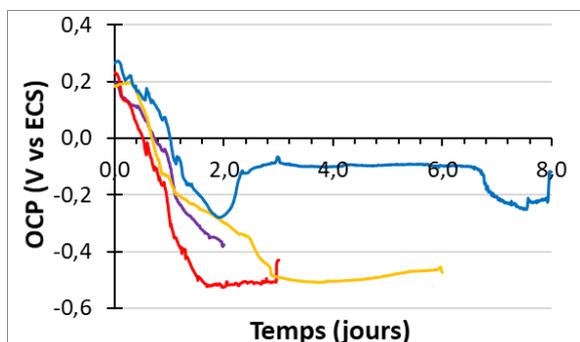


Figure 5.10 : Essai n°4 - 2 à 8 jours en OC. Suivi de l'OCP en fonction du temps.

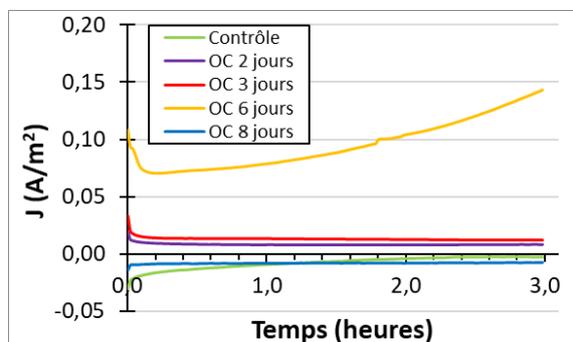


Figure 5.11 : Essai n°4 - CAs à -0,2 V vs ECS après 3 minutes (contrôle) à 8 jours en OC.

La densité de courant est nulle pour l'électrode de contrôle et celle maintenue 8 jours en OC (Figure 5.11 & Tableau 5.2). Pour les électrodes qui ont passé 2 et 3 jours en OC, la densité de courant reste très faible avec une valeur finale de 0,01 A/m<sup>2</sup>. L'électrode qui présente la densité de courant la plus importante est, une nouvelle fois, celle qui a été maintenue 6 jours en OC. Celle-ci génère une densité de courant croissante, qui atteint une valeur finale de 0,14 A/m<sup>2</sup>, soit une densité de courant 2,4 fois plus importante que lors de l'essai précédent.

La densité de courant finale J, la concentration en acétate après la période en OC, le pH final ainsi que le potentiel de démarrage du courant anodique, extraits de la Figure 5.12, sont présentés dans le Tableau 5.2.

L'électrode de contrôle est celle qui catalyse le moins la réaction d'oxydation avec un courant très légèrement anodique qui débute à  $-0,01 \pm 0,05$  V vs ECS mais reste très faible sur toute la gamme des potentiels. Pour les électrodes qui ont passé 2 à 6 jours en OC, le potentiel de début de courant anodique décroît lorsque la durée augmente. L'augmentation de la durée en OC jusqu'à 6 jours a permis un démarrage de l'oxydation à des potentiels plus faibles et donc une catalyse de la réaction d'oxydation. L'électrode qui a passé 8 jours en OC, qui a manifestement subi un problème technique, délivre un courant anodique très faible et donne un potentiel de début de courant anodique plus élevé.

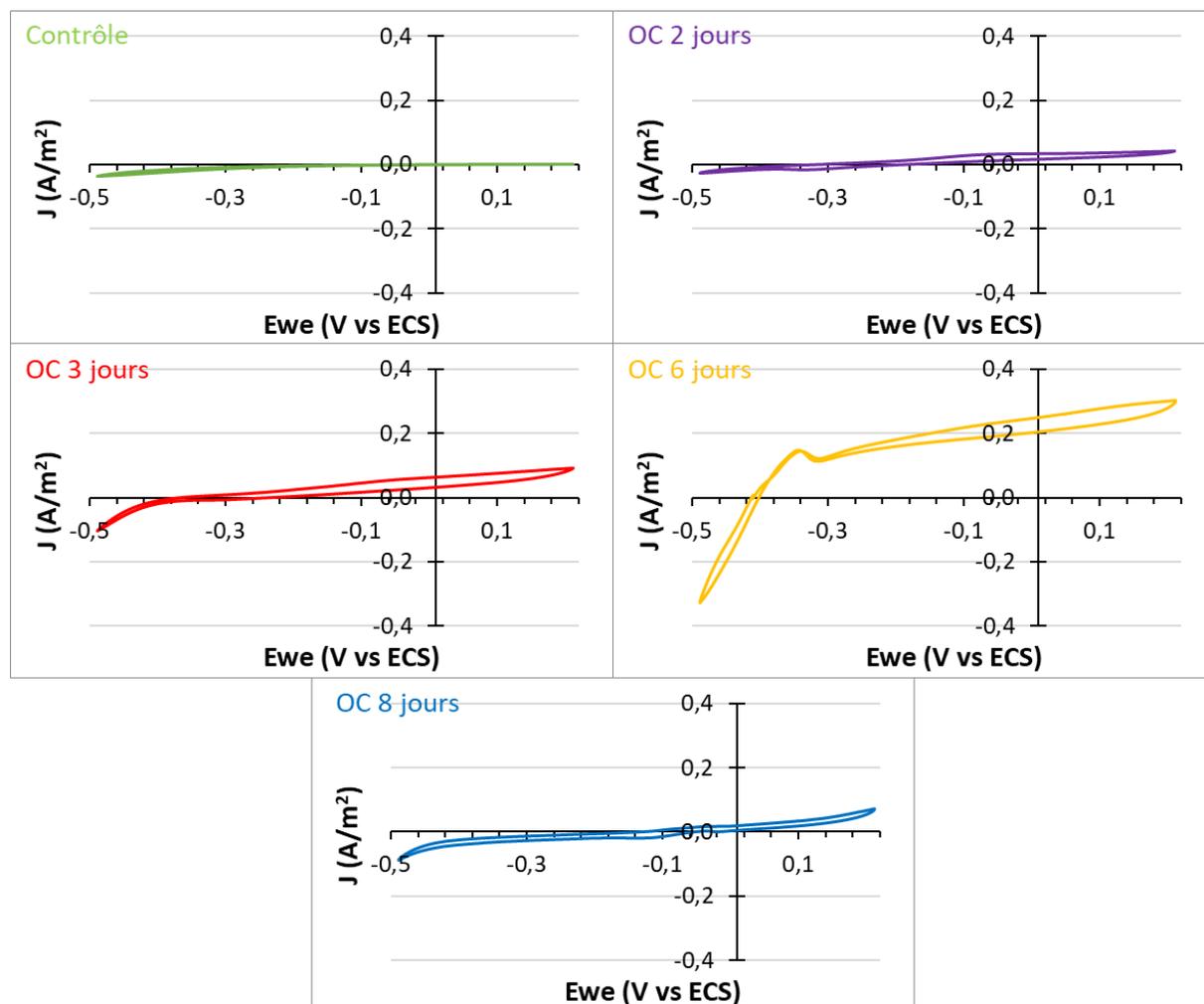


Figure 5.12 : Essai n°4 - CVs après 3 heures de polarisation à  $-0,2$  V vs ECS des électrodes ayant passé 3 minutes (contrôle) à 8 jours en OC. Vitesse de balayage  $1$  mV/s entre  $-0,5$  et  $+0,2$  V vs ECS.

Tableau 5.2 : Essai n°4 - Valeurs de  $J$ , concentration en acétate, pH et  $E$  caractéristiques des électrodes ayant passé 3 minutes (contrôle) à 8 jours en OC.

Temps en OCP	$J$ finale ( $A/m^2$ )	Acétate après OC (mM)	pH final	$E$ de démarrage du courant anodique (V vs ECS)
Contrôle	0,00	20	8,87	$-0,01 \pm 0,05$
2 jours	0,01	2,2	7,98	$-0,27 \pm 0,09$
3 jours	0,01	3,4	7,41	$-0,32 \pm 0,10$
6 jours	0,14	0,0	7,39	$-0,42 \pm 0,01$
8 jours	$-0,01$	0,0	7,40	$-0,10 \pm 0,06$

La concentration en acétate dans le réacteur de contrôle est égale à la concentration initiale (20 mM) puisque celui-ci ne passe que 3 minutes en OC (Tableau 5.2). Pour les autres réacteurs, l'acétate a été consommé rapidement. En effet, après 2 et 3 jours en OC, la concentration n'est que de 2,2 et 3,4 mM, respectivement. Au bout de 6 et 8 jours, l'acétate est complètement consommé.

La consommation d'acétate peut avoir lieu via différents processus microbiens dont le métabolisme respiratoire ou la méthanogénèse en anaérobiose. Dans un système électro-microbien, l'acétate peut être oxydé par les bactéries électroactives et les électrons transmis à l'électrode, mais ce processus ne peut pas être évoqué ici, en circuit ouvert. Il est probable qu'il y ait eu des entrées parasites d'oxygène, qui a activé la consommation d'acétate par les bactéries aérobies. Le potentiel de l'électrode est très sensible à la concentration de l'oxygène dissout. Son augmentation peut être directement corrélée à la diminution de la concentration d'oxygène dissout et sa remontée peut indiquer une entrée d'oxygène dans le réacteur.

Le pH final du contrôle est de 8,87 alors qu'à partir de 3 jours en OC le pH final est de  $7,40 \pm 0,01$ . Les mesures de pH montrent une acidification au cours de la période en OC, qui irait dans le sens d'une digestion anaérobie de la matière organique contenue dans le lixiviat ou d'une production de  $\text{CO}_2$  à partir de l'acétate via le métabolisme respiratoire.

## **2.6 Essai 5 : 2 à 8 jours en circuit ouvert - bis**

Pour le cinquième et dernier essai de cette série, les durées en OC sont les mêmes que pour l'essai précédent : 3 minutes pour le contrôle, 2, 3, 6 et 8 jours pour les autres. L'acétate est également ajusté à 20 mM à la fin de la période en OC. Un réacteur avec un milieu abiotique et passant 6 jours en OC est ajouté pour déterminer l'influence de la présence de microorganismes en solution sur la catalyse de l'oxydation. Ce milieu est réalisé avec du lixiviat de terreau préalablement autoclavé. De plus, comme pour le premier essai, une CV est réalisée avant la polarisation, pour évaluer l'influence éventuelle des trois heures de polarisation.

Le potentiel de l'électrode maintenue 8 jours en OC est une nouvelle fois remonté pour se stabiliser à -0,11 V vs ECS à partir du jour 2 (Figure 5.13). Il semble encore une fois y avoir eu une entrée d'air. Il est possible que le même réacteur ait été utilisé pour ces trois essais successifs et que le bouchon de celui-ci n'était pas étanche. Les électrodes qui passent 2, 3 et 6 jours en OC ont le même comportement avec un potentiel final de -0,45 pour les deux premiers et -0,50 V vs ECS pour le troisième. Le potentiel de l'électrode dans le milieu

abiotique se stabilise à  $-0,20$  V vs ECS jusqu'au jour 1,5, puis il diminue à nouveau jusqu'à atteindre le même niveau que les autres à  $-0,45$  V vs ECS. Ce phénomène pourrait être dû au développement non désiré de bactéries dans le réacteur après une phase de latence liée à l'absence d'inoculum initial. Si des spores ont résisté à l'autoclavage, des bactéries ont pu se développer après un temps de latence. A la toute fin, le potentiel remonte à  $-0,30$  V vs ECS, sans doute à cause d'une entrée d'air lors du prélèvement de milieu pour la mesure de la concentration en acétate.

Malgré les OCP encourageants, seuls deux électrodes ont donné des courants anodiques significativement différents des contrôles. Les électrodes maintenues 3 et 6 jours en OC donnent des densités de courants finales faibles mais croissantes, respectivement de  $0,08$  et  $0,06$  A/m<sup>2</sup> (Figure 5.14). Toutes les autres électrodes ont des valeurs finales comprises entre  $0,00$  et  $0,01$  A/m<sup>2</sup>.

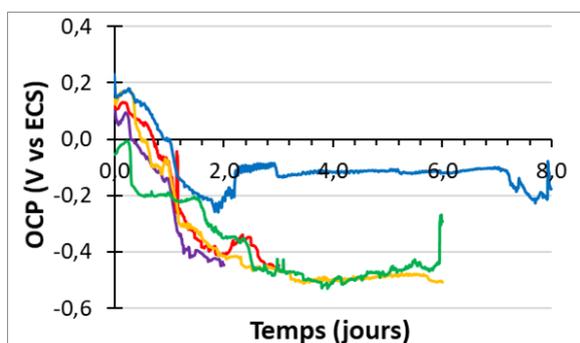


Figure 5.13 : Essai n°5 - 2 à 8 jours en OC. Suivi de l'OCP en fonction du temps.

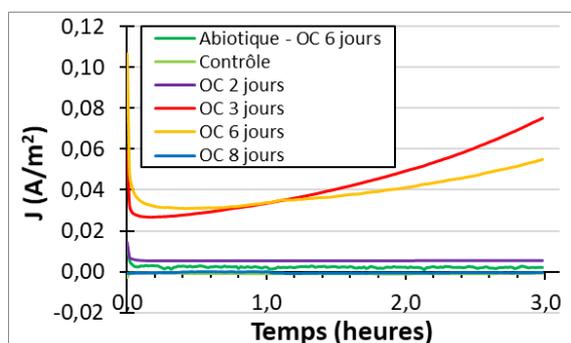


Figure 5.14 : Essai n°5 - CAs à  $-0,2$  V vs ECS après 3 minutes (contrôle) à 8 jours en OC.

Des CVs sont réalisées avant et après les 3 heures de polarisation (Figure 5.15 & Tableau 5.3) de la même façon que pour le premier essai. Après polarisation, le potentiel à partir duquel un courant d'oxydation est observable diminue de  $0,08$  V par rapport à la valeur avant polarisation pour l'électrode ayant passé 3 jours en OC. Il s'agit de la variation la plus importante et elle n'est pas significative. La constatation faite pour l'essai n°1 est donc validée, les trois heures de polarisation sont une bonne méthode d'évaluation qui n'influence pas les propriétés électrocatalytiques de l'électrode.

Les valeurs après polarisation sont similaires à celles obtenues pour l'essai précédent (essai n°4) avec un potentiel de début d'oxydation à  $-0,43 \pm 0,01$  et  $-0,42 \pm 0,01$  V vs ECS pour les deux électrodes qui ont donné des courants d'oxydation significatifs, après 3 et 6 jours en

OC (Tableau 5.3). L'électrode en milieu abiotique qui a passé 6 jours en OC et l'électrode qui a passé 2 jours en OC présentent des valeurs de début d'oxydation proches de  $-0,24 \pm 0,14$  et  $-0,29 \pm 0,12$  V vs ECS, respectivement. Cette similarité tend à confirmer l'hypothèse d'un développement bactérien tardif dans le réacteur abiotique. Enfin, logiquement, le contrôle présente un potentiel de début d'oxydation beaucoup plus élevé.

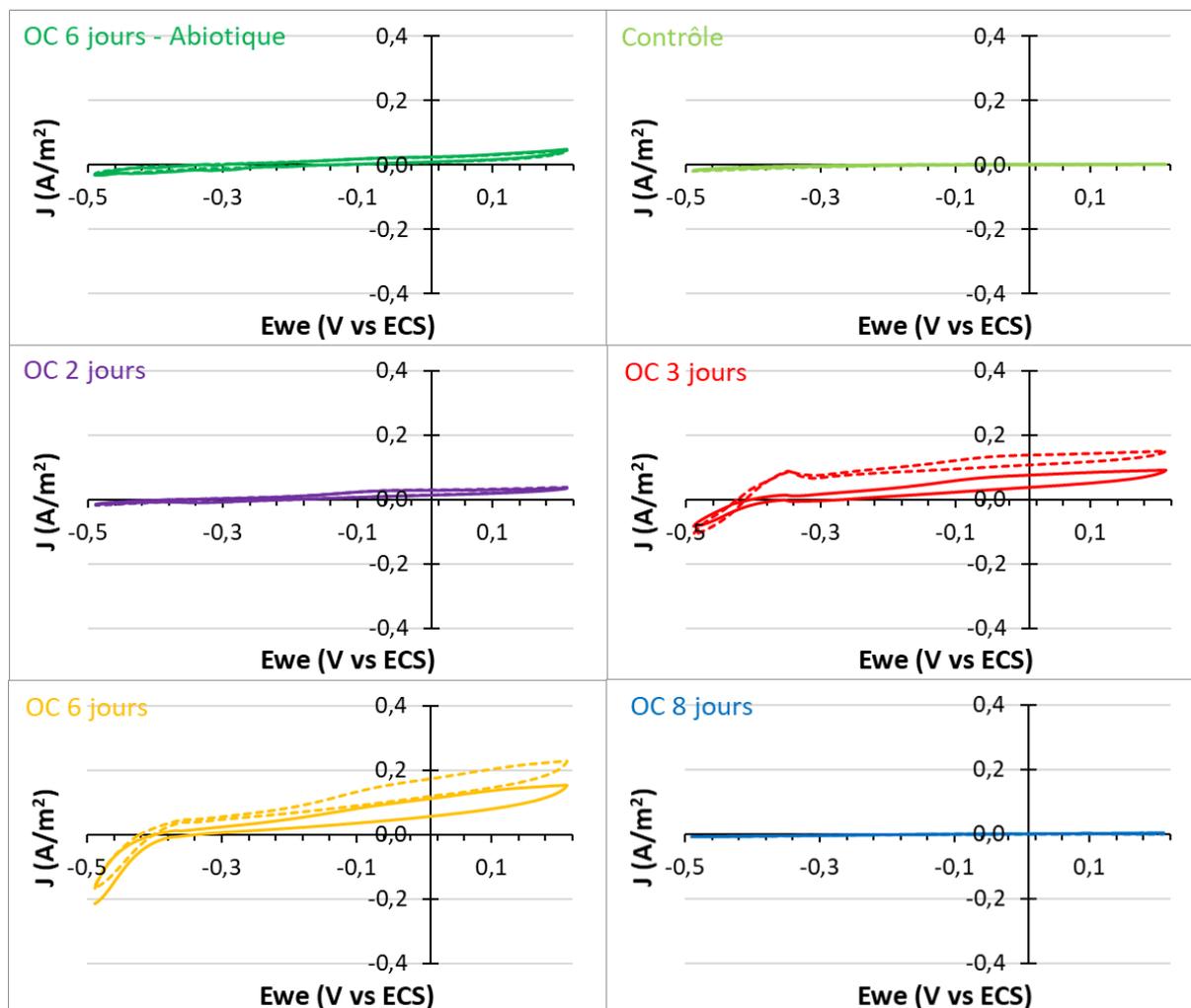


Figure 5.15 : Essai n°5 - CVs avant (trait pointillé) et après (trait plein) 3 heures de polarisation à  $-0,2$  V vs ECS des électrodes ayant passé 3 minutes (contrôle) à 8 jours en OC. Vitesse de balayage  $1$  mV/s entre  $-0,5$  et  $+0,2$  V vs ECS.

Le réacteur abiotique n'est pas supplémenté en acétate. Le contrôle, qui n'a passé que 3 minutes en OC, présente une concentration identique à la concentration initiale. Il faut avouer que la mesure a été oubliée pour le réacteur dont l'électrode a passé 8 jours en OC, mais l'erreur est mineure car celui-ci n'a de toute façon pas fonctionné. Les réacteurs dont l'électrode est maintenue 2 et 3 jours en OC présentent des concentrations finales similaires

de 3,6 et 3,3 mM respectivement. Enfin, au bout de 6 jours en OC, la concentration est une nouvelle fois proche de 0. Ces valeurs sont similaires à celles obtenues lors de l'essai n°4. Le pH final du milieu abiotique, d'une valeur de 8,79, est plus haut que celui des milieux avec inoculum, compris entre 7,46 et 7,64. Dans le réacteur abiotique, aucune activité n'a eu lieu, le pH reste très élevé, similaire au contrôle de l'essai précédent. Étonnamment, le contrôle présente ici un pH similaire aux autres réacteurs. La variation de pH n'est donc pas liée aux réactions anodiques d'oxydation.

Tableau 5.3 : Essai n°5 – Valeurs de  $J$ ,  $E$ , concentration en acétate et pH caractéristiques des électrodes ayant passé 3 minutes (contrôle) à 8 jours en OC.

Temps en OCP	$E_1$ de démarrage du courant anodique (V vs ECS)	$J$ finale ( $A/m^2$ )	Acétate après OCP (mM)	pH final	$E_2$ de démarrage du courant anodique (V vs ECS)
Abiotique	-0,23 ±0,11	0,00	-	8,79	-0,24 ±0,14
Contrôle	-0,12 ±0,10	0,00	20	7,46	-0,12 ±0,09
2 jours	-0,31 ±0,12	0,01	3,6	7,62	-0,29 ±0,12
3 jours	-0,35 ±0,10	0,08	3,3	7,46	-0,43 ±0,01
6 jours	-0,38 ±0,04	0,06	0,7	7,58	-0,42 ±0,01
8 jours	-0,17 ±0,01	0,00	-	7,64	-0,14 ±0,01

$E_1$  : Avant les 3 h de polarisation à -0,2 V vs ECS

$E_2$  : Après les 3 h de polarisation à -0,2 V vs ECS

## 2.7 Conclusion

Ces cinq essais successifs ont permis de déterminer la durée minimale nécessaire en circuit ouvert pour obtenir une anode microbienne capable d'oxyder l'acétate (Figure 5.16). Les résultats de l'essai 1 n'est pas reporté sur la Figure 5.16 car l'acquisition des résultats a été biaisée, les gammes de courant et de potentiel n'étaient pas assez précises pour avoir des mesures pertinentes. Aucune des 3 électrodes maintenues 8 jours en OC n'a donné lieu à un comportement pertinent. Il est probable que ce problème soit dû au réacteur utilisé dont le bouchon n'était pas étanche. Les durées en OC de 2 jours ou moins sont insuffisantes pour observer un impact significatif sur les courants. Les meilleures performances anodiques sont

obtenues pour des durées en OC allant de 3 à 6 jours, avec une valeur maximale de  $0,14 \text{ A/m}^2$  à  $-0,2 \text{ V}$  vs ECS après 6 jours en OC lors de l'essai n°4. Il faut cependant souligner la faible reproductibilité des essais puisque pour l'électrode ayant passé 6 jours en OC la densité de courant varie du simple au double ( $0,06$  à  $0,14 \text{ A/m}^2$ ).

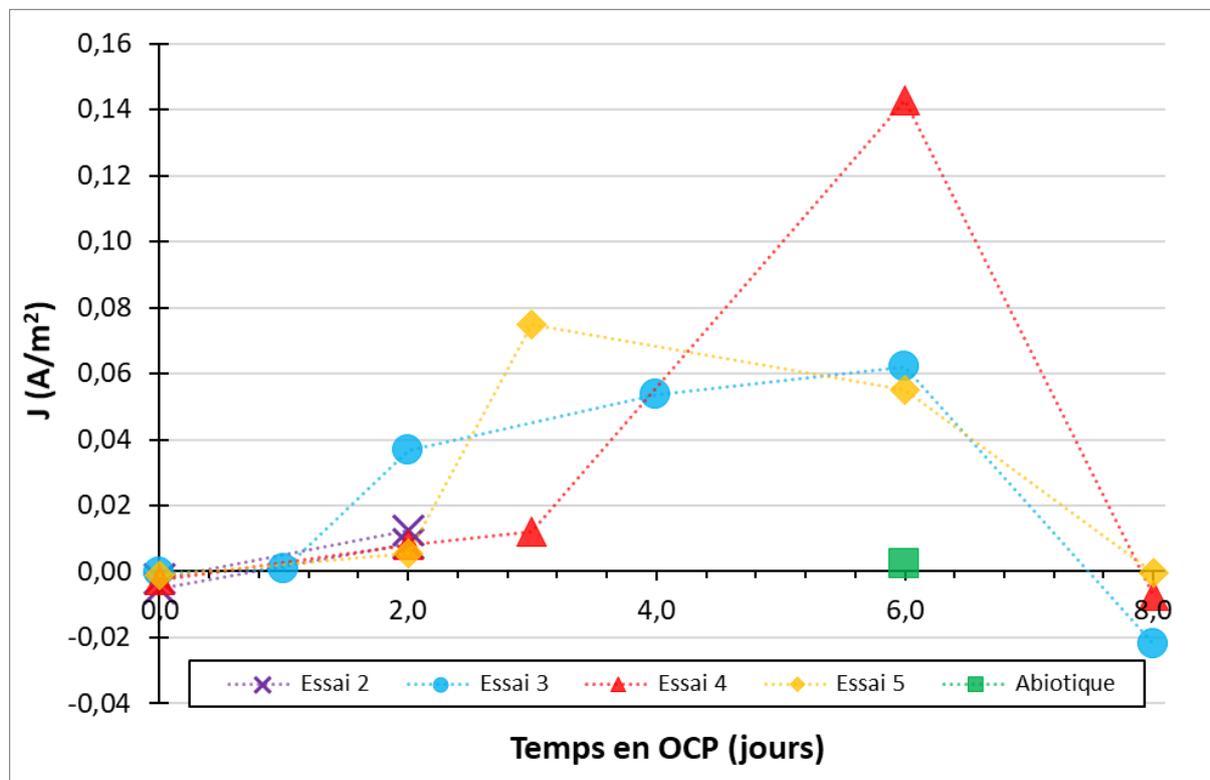


Figure 5.16 : Densité de courant finale à  $-0,2 \text{ V}$  vs ECS en fonction de la durée en OC (essais 2 à 5).

Le potentiel de démarrage du courant anodique suit la même tendance avec un potentiel minimum aux alentours de  $-0,4 \text{ V}$  vs ECS pour les électrodes ayant passé 3 à 6 jours en OC alors que sa valeur est supérieure à  $-0,2 \text{ V}$  vs ECS pour les autres électrodes, y compris les contrôles. Tous ces résultats permettent d'arriver à la conclusion qu'une durée en OC de 6 jours semble être le minimum pour s'assurer de la formation d'une anode capable d'oxyder l'acétate.

### 3 Electrode capillaire en milieu synthétique

Cette partie porte sur la cathode capillaire émergée de réduction de l'oxygène. Cette configuration permet un accès facilité de l'oxygène tout en maintenant l'apport en substrat vers

le biofilm et les échanges ioniques indispensables à l'activité électrochimique grâce à la capillarité de l'électrode.

Les propriétés d'une cathode capillaire émergée sont étudiées en milieu synthétique aux travers des cinq essais suivants. L'objectif d'avoir une cathode de réduction de l'oxygène active sur la hauteur la plus importante possible. Deux tailles d'électrodes sont testées : de petites électrodes d'une surface de 4 cm<sup>2</sup> (4x1 cm) qui sont entièrement immergées juste sous la surface de la solution, et de grandes électrodes d'une surface de 80 cm<sup>2</sup> (4x20 cm) dont seulement 1 cm est immergé et 19 cm sont émergés au-dessus de la surface de la solution. L'objectif est d'avoir la même surface d'électrode immergée afin d'évaluer le gain apporté par la partie émergée. La surface projetée de l'électrode étant multipliée par 20, si toute la partie émergée participait à la réaction, le courant produit par la grande électrode pourrait être 20 fois supérieur à celui produit par la petite électrode.

La moitié des réacteurs est polarisée à -0,1 V vs ECS, et l'autre moitié n'est pas polarisée, afin de déterminer l'impact de la polarisation sur la densité de courant cathodique. Le potentiel est fixé à -0,1 V vs ECS pour se rapprocher des conditions de la cathode flottante et de l'électrode bidirectionnelle du chapitre 3. Des CVs sont enregistrées toutes les 12 heures pour suivre l'évolution de la réaction de réduction de l'oxygène. Afin de suivre l'évolution de cette réaction, les valeurs de courant pour des potentiels de -0,5 V vs ECS sont extraites des CVs.

Tous les essais sauf le dernier sont réalisés dans un tampon phosphate (10 mM, pH 7,4) dont la conductivité est ajustée à une valeur précisée à chaque essai. L'objectif est de définir l'influence de trois paramètres sur la catalyse de la réduction de l'oxygène : la durée d'une période de prétraitement consistant à laisser l'électrode immergée dans la solution, la désaération préalable de la structure poreuse du feutre, et la conductivité du milieu.

### **3.1 Conditions opératoires**

Les caractéristiques des milieux sont présentées dans les parties 1.1.2, 1.2.3 et 1.2.4 du chapitre 2 et le montage expérimental dans les parties 2.1.1 et 2.2.4 du même chapitre. Pour chacun des essais, 8 réacteurs « standards » avec un montage électrochimique à trois électrodes « électrode capillaire émergée 1 » sont mis en place. Les conditions appliquées pour chacun des 8 réacteurs sont présentées dans le Tableau 5.4.

Tableau 5.4 : Conditions expérimentales communes à l'étude de l'électrode capillaire en feutre de carbone en milieu synthétique.

Montage « électrode capillaire émergée 1 » (chapitre 2 – parties 2.1.1 et 2.2.2)								
Electrode de travail : feutre de carbone + tige en titane								
Réacteurs « standards »								
Contre électrode : Tissu de carbone circulaire + fil de platine								
Electrode de référence : ECS								
Techniques électrochimiques (chapitre 2 – parties 3.1.1 et 3.2.2)								
CA								
E = -0,1 V vs ECS								
CV								
3 cycles à 5 mV/s de -0,8 à 0,6 V vs ECS								
Réacteurs	1	2	3	4	5	6	7	8
Surface de l'électrode	4 cm <sup>2</sup>		80 cm <sup>2</sup>		4 cm <sup>2</sup>		80 cm <sup>2</sup>	
Dimensions de l'électrode	4 x 1 cm		4 x 20 cm		4 x 1 cm		4 x 20 cm	
Immersion (1 cm immergé)	Totale		partielle		Totale		partielle	
Hauteur émergée	-		19 cm		-		19 cm	
Polarisation			Oui				Non	

### 3.2 Essai 1 – Feutre sec, $\sigma = 0,2 \text{ S/m}$

Pour ce premier essai, aucun prétraitement des électrodes n'est réalisé. Les électrodes en feutre de 4 ou 80 cm<sup>2</sup> sont utilisées sans trempage préalable. L'objectif est de déterminer si le tampon phosphate peut remonter dans le feutre par capillarité et augmenter ainsi la surface active de l'électrode en feutre de carbone. Le milieu réactionnel est composé d'un tampon phosphate 10 mM, pH 7,4 ayant une conductivité ajustée à 0,2 S/m par l'ajout de KCl.

Quatre électrodes, deux de 4 cm<sup>2</sup> et deux de 80 cm<sup>2</sup>, sont polarisées à -0,1 V vs ECS pendant 6 jours (Figure 5.17). Pour les petites électrodes (Figure 5.17, bleu), les courants finaux, compris entre 0 et -0,002 mA, restent très faibles, montrant qu'il n'y a pas de réduction d'oxygène sur le feutre propre au potentiel de -0,1 V vs ECS. Un problème d'électrode de référence a entraîné des valeurs de courant aberrantes très élevées pour l'une des électrodes de 80 cm<sup>2</sup> (Figure 5.17 gauche). Pour la deuxième électrode de 80 cm<sup>2</sup>, le courant reste stable,

aux alentours de  $-0,002$  mA durant toute l'expérience. La présence de la partie émergée initialement sèche, et qui semble le rester, n'a pas d'impact sur la réduction de l'oxygène.

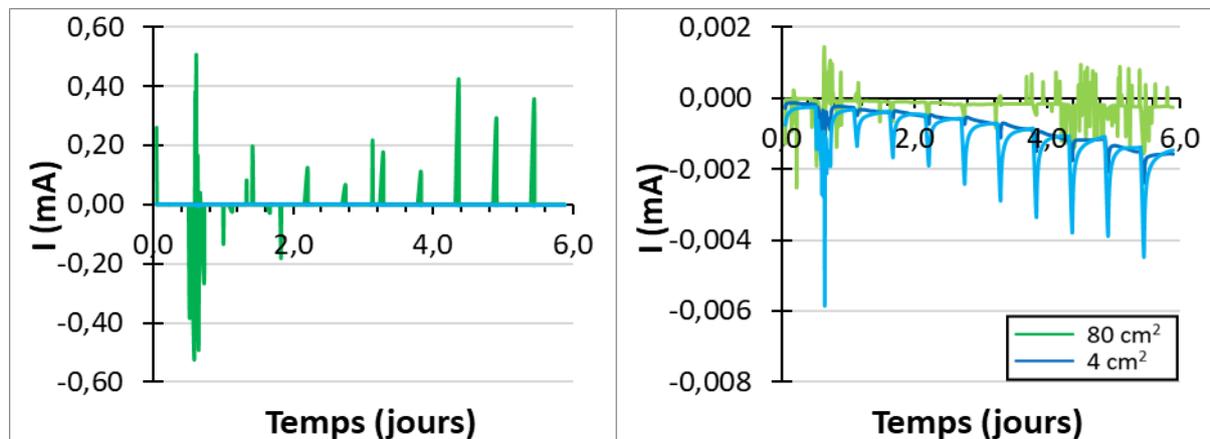


Figure 5.17 : Electrode capillaire en milieu synthétique, feutre sec,  $\sigma = 0,2$  S/m. CAs obtenues avec une polarisation à  $-0,1$  V vs ECS (duplicats pour chaque condition), (à gauche) pour les quatre électrodes et (à droite) sans l'électrode de  $80$  cm<sup>2</sup> qui donnait des valeurs aberrantes. Les pics de courant correspondent aux enregistrements des CVs.

Quatre électrodes, deux de  $4$  cm<sup>2</sup> et deux de  $80$  cm<sup>2</sup>, sont laissées en circuit ouvert et leurs OCP sont suivis pendant 6 jours (Figure 5.18). Les courbes de suivi des potentiels sont impactées par les CVs réalisées à intervalles réguliers (toutes les 12 heures) mais les valeurs de potentiel reviennent au stade initial après les 3 cycles de la CV. Le potentiel initial est proche de  $0$  V vs ECS pour toutes les électrodes. Il augmente pour toutes les électrodes mais l'augmentation est beaucoup plus importante pour les électrodes de  $80$  cm<sup>2</sup>. Le potentiel final est de  $0,43 \pm 0,01$  V vs ECS pour les électrodes de  $80$  cm<sup>2</sup> contre  $0,22 \pm 0,03$  V vs ECS pour celles de  $4$  cm<sup>2</sup>. On peut noter la bonne répétabilité de l'évolution des potentiels pour les électrodes dupliquées. Le potentiel significativement plus élevé des grandes électrodes pourrait indiquer soit une catalyse plus efficace de la réduction de l'oxygène, soit une surface active plus importante.

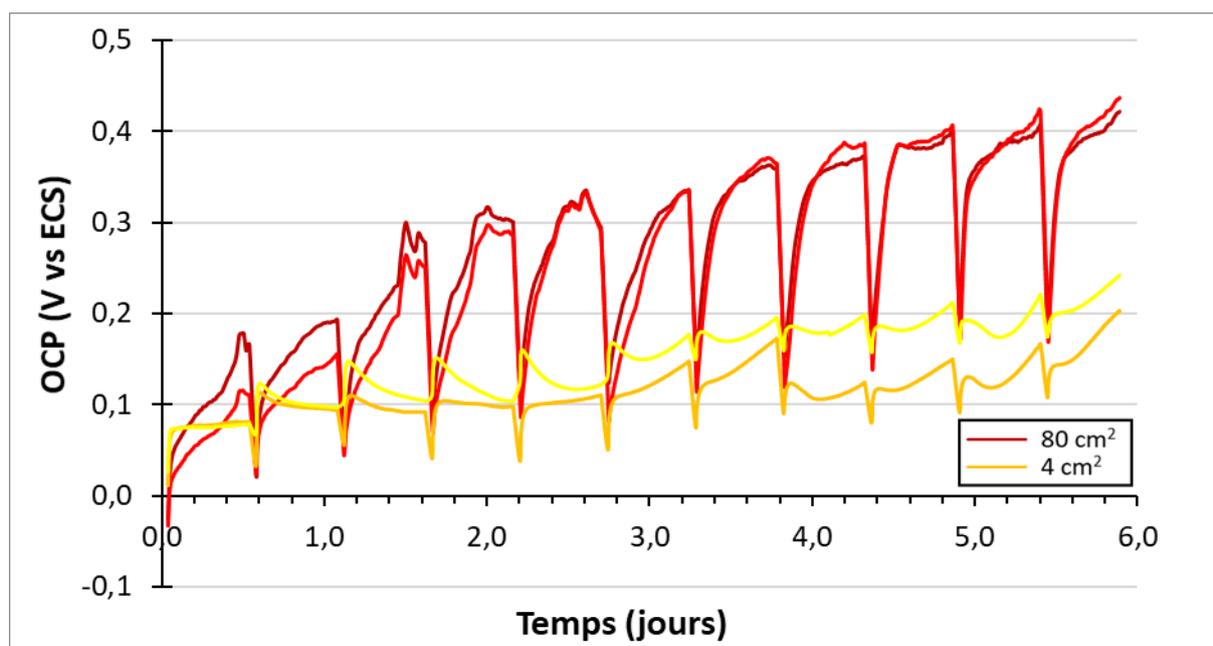


Figure 5.18 : Electrode capillaire en feutre de carbone en milieu synthétique, feutre sec,  $\sigma = 0,2 \text{ S/m}$ . Suivi de l'OCP d'électrodes en fonction du temps (duplicats).

Les CVs initiales sont toutes similaires, signe que c'est la même surface d'électrode qui travaille pour les 8 électrodes, c'est-à-dire les seuls 4 centimètres carrés immergés (Figure 5.19).

Les CVs peuvent être analysées de façon simple en extrayant pour chacune la valeur du courant au potentiel de de  $-0,5 \text{ V vs ECS}$  (Tableau 5.5). Cette valeur est choisie car elle correspond à un potentiel pour lequel la réduction de l'oxygène devrait être intense. A ce potentiel, les CVs finales exhibent des courants 3 à 9 fois plus importants que les CVs initiales, et ceci pour toutes les électrodes. Cet effet bénéfique des 6 jours de trempage est probablement dû à un gain de mouillabilité de la surface du feutre. Le feutre de carbone est initialement hydrophobe et rempli d'air or la surface active électrochimiquement est la surface accessible par l'électrolyte. La surface active augmente certainement au cours des 6 jours de trempage en raison du départ de l'air emprisonné et d'un accroissement de la mouillabilité de la surface des fibres.

En revanche, que les électrodes aient été polarisées ou non, les valeurs de courant à  $-0,5 \text{ V vs ECS}$  (Tableau 5.5) sont plus faibles pour les électrodes de  $80 \text{ cm}^2$  que pour celles de  $4 \text{ cm}^2$ . Sans tenter d'interpréter cette effet négatif de la partie émergée, nous pouvons conclure a minima que la partie émergée de la cathode, sans traitement préalable, ne permet pas d'augmenter la surface active de l'électrode.

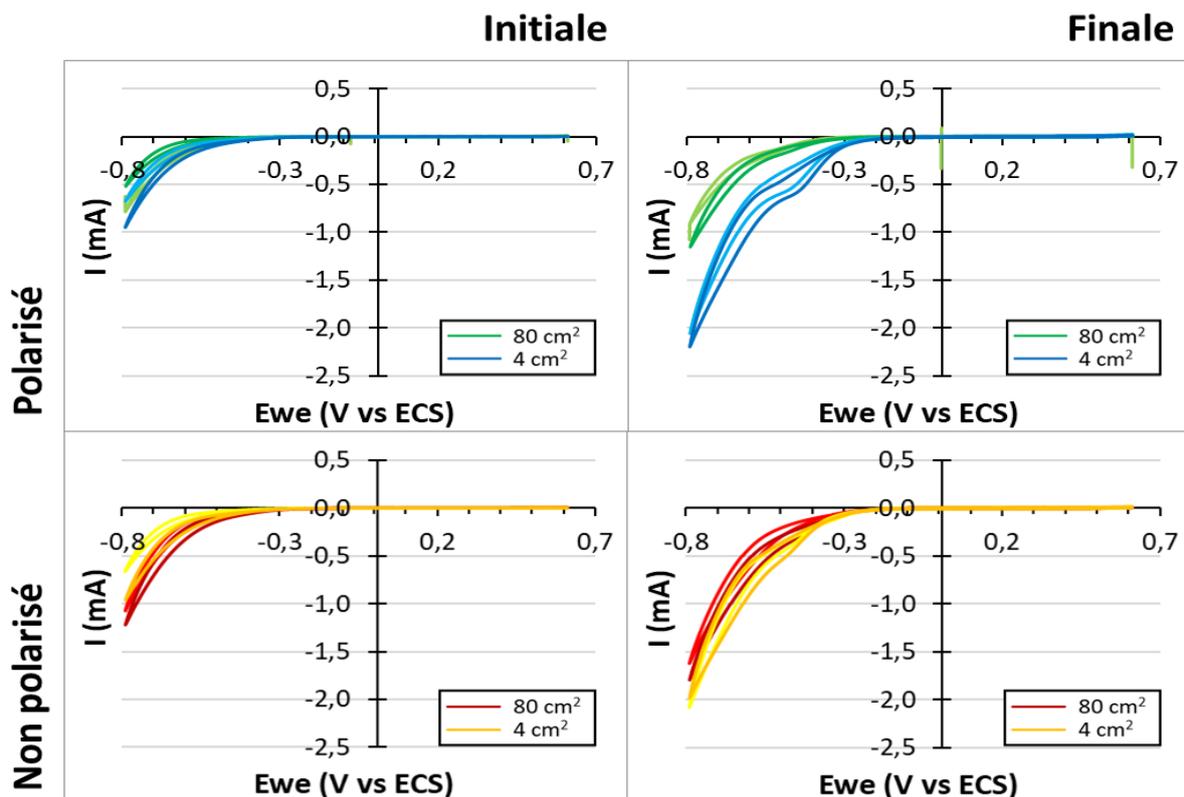


Figure 5.19 : Electrode capillaire en feutre de carbone en milieu synthétique, feutre sec,  $\sigma = 0,2 \text{ S/m}$ . CVs initiales (gauche) et finales (droite) des électrodes polarisées (haut) et non polarisées (bas) en duplicats. Vitesse de balayage de  $5 \text{ mV/s}$  entre  $-0,8$  et  $+0,6 \text{ V vs ECS}$ .

Tableau 5.5 : Electrode capillaire en feutre de carbone en milieu synthétique, feutre sec,  $\sigma = 0,2 \text{ S/m}$ . Courants (mA) au potentiel de  $-0,5 \text{ V vs ECS}$  sur les CVs initiales et finales.

Surface de l'électrode	Courant (mA) au potentiel de $-0,5 \text{ V vs ECS}$			
	Polarisés		Non polarisés	
	Initial	Final	Initial	Final
$4 \text{ cm}^2$	$-0,06 \pm 0,02$	$-0,51 \pm 0,13$	$-0,06 \pm 0,03$	$-0,42 \pm 0,08$
$80 \text{ cm}^2$	$-0,04 \pm 0,03$	$-0,13 \pm 0,03$	$-0,09 \pm 0,03$	$-0,29 \pm 0,08$
Ratio $80 \text{ cm}^2 / 4 \text{ cm}^2$	x 0,7	x 0,3	x 1,5	x 0,7

L'observation macroscopique des électrodes de 80 cm<sup>2</sup> à la fin de l'essai (Figure 5.20) montre que la partie immergée est mouillée mais que l'électrolyte ne remonte pas par capillarité dans le feutre émergé qui reste sec. Le caractère hydrophobe du feutre de carbone empêche le phénomène de capillarité qui augmenterait la surface active de l'électrode.

Pour pallier ce problème une étape préliminaire de trempage de la totalité de l'électrode est ajoutée au protocole afin d'initier les phénomènes de capillarités.



Figure 5.20 : Photographies du feutre à la fin de l'essai.

### 3.3 Essai 2 – Feutre trempé 24 heures, $\sigma = 0,2$ S/m

Le feutre est préalablement trempé pendant 24 heures dans une solution de tampon phosphate 10 mM, pH 7,4 dont la conductivité est ajustée à 0,2 S/m, avant de reprendre le protocole suivi pour l'essai 1. Tous les paramètres sont identiques à l'essai précédent.

Cet essai confirme la difficulté de polariser les grandes électrodes, avec des courbes de CA présentant beaucoup de bruit (Figure 5.21 gauche). Les valeurs finales de courant sont de  $-0,005 \pm 0,001$  mA pour les petites électrodes contre  $-0,007 \pm 0,003$  pour les grandes. Ces courants restent très faibles car la réduction de l'oxygène est très lente au potentiel de  $-0,1$  V vs ECS, mais ils sont tout de même 2 à 3 plus importants que ceux de l'essai 1.

Pour les électrodes non polarisées, la mesure de l'OCP donne une variation similaire à celle du premier essai avec un potentiel moyen de  $0,47 \pm 0,12$  V vs ECS pour les grandes électrodes et  $0,19 \pm 0,03$  V vs ECS pour les petites (Figure 5.21 droite).

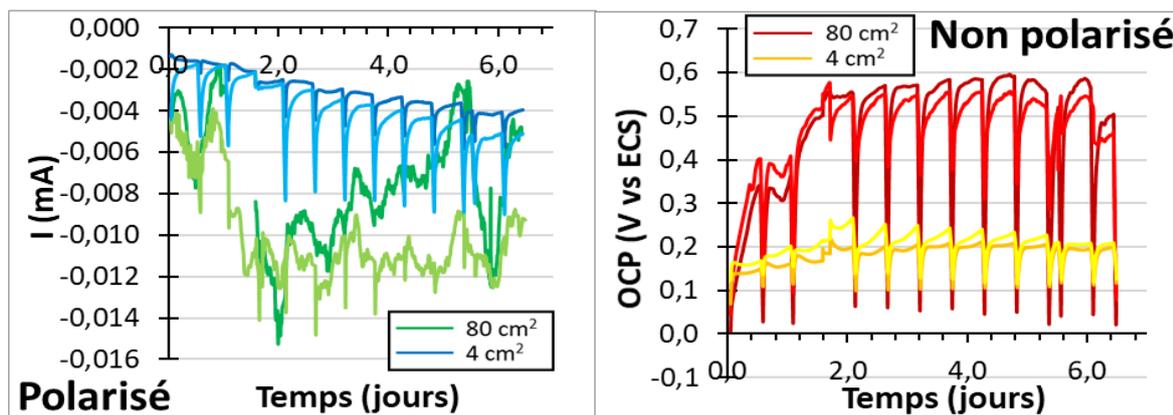
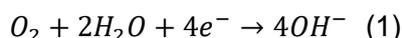


Figure 5.21 : Electrode capillaire en feutre de carbone en milieu synthétique, feutre trempé 24 heures,  $\sigma = 0,2 \text{ S/m}$ . (A gauche) CAs obtenues avec une polarisation à  $-0,1 \text{ V vs ECS}$  et (à droite) Suivi de l'OCP en fonction du temps dans les réacteurs non polarisés.

L'OCP des petites électrodes se stabilise à une valeur classique pour une électrode de feutre immergée dans une solution aérée. En effet, rappelons que les électrodes sont situées au niveau de la surface de la solution. En outre, les solutions ne contiennent que du phosphate et le sel ayant servi à fixer leur conductivité, il n'y a donc pas de croissance bactérienne importante qui pourrait consommer l'oxygène, comme c'est le cas dans les eaux usées par exemple.

En revanche, le potentiel des grandes électrodes est exceptionnellement haut pour des électrodes en feutre de graphite. Le potentiel standard de la réaction de réduction du dioxygène :



égal à  $1,23 \text{ V vs ESH}$ , donne un potentiel d'équilibre de  $0,55 \text{ V vs ECS}$  à pH 7,4 (en négligeant la correction de la fugacité de l'oxygène en théorie égale à 1). Les valeurs obtenues ici sont parfois légèrement supérieures (Figure 5.21 droite), il faut certainement y voir une incertitude expérimentale pouvant être liée à une évolution du pH de la solution ou une dérive du potentiel de l'électrode de référence. En effet, les suivis sur plusieurs jours peuvent voir dériver le potentiel des électrodes de référence de quelques dizaines de millivolts (voire plus de 100 mV) par désaturation du KCl de l'électrode.

Les potentiels mesurés sont proches du potentiel d'équilibre de la réduction du dioxygène, or il est extrêmement rare d'atteindre ces valeurs avec des électrodes de carbone dans la configuration classique totalement immergée. Ces mesures seraient donc très

prometteuses quant à la capacité de la partie émergée des électrodes émergées à favoriser la réduction de l'oxygène. Ce ne sont toutefois que des mesures d'OCP qui sont donc contrôlées par d'infimes valeurs de courants d'échange.

Les CVs finales tempèrent drastiquement les espoirs qui pouvaient être fondés sur les mesures d'OCP. Les électrodes en partie émergées ne donnent pas de cinétiques de réduction de l'oxygène exceptionnellement meilleures que les petites électrodes (Figure 5.22). Il faut une analyse précise des performances pour quantifier une différence, comme précédemment en comparant les courants à -0,5 V vs ECS (Tableau 5.6). Le courant le plus important ( $-1,22 \pm 0,16$  mA) est produit par les grandes électrodes non polarisées (contre  $-0,83 \pm 0,44$  mA pour les petites électrodes non polarisées). Les réacteurs polarisés présentent des valeurs plus faibles ( $-0,86 \pm 0,21$  mA pour les grandes électrodes).

Les grandes électrodes produisent des courants environ 1,5 fois supérieurs aux petites au potentiel de -0,5 V vs ECS (Tableau 5.6). Ce gain reste faible par rapport à la surface 20 fois plus importante des grandes électrodes. Il est probable qu'un trempage de 24 heures soit insuffisant.

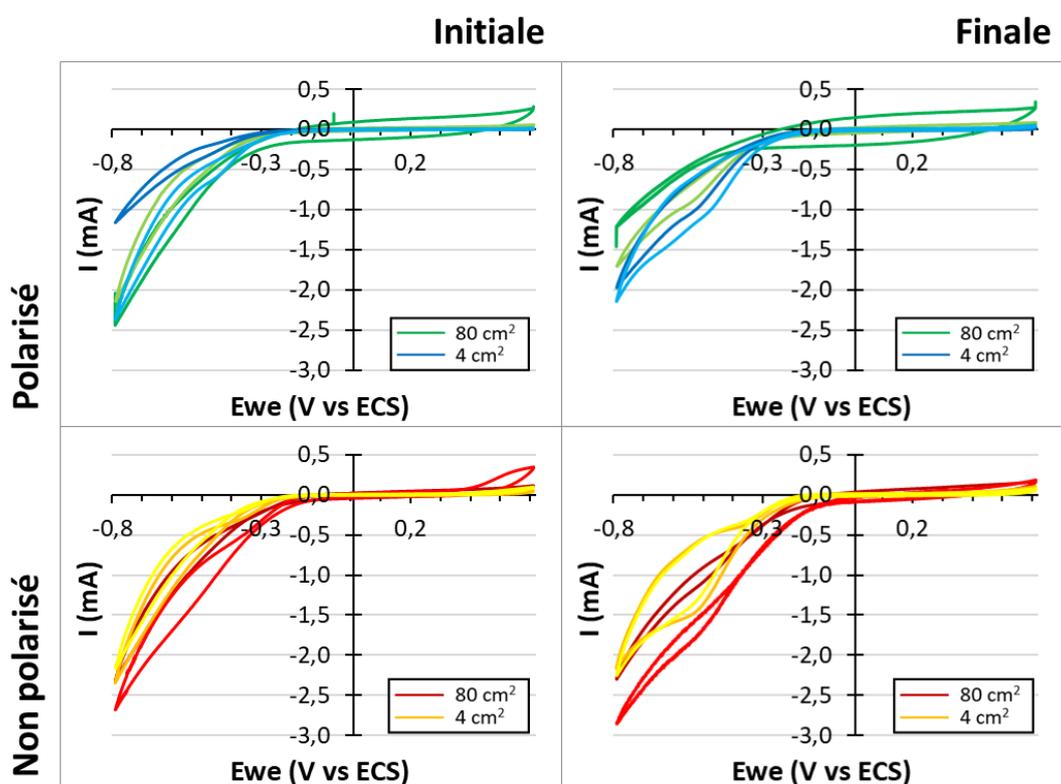


Figure 5.22 : Electrode capillaire en feutre de carbone en milieu synthétique, feutre trempé 24 heures,  $\sigma = 0,2$  S/m. CVs initiales (gauche) et finales (droite) des électrodes polarisées (haut) et non polarisées (bas) en duplicats. Vitesse de balayage de 5 mV/s entre -0,8 et +0,6 V vs ECS.

Tableau 5.6 : Electrode capillaire en feutre de carbone en milieu synthétique, feutre trempé 24h,  $\sigma = 0,2 \text{ S/m}$ . Courants (mA) au potentiel de  $-0,5 \text{ V}$  vs ECS sur les CVs initiales et finales.

Surface de l'électrode	Courants (mA) au potentiel de $-0,5 \text{ V}$ vs ECS			
	Polarisés		Non polarisés	
	Initial	Final	Initial	Final
4 cm <sup>2</sup>	-0,43 ±0,20	-0,62 ±0,33	-0,52 ±0,13	-0,83 ±0,44
80 cm <sup>2</sup>	-0,56 ±0,18	-0,86 ±0,21	-0,85 ±0,26	-1,22 ±0,16
Ratio 80 cm <sup>2</sup> / 4 cm <sup>2</sup>	x 1,3	x 1,4	x 1,6	x 1,5

### 3.4 Essai 3 – Feutre désaéré puis trempé 1 semaine, $\sigma = 0,2 \text{ S/m}$

Pour cet essai n°3, le feutre est trempé une semaine dans la solution (tampon phosphate 10 mM, pH 7,4, conductivité ajustée à 0,2 S/m). De plus, avant le trempage, le feutre est désaéré en le pressant mécaniquement plusieurs fois dans la solution pour chasser l'air qu'il emprisonne.

Les courants produits durant la polarisation par les petites électrodes sont deux fois plus importants que pour l'essai 2 avec  $-0,01 \pm 0,00 \text{ mA}$  (Figure 5.23 gauche). Pour les grandes électrodes, l'un des réacteurs est similaire aux précédents avec  $-0,007 \text{ mA}$  mais l'autre présente un courant 4,6 fois plus important de  $-0,03 \text{ mA}$  (Figure 5.23 droite).

Les suivis du potentiel des quatre électrodes laissées en OC sont similaires à ceux de l'essai précédent avec  $0,50 \pm 0,04 \text{ V}$  vs ECS pour les grandes électrodes contre  $0,20 \pm 0,01 \text{ V}$  vs ECS pour les petites.

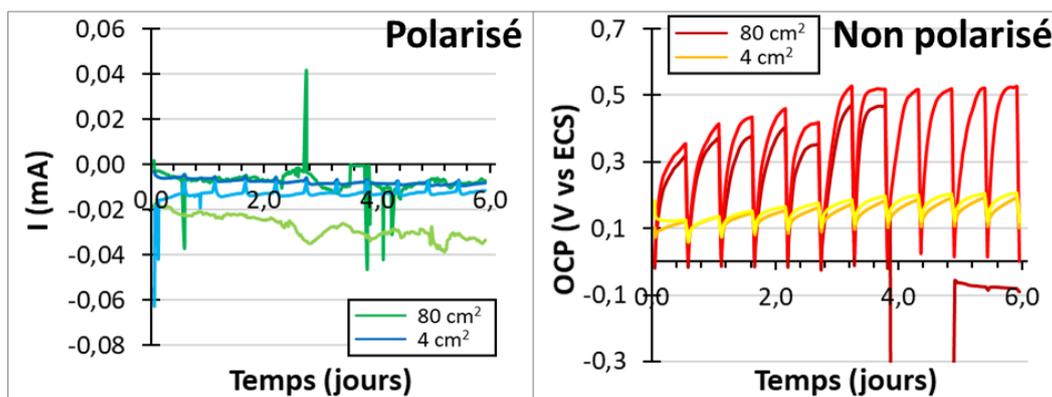


Figure 5.23 : Electrode capillaire en feutre de carbone en milieu synthétique, feutre trempé et désaéré,  $\sigma = 0,2$  S/m. (A gauche) CAs obtenues avec une polarisation à  $-0,1$  V vs ECS et (à droite) Suivi de l'OCP en fonction du temps dans les réacteurs non polarisés.

Juste avant le jour 4, l'un des réacteurs avec grande électrode a eu un souci d'électrode de référence : le potentiel chute à une valeur aberrante de  $-13,2$  V vs ECS avant de remonter pour se stabiliser à  $-0,09$  V vs ECS.

Les CVs montrent clairement une réduction de l'oxygène plus efficace dans tous les cas avec les grandes électrodes (Figure 5.24 & Tableau 5.7).

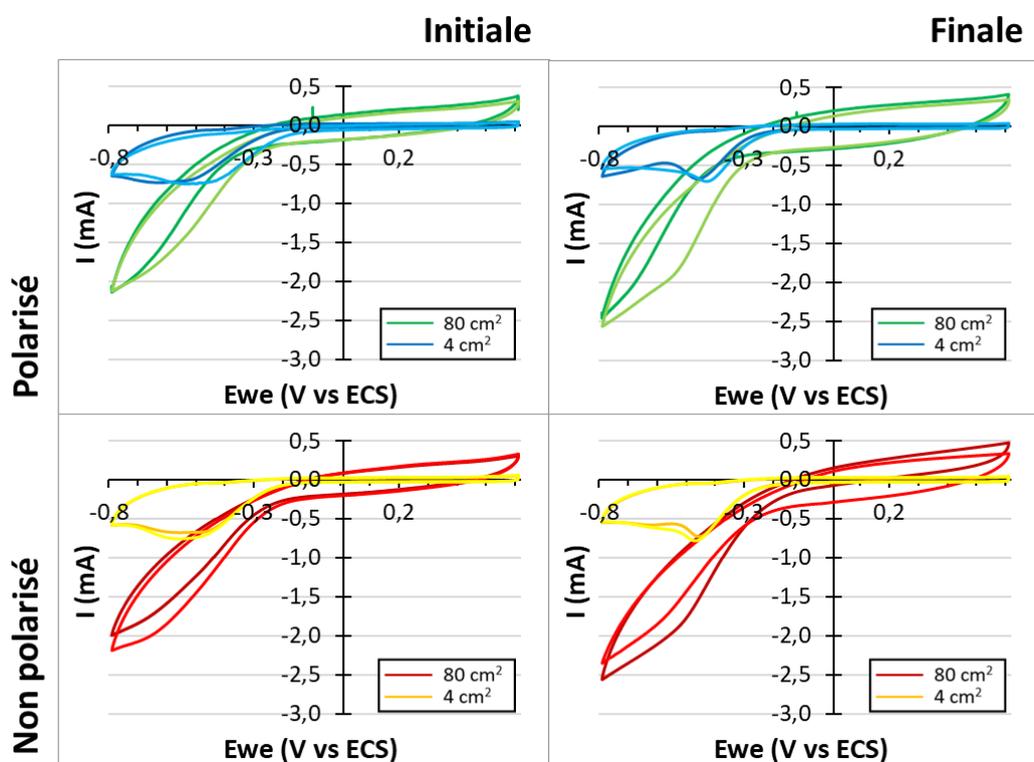


Figure 5.24 : Electrode capillaire en feutre de carbone en milieu synthétique, feutre trempé et désaéré,  $\sigma = 0,2$  S/m. CVs initiales (gauche) et finales (droite) des électrodes polarisées

(haut) et non polarisées (bas) en duplicats. Vitesse de balayage de 5 mV/s entre -0,8 et +0,6 V vs ECS.

Comme pour les essais précédents, la comparaison des courants à -0,5 V vs ECS montre que les grandes électrodes non polarisées présentent des courants plus importants que lorsqu'elles sont polarisées, alors que, pour les petites électrodes, la polarisation favorise la production de courant.

La valeur initiale est plus importante ici pour toutes les électrodes par rapport à l'essai précédent. Le trempage, passé de 24 heures à une semaine, et la désaération ont favorisé l'augmentation de la surface active en enlevant l'air piégé dans le feutre et augmentant sa mouillabilité.

Comme pour l'essai n°1, et contrairement à l'essai n°2, le courant diminue légèrement au cours de l'expérience pour les petites électrodes. En revanche, le courant augmente de 0,1 mA pour les grandes électrodes polarisées et de près de 0,2 mA pour les grandes électrodes non polarisées, atteignant une valeur de  $-1,18 \pm 0,40$  mA au potentiel de -0,5 V vs ECS. La cathode émergée s'améliore donc pendant les 6 jours de l'expérience.

Le trempage d'une semaine et la désaération ont amélioré les performances puisque dans ce cas, les grandes électrodes produisent des courants 2,0 à 3,4 fois plus élevés à -0,5 V vs ECS que les petites électrodes (Tableau 5.7).

*Tableau 5.7 : Electrode capillaire en feutre de carbone en milieu synthétique, feutre trempé et désaéré,  $\sigma = 0,2$  S/m. Courants (mA) au potentiel de -0,5 V vs ECS sur les CVs initiales et finales.*

Surface de l'électrode	Courants (mA) au potentiel de -0,5 V vs ECS			
	Polarisés		Non polarisés	
	Initial	Final	Initial	Final
<b>4 cm<sup>2</sup></b>	-0,40 ±0,35	-0,35 ±0,33	-0,37 ±0,38	-0,35 ±0,36
<b>80 cm<sup>2</sup></b>	-0,78 ±0,33	-0,88 ±0,39	-0,99 ±0,38	-1,18 ±0,40
<b>Ratio 80 cm<sup>2</sup> / 4 cm<sup>2</sup></b>	x 2,0	x 2,5	x 2,7	x 3,4

### 3.5 Essai 4 – Feutre trempé 1 semaine, $\sigma = 1,2$ S/m

Pour ce 4<sup>ème</sup> essai, le feutre est toujours trempé pendant une semaine dans le tampon phosphate 10 mM, pH 7,4 mais la conductivité est ajustée à 1,2 S/m, une valeur similaire au lixiviat de terreau qui sera utilisé par la suite.

Durant la polarisation, une des grandes électrodes atteint un courant de -0,03 mA alors que l'autre n'est qu'à 0,006 mA, des valeurs similaires à l'essai précédent (Figure 5.25 gauche). Les électrodes de 4 cm<sup>2</sup> présentent des courants de -0,003 mA.

Pour les électrodes laissées en OC, les potentiels sont toujours similaires aux essais précédents avec  $0,55 \pm 0,01$  V vs ECS pour les grandes électrodes et  $0,20 \pm 0,02$  V vs ECS pour les petites (Figure 5.25 droite).

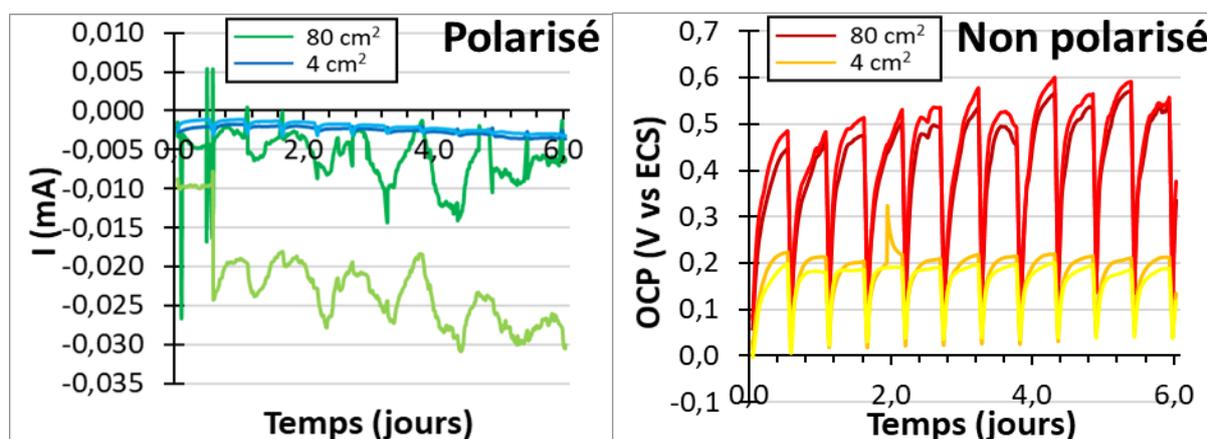


Figure 5.25 : Electrode capillaire en feutre de carbone en milieu synthétique, feutre trempé une semaine,  $\sigma = 1,2$  S/m. (A gauche) CAs obtenues avec une polarisation à -0,1 V vs ECS et (à droite) Suivi de l'OCP en fonction du temps dans les réacteurs non polarisés.

Les CVs réalisées en début et fin d'expérience montrent une réduction de l'oxygène plus efficace pour trois des grandes électrodes sur quatre (Figure 5.26). Une nouvelle fois, les électrodes émergées produisent un courant à -0,5 V vs ECS plus important lorsqu'elles sont laissées en OC plutôt que lorsqu'elles ont été polarisées (jusqu'à  $-2,69 \pm 0,55$  mA après l'OC contre  $-1,68 \pm 1,18$  avec polarisation) et les petites électrodes immergées ont le comportement inverse (jusqu'à  $-0,82 \pm 0,30$  mA après l'OC contre  $-0,91 \pm 0,43$  mA avec polarisation) (Tableau 5.8). Lorsque les grandes électrodes ne sont pas polarisées, le courant est 3,3 fois plus important qu'avec les petites électrodes entièrement immergées.

Les cathodes capillaires émergées confirment leur capacité à augmenter le courant de réduction de l'oxygène. De plus, tous les courants enregistrés dans cet essai n° 4 sont supérieurs à ceux des essais précédents, cette augmentation s'explique par l'augmentation de la conductivité de la solution.

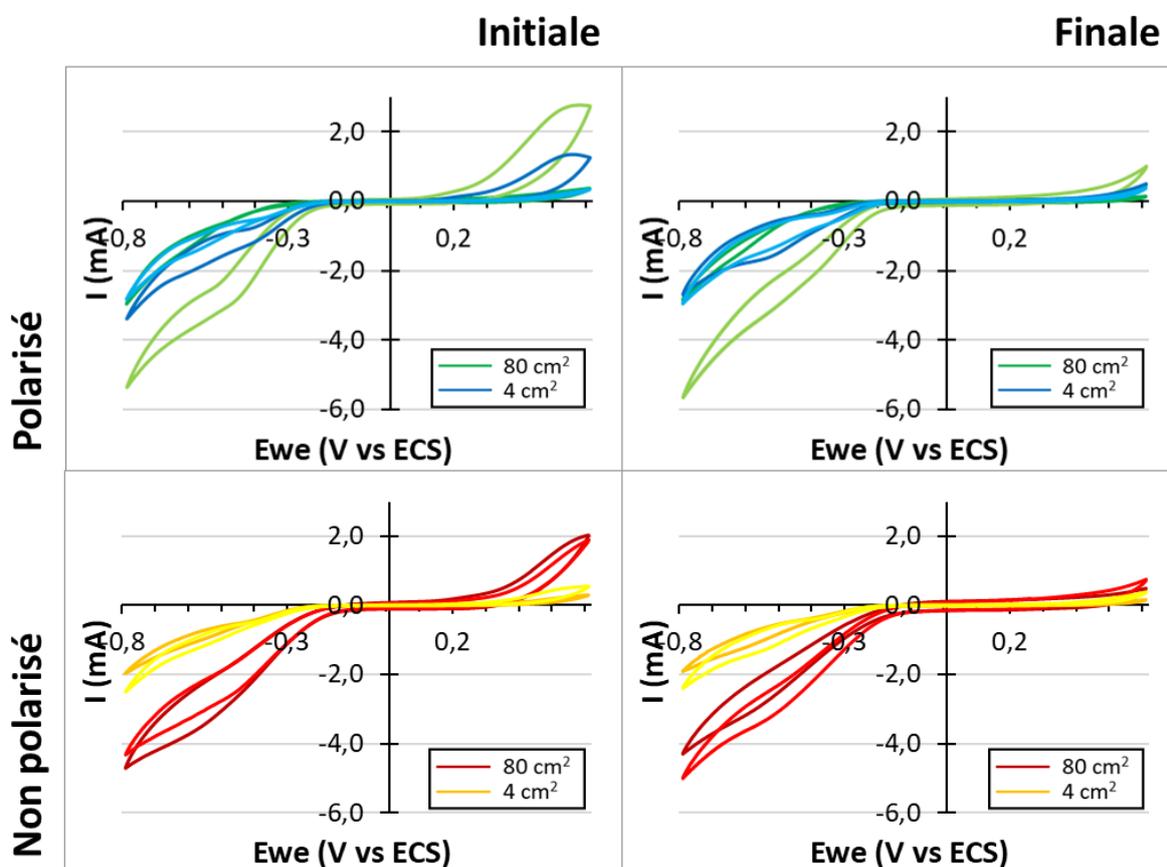


Figure 5.26 : Electrode capillaire en feutre de carbone en milieu synthétique, feutre trempé une semaine,  $\sigma = 1,2 \text{ S/m}$ . CVs initiales (gauche) et finales (droite) des électrodes polarisées (haut) et non polarisées (bas) en duplicats. Vitesse de balayage de  $5 \text{ mV/s}$  entre  $-0,8$  et  $+0,6 \text{ V vs ECS}$ .

Tableau 5.8 : Electrode capillaire en feutre de carbone en milieu synthétique, feutre trempé une semaine,  $\sigma = 1,2 \text{ S/m}$ . Courants (mA) au potentiel de  $-0,5 \text{ V}$  vs ECS sur les CVs initiales et finales.

Surface de l'électrode	Courants (mA) au potentiel de $-0,5 \text{ V}$ vs ECS			
	Polarisés		Non polarisés	
	Initial	Final	Initial	Final
4 cm <sup>2</sup>	-1,04 ±0,35	-0,91 ±0,43	-0,73 ±0,15	-0,82 ±0,30
80 cm <sup>2</sup>	-1,63 ±1,22	-1,68 ±1,18	-2,35 ±0,59	-2,69 ±0,55
Ratio 80 cm <sup>2</sup> / 4 cm <sup>2</sup>	x 1,6	x 1,8	x 3,2	x 3,3

### 3.6 Essai 5 – Eaux usées synthétiques + lombricompost, $\sigma = 1,2 \text{ S/m}$

Les quatre essais précédents ont été réalisés dans un tampon phosphate abiotique. Ce 5<sup>ème</sup> essai est réalisé dans une eau usée (EU) synthétique inoculée avec du lombricompost. Contrairement à la première partie de ce chapitre, le milieu n'est pas composé de lixiviat de terreau mais d'eau usée synthétique inoculée avec 5% (v/v) de lombricompost et supplémenté avec 20 mM d'acétate en vue de se rapprocher des eaux usées domestiques. Ce choix a été imposé par la crise sanitaire due à la Covid-19 qui a amené les autorités du laboratoire à interdire l'usage d'eaux usées réelles. Les caractéristiques des eaux usées synthétiques ainsi que du lombricompost sont présentées dans les parties 1.1.2 et 1.2.3 du chapitre 2. Les caractéristiques des réacteurs et électrodes restent identiques aux essais précédents. Les électrodes subissent une étape de trempage préalable, sans désaération, d'une semaine dans les eaux usées synthétiques inoculées avec 5% (v/v) de lombricompost.

Les courbes de courant et de potentiel (Figure 5.27) présentent une interruption due à un problème de mémoire tampon du potentiostat. Pendant cette période, la polarisation s'est poursuivie mais les points n'ont pas été enregistrés. Les valeurs de courant des électrodes polarisées et de potentiel des électrodes non polarisées ont des comportements totalement différents de ceux observés lors des essais précédents en conditions abiotiques.

Les électrodes polarisées se comportent essentiellement comme des anodes. Le courant augmente à mesure qu'un biofilm électroactif se forme et oxyde l'acétate et la matière organique naturellement présente dans le lombricompost, jusqu'à atteindre un maximum entre

6 et 7 jours (Figure 5.27 gauche). Le courant diminue ensuite, probablement à cause de l'épuisement des substrats. Les électrodes immergées produisent un courant maximum de 3,2 et 1,6 mA, et restent en oxydation jusqu'à la fin de l'expérience. Le courant des électrodes en partie émergée est plus faible à 0,08 et 0,42 mA et elles passent en réduction à partir de 7,7 et 10,4 jours. La valeur finale moyenne du courant au jour 14 est de  $-0,26 \pm 0,12$  mA. On peut penser que le courant mesuré résulte de la somme de l'oxydation du substrat, qui a lieu majoritairement sur la partie immergée, et de la réduction de l'oxygène sur la partie émergée. Lorsque le substrat est consommé, seul le courant de réduction demeure.

Pour les réacteurs non polarisés (Figure 5.27 droite), le potentiel chute en une journée à une valeur d'environ  $-0,5$  V vs ECS pour les petites électrodes. L'absence d'oxygène en solution fixe le potentiel de ces électrodes à une valeur très basse. Pour les grandes électrodes, le potentiel se stabilise rapidement vers  $-0,04$  V vs ECS jusqu'au jour 5 puis il chute jusqu'à une valeur finale de  $-0,37 \pm 0,09$  V vs ECS. Cette évolution est difficile à interpréter. Le potentiel plus élevé des électrodes émergées observé les 5 premiers jours peut s'expliquer par l'effet de la réduction de l'oxygène qui a lieu sur la partie émergée. Il faudrait donc conclure qu'après 5 jours la réduction de l'oxygène faiblit et la partie immergée sur laquelle a lieu l'oxydation du substrat tire le potentiel vers les valeurs plus faibles.

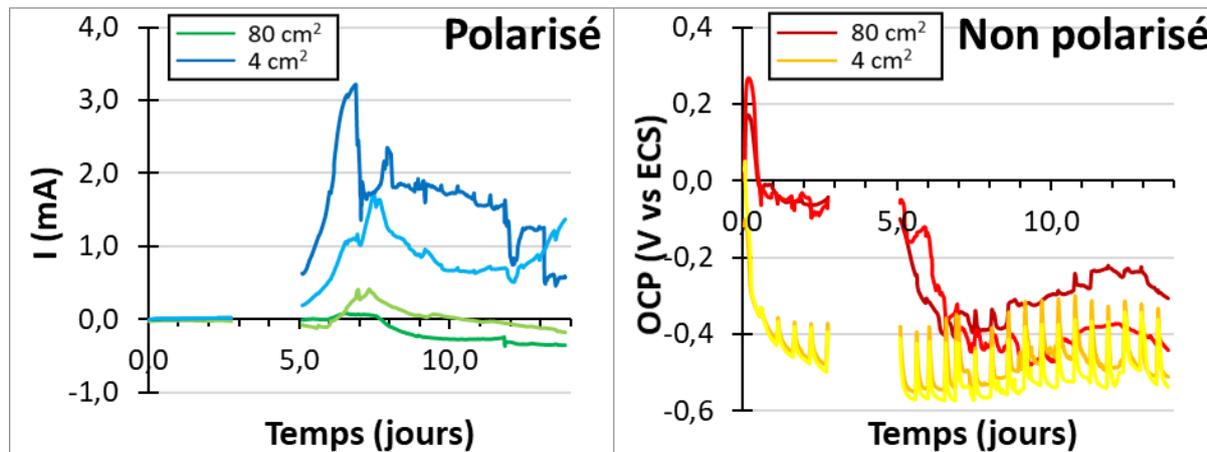


Figure 5.27 : Electrode capillaire en feutre de carbone en milieu synthétique, feutre trempé une semaine, EU synthétique + lombricompost,  $\sigma = 1,2$  S/m. (A gauche) CAs obtenues avec une polarisation à  $-0,1$  V vs ECS et (à droite) suivi de l'OCP en fonction du temps dans les réacteurs non polarisés.

Les CVs « finales » présentées ici sont enregistrées au jour 6 afin de les comparer avec celles des essais précédents qui ont duré 6 jours (Figure 5.28). De plus, les courants maximums sont enregistrés aux alentours du jour 6, ces CVs permettent donc de caractériser

les électrodes au maximum de leur performance. Sur les CVs initiales, des différences sont observées entre les duplicats mais les grandes électrodes semblent tout de même présenter une meilleure réduction de l'oxygène. Pour les CVs finales, seules les grandes électrodes émergées permettent la réduction de l'oxygène.

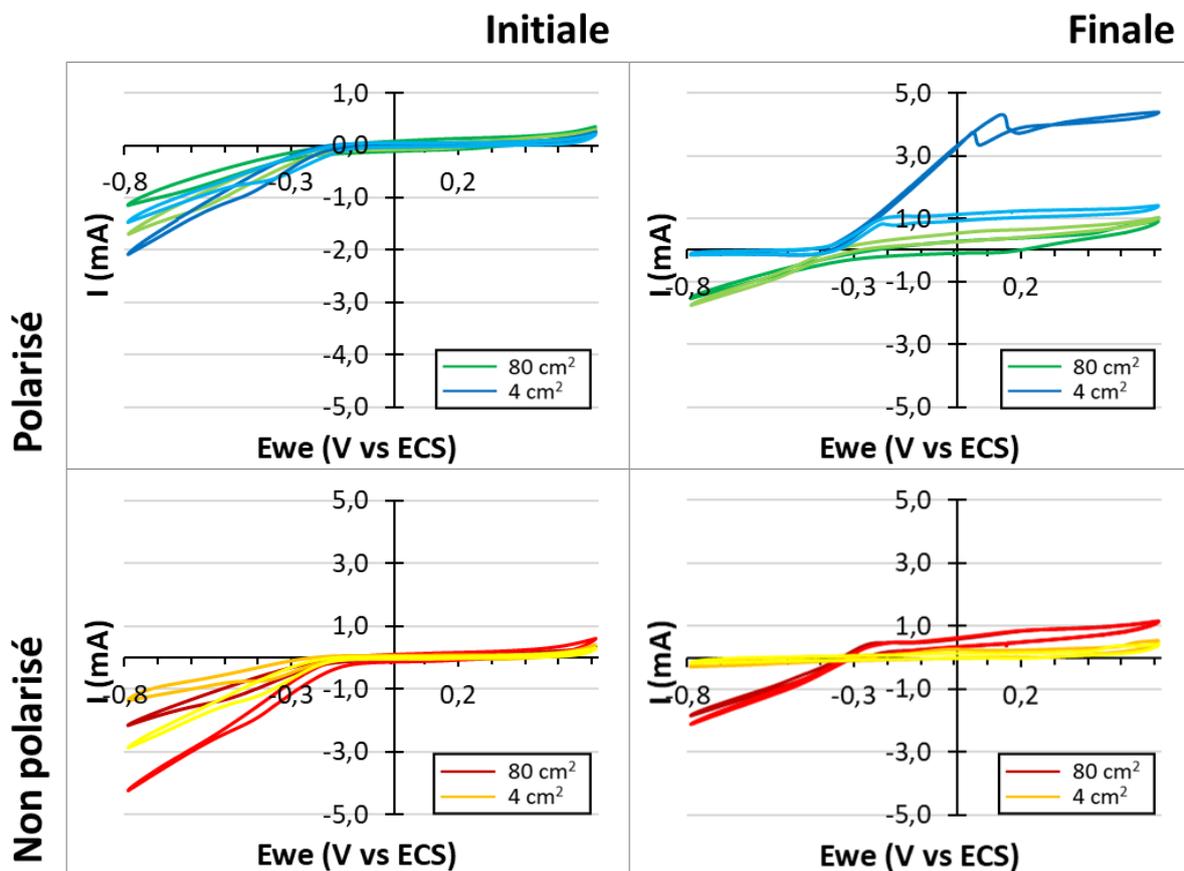


Figure 5.28 : Electrode capillaire en feutre de carbone en milieu synthétique, feutre trempé une semaine, EU synthétique + lombricompost,  $\sigma = 1,2 \text{ S/m}$ . CVs initiales (gauche) et finales (droite) des électrodes polarisées (haut) et non polarisées (bas) en duplicats. Vitesse de balayage de  $5 \text{ mV/s}$  entre  $-0,8$  et  $+0,6 \text{ V vs ECS}$

Sur les CVs finales, les courants des électrodes entièrement immergées ne sont que de  $-0,12 \pm 0,15 \text{ mA}$  et  $-0,10 \pm 0,09 \text{ mA}$  à  $-0,5 \text{ V vs ECS}$  pour les réacteurs polarisés et non polarisés, respectivement (Tableau 5.9). Ces valeurs sont bien plus faibles que lors des essais précédents. Dans les essais précédents, les milieux abiotiques permettaient la présence d'oxygène dissout en solution. Ici, le milieu constitué d'eaux usées synthétiques inoculées provoque la consommation rapide de l'oxygène par les bactéries aérobies.

A l'inverse, les grandes électrodes permettent de maintenir une activité de réduction de l'oxygène après 6 jours avec un courant de l'ordre de -0,8 mA au potentiel de -0,5 V vs ECS. En fin d'expérience, les grandes électrodes polarisées permettent d'obtenir un courant 6,7 fois plus important que les petites et, en l'absence de polarisation, le courant est 7,6 plus important avec les grandes électrodes. Cela confirme l'intérêt d'utiliser d'une électrode émergée dans des milieux inoculés.

Tableau 5.9 : Electrode capillaire en feutre de carbone en milieu synthétique, feutre trempé une semaine, EU synthétique + lombricompost,  $\sigma = 1,2 \text{ S/m}$ . Courants (mA) au potentiel de -0,5 V vs ECS sur les CVs initiales et finales

Surface de l'électrode	Courants (mA) au potentiel de -0,5 V vs ECS			
	Polarisés		Non polarisés	
	Initial	Final	Initial	Final
4 cm <sup>2</sup>	-0,85 ±0,18	-0,12 ±0,15	-1,00 ±0,44	-0,10 ±0,09
80 cm <sup>2</sup>	-0,67 ±0,22	-0,80 ±0,15	-1,70 ±0,69	-0,76 ±0,15
Ratio 80 cm <sup>2</sup> / 4 cm <sup>2</sup>	x 0,8	x 6,7	x 1,7	x 7,6

### 3.7 Conclusion

Ces cinq essais ont permis de comparer les prétraitements et conditions (trempage, désaération, polarisation ou non) susceptibles de favoriser le développement d'une cathode de réduction de l'oxygène sur la partie émergée. Les courants au potentiel de -0,5 V vs ECS extraits des CVs finales de chaque électrode ont été regroupés sur la Figure 5.29.

Tout d'abord, l'essai n°1 a montré qu'il était indispensable de procéder à une étape préalable de trempage pour pallier l'hydrophobicité du feutre. Sans trempage, les petites électrodes produisent un courant final à -0,5 V vs ECS jusqu'à 3,9 fois plus important que les grandes (Figure 5.29 – Essai 1). Cela est probablement dû au fait que les petites électrodes, totalement immergées, ont gagné en hydrophilie durant les 6 jours de l'expérience, alors que, pour les grandes électrodes, la partie émergée est restée sèche.

Une durée de trempage de 24 heures est insuffisante (Figure 5.29 – Essai 2) mais un trempage d'une semaine permet d'obtenir une augmentation significative du courant de réduction (Figure 5.29 – Essai 3), particulièrement pour les grandes électrodes non polarisées qui permettent d'atteindre un courant 3,4 fois plus grand que les petites en l'absence de

polarisation. De plus, augmenter la conductivité de la solution de 0,2 à 1,2 S/m permet logiquement d'obtenir des courants de réduction plus élevés (Figure 5.29 – Essai 4), atteignant  $-2,69 \pm 0,55$  mA pour les grandes électrodes non polarisées. Sans doute faut-il attribuer cette amélioration à l'accélération des transferts ioniques au sein de la solution qui mouille la partie émergée de l'électrode. Encore une fois, ce sont les grandes électrodes non polarisées qui produisent les courants les plus élevés, 3,3 fois plus importants que les petites.

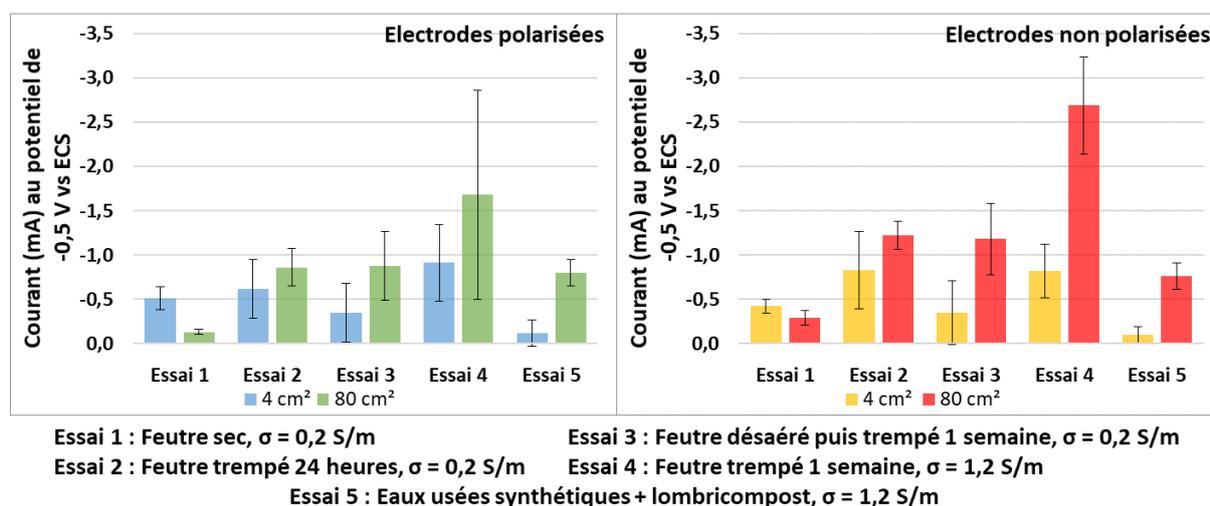


Figure 5.29 : Courants (mA) au potentiel de  $-0,5$  V vs ECS sur les CVs finales des électrodes polarisées (gauche) et non polarisées (droite) pour les 5 essais

Pour les grandes électrodes, le courant est plus élevé lorsqu'elles ne sont pas polarisées. Cette information, difficile à expliquer, est tout à fait positive en ce qui concerne la mise en place d'un biotuba, puisqu'il ne sera pas nécessaire de prévoir un système de polarisation pour le concevoir.

En comparant les OCP finaux des électrodes non polarisées, il s'avère que les grandes électrodes se stabilisent à un potentiel deux fois plus élevé que les petites, atteignant  $0,55 \pm 0,01$  V vs ECS. C'est une valeur bien sûr encourageante, quoiqu'il faille la considérer avec prudence vu sa proximité avec le potentiel d'équilibre de la réaction de réduction de l'oxygène. Il est possible que ce potentiel favorise l'électrocapillarité. Il a été démontré dans des études du domaine de la microfluidique que l'application d'un potentiel à une électrode permettait de modifier l'hydrophobie de sa surface en augmentant la capacité de la double couche interfaciale (Mugele and Baret, 2005). Ce processus appelé électro-mouillage, est évalué en mesurant la montée capillaire en fonction du potentiel appliqué. Il est donc possible que le potentiel élevé de la cathode capillaire émergée favorise la remontée capillaire au sein du feutre.

En milieu biotique (Figure 5.29 – Essai 5), les électrodes émergées présentent un courant cathodique 6,7 fois plus important que les petites électrodes lorsqu'elles sont polarisées et 7,6 lorsqu'elles ne le sont pas. En présence de microorganismes et de substrats organiques, les électrodes complètement immergées ont formé des anodes alors que les électrodes en partie émergées conservent une activité cathodique qui apparaît quand la totalité des substrats organique est épuisé. Les grandes électrodes émergées permettent donc de maintenir une activité de réduction de l'oxygène après 6 jours, sans aucune aération forcée, dans un milieu riche en microorganismes et anoxique.

## **4 Biotuba avec électrode capillaire émergée en milieu synthétique**

Après avoir formé une anode microbienne et une cathode capillaire émergée dans les parties précédentes, l'objectif est ici de les coupler pour former un biotuba avec électrode capillaire émergée. Il sera testé en milieu synthétique avec l'oxydation de l'acétate en anode et la réduction de l'oxygène en cathode.

Les électrodes en feutre de carbone d'une hauteur de 18, 22 ou 26 cm, sont tout d'abord totalement immergées en milieu synthétique inoculé avec 5% v/v de lombricompost et supplémenté avec 20 mM d'acétate. Cette première phase, qui dure 7 jours, reproduit les 6 jours minimum sans polarisation qui sont favorables à la formation d'une anode microbienne (partie 2 de ce chapitre). Elle correspond en outre à la durée de trempage appropriée pour former une électrode émergée en réduction (partie 3 de ce chapitre). Au bout de 7 jours, les électrodes sont émergées d'une hauteur de 4, 8 ou 12 cm, jusqu'à la fin de l'expérience.

L'objectif est de voir l'influence de la hauteur émergée sur les performances du biotuba. Pour cela, le potentiel du biotuba et la DCO du milieu sont mesurés tout au long de l'expérience. L'influence de la hauteur émergée est aussi évaluée sur la structure et le taux de recouvrement du biofilm présent aux extrémités hautes et basses de chacun des biotubas grâce à des observations au microscope à épifluorescence et au MEB en fin d'expérience. Les populations microbiennes sont analysées aux extrémités des parties émergées et immergées des biotubas, dans le milieu de culture au jour 14 et en fin d'expérience, ainsi que pour le biofilm collecté de la grille en plastique des contrôles. Les protocoles sont décrits dans la partie 3 du chapitre 2.

## 4.1 Conditions opératoires

Chaque électrode est composée de deux lanières de feutre de carbone assemblées en croix avec une tige en titane en leur centre (chapitre 2 – partie 2.3) placées dans des réacteurs « Biotuba\_26 » (chapitre 2 – partie 2.1.2). Les conditions d’émersion sont présentés dans le Tableau 5.10. De la même façon que pour le protocole présenté dans le chapitre 3, la recirculation est arrêtée lors des phases de suivi de l’abattement de la DCO en batch. Le milieu de culture est constitué d’eau usée synthétique inoculée avec 5% v/v de lombricompost. Lorsque les réacteurs sont alimentés en acétate, sauf précision contraire, le milieu n’est pas changé mais seule la concentration en acétate est réajustée à 20 mM.

Tableau 5.10 : Conditions expérimentales pour la mise en oeuvre du biotuba avec électrode capillaire émergée en milieu synthétique inoculé avec 5% v/v de lombricompost et supplémenté avec 20 mM d’acétate

<b>Montage expérimental (chapitre 2 – parties 2.1.2, 2.1.3 et 2.3)</b>	
<b>Réacteurs « Biotuba_26 »</b>	Electrode de travail : feutre de carbone + tige en titane
<b>6 biotubas &amp; 2 contrôles</b>	Electrode de référence : ECS
	Contrôle : grille de plastique pour simuler l’électrode
<b>Réservoir</b>	Débit de recirculation : 1,5 mL/min – Arrêt de la recirculation
<b>Flacon en verre de 2L</b>	lors des phases de suivi de la DCO en batch
<b>Milieu réactionnel (chapitre 2 – parties 1.1.2 et 1.2.3)</b>	
<b>Milieu</b>	Eau usée synthétique + lombricompost + acétate 20 mM
<b>Hauteur - Volume</b>	27 cm dans le réacteur, 300-350 mL
<b>Techniques électrochimiques (chapitre 2 – partie 3.1.2)</b>	
<b>OCP</b>	Mesure toutes les 10 minutes durant toute l’expérience
<b>Etapes</b>	
<b>1 : Immersion totale</b>	J1 – J7
<b>2 : Emersion partielle</b>	J7 – J17

Emersion	
<b>Biotubas_e4</b>	4 cm émergés - 14 cm immergés
<b>Biotubas_e8</b>	8 cm émergés - 14 cm immergés
<b>Biotubas_e12</b>	12 cm émergés - 14 cm immergés
<b>Observations MEB et épifluorescence, analyses des populations microbiennes (chapitre 2 – parties 3.3 et 3.4)</b>	

## 4.2 Résultats électrochimiques et performances d'abattement

Les sept premiers jours, les électrodes sont totalement immergées. Leur potentiel démarre à une valeur de  $-0,06 \pm 0,04$  V vs ECS et diminue rapidement jusqu'à se stabiliser à une valeur de  $-0,45 \pm 0,03$  V vs ECS dès 0,5 jour environ (Figure 5.30). Cette valeur reste stable durant les 6,5 jours d'immersion complète qui suivent. Lors de l'émersion partielle de l'électrode, le potentiel augmente instantanément pour atteindre une valeur de  $-0,16 \pm 0,02$  V vs ECS. A ce stade, la hauteur de la partie émergée des électrodes n'influe pas sur le potentiel. Par la suite, les potentiels diminuent progressivement pour se stabiliser à des valeurs finales de  $-0,36 \pm 0,05$  ;  $-0,41 \pm 0,03$  et  $-0,22 \pm 0,06$  V vs ECS pour les électrodes avec 4, 8 et 12 cm émergés, respectivement (Biotubas\_e4, Biotubas\_e8 et Biotubas\_e12). Les potentiels des électrodes émergées de 4 et 8 cm sont très proches mais celui de l'électrode émergée de 12 cm est clairement plus élevé avec une valeur de  $-0,22 \pm 0,06$  V vs ECS.

Après l'émersion partielle, l'électrode de référence ne baignait pas correctement dans le milieu liquide du réacteur pour un des Biotuba\_e12. Cela a entraîné un bruit important sur l'enregistrement du potentiel entre l'émersion partielle et le premier batch (Figure 5.30A). Il faut tout de même noter que la courbe présente une évolution du potentiel fidèle à celle observée pour les autres réacteurs. Pour améliorer la lisibilité des courbes, la partie bruitée correspondante a été retirée sur la 2<sup>ème</sup> figure (Figure 5.30B).

La concentration en acétate dans les réacteurs a été réajustée à 20 mM au moment de l'émersion partielle des électrodes, ainsi qu'au début de chaque phase de suivi de la DCO en batch. Au jour 14, après le premier batch, dont les résultats n'ont pas été concluants, et en amont du second batch, le milieu a été intégralement changé. Les réacteurs ont été totalement vidés et remplis avec un nouveau mélange composé d'eau usée synthétique inoculée avec 5% de lombricompost.

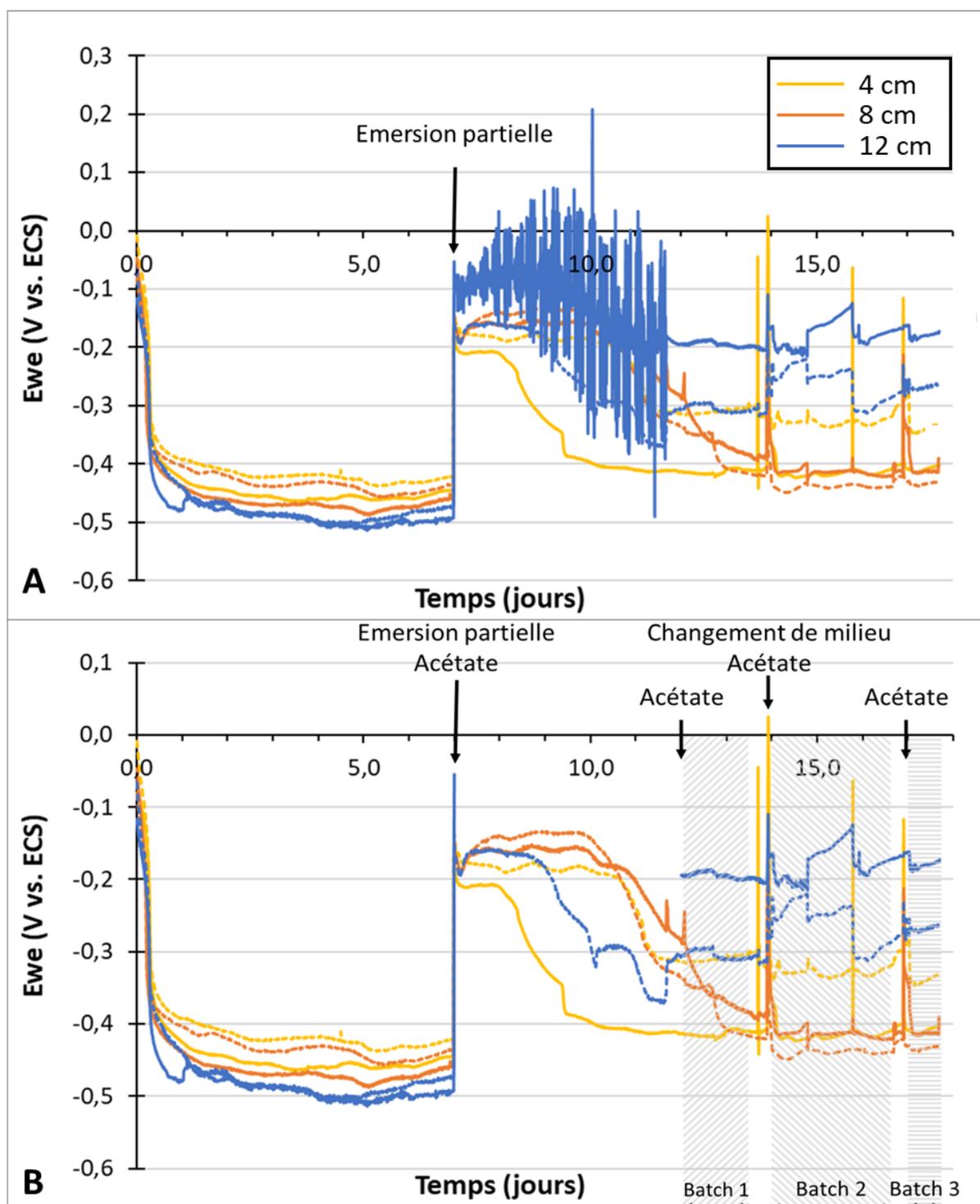


Figure 5.30 : Biotuba avec électrode capillaire émergée en milieu synthétique. Suivi de l'OCP du biotuba en fonction du temps (duplicats). (A) Courbes complètes et (B) sans la période J7-J12 de l'un des réacteurs avec 12 cm émergés. Les « batchs » sont les périodes de suivi de la DCO.

Au cours des trois phases en batch (voir repères visuels sur la Figure 5.30B), l'évolution de la DCO soluble est suivie en fonction du temps. Les abattements de la DCO sont calculés en pourcentage par rapport à la valeur de la DCO initiale :

$$\Delta\text{COD} (\%) = \frac{\text{COD}_0 - \text{COD}_t}{\text{COD}_0} \times 100 \quad (2)$$

Avec :

- $\text{DCO}_0$  : DCO initiale,
- $\text{DCO}_t$  : DCO à l'instant t.

Les trois phases en batch n'ont pas eu la même durée. L'abattement a donc été systématiquement calculé à  $t = 2,5$  heures (Figure 5.31 gauche) et à la fin de la phase batch, la durée du batch est alors précisée (Figure 5.31 droite).

Le batch 1 arrive 5 jours après l'émersion partielle. Étonnamment, les biotubas qui ont le mieux fonctionné sont les Biotubas\_e4 avec un abattement de la DCO soluble de  $45 \pm 3\%$ , qui est atteint dès  $t = 2,5$  h et qui n'évolue plus jusqu'à la fin du batch ( $t = 43$  h) (Figure 5.31). Les autres réacteurs fonctionnent plus lentement. Les Biotubas\_e8 ont un abattement de  $16 \pm 6\%$  après 2,5 heures qui augmente à  $22 \pm 3\%$  à la fin du batch. De même, les abattements des Biotubas\_e12 évoluent de  $24 \pm 7\%$  à 2,5 heures à  $37 \pm 7\%$  à la fin du batch.

Les contrôles présentent un abattement bien inférieur à ceux des réacteurs qui contiennent les biotubas, ils sont de  $13 \pm 0\%$  au bout de 2,5 heures et  $11 \pm 1\%$  à la fin du batch.

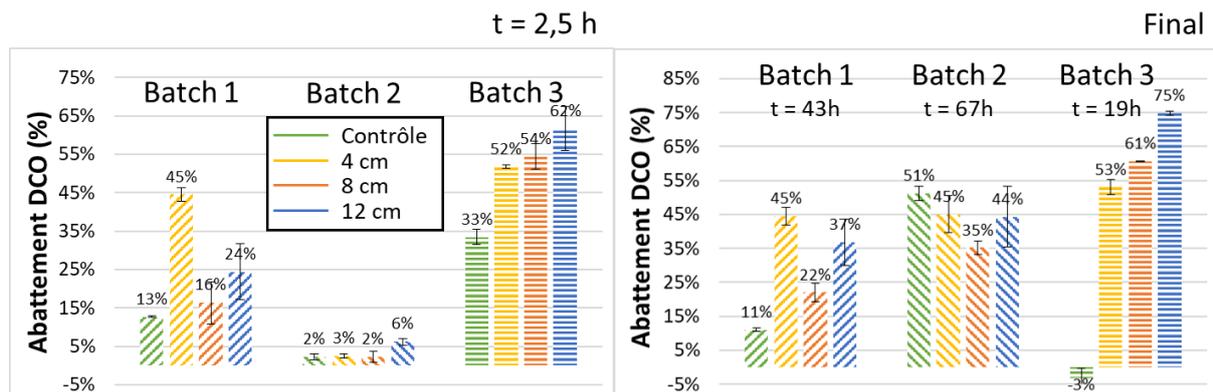
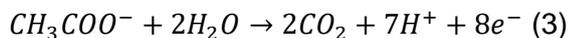


Figure 5.31 : Biotuba avec électrode capillaire émergée en milieu synthétique. Abattement de la DCO (%) (gauche) à  $t=2,5$  h et (droite) à la fin de chaque batch.

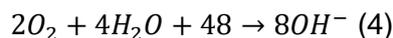
A la fin du batch 1, avant le changement de milieu, le pH des contrôles est le plus élevé avec une valeur moyenne de  $7,9 \pm 0,1$ . Pour les biotubas, ce sont les Biotubas\_e4 qui ont abattu le plus de matière organique qui présentent le pH le plus haut (Tableau 5.11) avec une

valeur de  $7,5 \pm 0,2$ . Les Biotubas\_e8 et Biotubas\_e12, qui permettent d'abattre à peine plus de DCO que les contrôles, ont des pH plus faibles à des valeurs de  $7,0 \pm 0,1$  et  $7,2 \pm 0,3$ , respectivement.

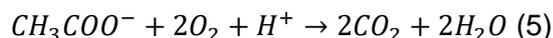
Les anodes des biotubas assurent l'oxydation de l'acétate :



qui conduit à une acidification de la solution. La cathode émergée assure la réduction de l'oxygène :



qui alcalinise la solution. Dans la mesure où seule la partie anodique baigne en solution, il paraît logique que les pH des réacteurs équipés de biotubas soient plus faibles que celui des contrôles. Pour les Biotubas\_e4 qui abattent le plus de matière organique, la diffusion des ions  $OH^-$  depuis la partie cathodique émergée est plus importante et compense en partie l'acidification de la solution. Il faut en effet noter que la somme des réactions anodique et cathodique :



devrait conduire à une augmentation globale du pH de la solution. Ici, les valeurs de pH mesurées en solution sont certainement le résultat des vitesses de transfert le long du biotuba des ions qui participent à l'établissement du pH,  $H^+$ ,  $OH^-$  et les ions phosphates.

Il a été montré que l'acidification de l'anode est nocive pour le biofilm (Gil et al., 2003; Harnisch and Schröder, 2009; Popat and Torres, 2016). L'un des objectifs des électrodes bidirectionnelles, est d'ailleurs de stabiliser le pH par l'alternance de phases anodiques et cathodiques (Cheng et al., 2010; Freguia et al., 2008; W. Li et al., 2014; Sun et al., 2015).

Ici, lorsque le batch 1 a démarré, le pH avait déjà diminué dans les réacteurs équipés d'un biotuba par rapport à celui des contrôles. Cette situation a peut-être limité l'abattement de la matière organique puisque l'activité de la partie anodique des biotubas était inhibée par la diminution du pH. Il faut bien sûr nuancer cette remarque car les valeurs de pH restent proches de la neutralité, dans une gamme qui ne devraient pas affecter le biofilm, mais ce sont les valeurs en solution qui dénotent peut-être des tendances locales plus acérées au niveau du feutre des biotubas.

Tableau 5.11 : Biotuba avec électrode capillaire émergée en milieu synthétique. Mesures de pH à la fin du batch 1 avant le changement de milieu, après le changement de milieu (J14) et à la fin du batch 3 (J17).

pH	Contrôle	Biotubas_e4	Biotubas_e8	Biotubas_e12
<b>Avant changement de milieu</b>	7,9 ±0,1	7,5 ±0,2	7,0 ±0,1	7,2 ±0,3
<b>Après changement de milieu</b>	7,6 ±0,0	7,6 ±0,2	7,6 ±0,0	7,9 ±0,0
<b>pH final</b>	7,9 ±0,1	7,4 ±0,2	7,1 ±0,0	7,1 ±0,1

Avant le second batch, le milieu réactionnel est intégralement remplacé par un nouveau mélange d'eaux usées synthétiques inoculées avec 5% de lombricompost et supplémentées avec 20 mM d'acétate pour vérifier cette hypothèse. Après le changement de milieu, les contrôles et les biotubas avec 4 et 8 cm émergés ont un pH identique de 7,6 ±0,2. Les Biotubas\_e12 ont un pH légèrement supérieur de 7,9 ±0,0. Ce deuxième batch n'a pas donné de résultats satisfaisants (Figure 5.31). Au bout de 2,5 heures, l'abattement est très faible dans tous les réacteurs avec un maximum de 6 ±1% pour des biotubas avec 12 cm émergés. Il est probable que le changement de milieu, réalisé juste avant les mesures en batch, ait fortement impacté les biotubas en dégradant leur capacité de traitement.

Au bout de 67 heures, à la fin du batch, les biotubas semblent avoir retrouvé leur capacité de traitement mais il n'est pas possible d'interpréter les mesures car les contrôles, présentent également un abattement important très probablement dû à une entrée parasite d'air.

Le troisième batch, réalisé après un réajustement de la concentration en acétate à 20 mM, présente quant à lui des résultats beaucoup plus prometteurs. L'abattement de la DCO dans les biotubas est significativement supérieur aux valeurs observées pour les contrôles, tant à t = 2,5 heures qu'à t = 19 heures (Figure 5.31). Les abattements augmentent avec la surface d'électrode émergée et atteignent une valeur de 75% à la fin du batch (19 heures) dans les biotubas avec 12 cm émergés.

Le suivi de la DCO en fonction du temps montre que l'abattement est très rapide au cours de la première heure (Figure 5.32). La DCO chute d'une valeur initiale de 1289 ±7 mg d'O<sub>2</sub>/L à des valeurs comprises entre 976 ±36 mg d'O<sub>2</sub>/L pour les contrôles et 482 ±72 mg d'O<sub>2</sub>/L pour les Biotubas\_e12 au bout d'une heure. Cependant, la consommation de DCO cesse rapidement et la stabilisation de la concentration semble d'autant plus rapide que la surface d'électrode émergée est importante. En effet, alors que les mesures de DCO pour les

Biotubas\_e12 sont identiques entre 1 heure et 2,5 heures, elles diminuent sur cette période pour les biotuba\_e4. Les mesures de pH réalisées en fin d'expérience montrent la même évolution qu'auparavant avec une acidification des biotubas, particulièrement ceux avec 8 et 12 cm émergés alors que le pH des contrôles a légèrement augmenté.

Il est encore difficile de cerner les raisons pour lesquelles l'activité ralenti au bout d'une heure. L'activité semble moindre pour des pH aux alentours de 7, qui sont pourtant normalement favorables au biofilm électroactif. Il s'agit cependant du pH global du milieu, il serait intéressant de faire des mesures de pH au niveau du biofilm anodique pour voir s'il n'y aurait pas une acidification beaucoup plus importante localement, qui permettrait d'expliquer le ralentissement. Il est possible aussi que ce ralentissement soit lié au transport de la matière organique vers le biofilm et au sein du biofilm dont la vitesse diminue avec les concentrations plus faibles. Les valeurs de DCO se stabilisent entre 400 et 500 mg d'O<sub>2</sub>/L, il est aussi possible que la fraction restante corresponde à la DCO non dégradée par le biofilm ou dégradée mais avec des cinétiques beaucoup plus lentes.

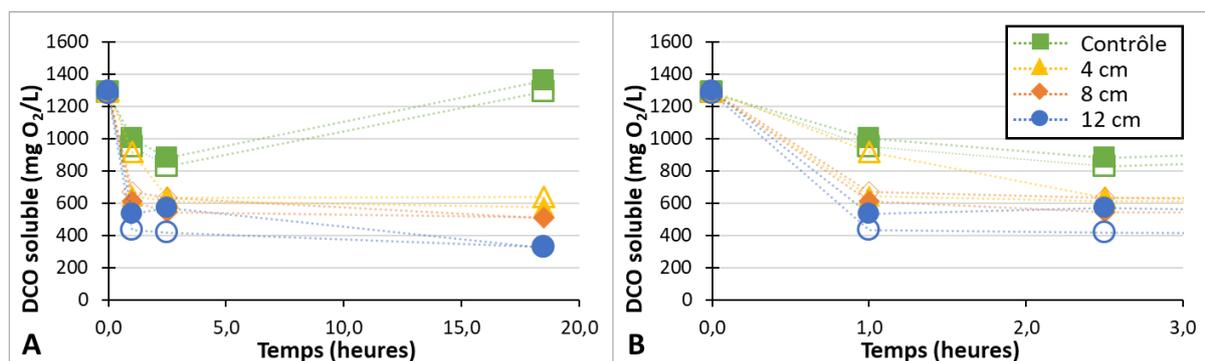


Figure 5.32 : Biotuba avec électrode capillaire émergée en milieu synthétique. Suivi de la DCO en fonction du temps au cours du batch 3 (gauche) et zoom sur les 3 premières heures (droite).

Comme les valeurs de la DCO se stabilisent au bout d'une heure, les vitesses d'abattement de la DCO ( $\Delta$ DCO) sont calculées sur 1 heure. Les moyennes des vitesses d'abattement croissent proportionnellement à la hauteur de la cathode émergée, malgré une incertitude plus importante pour la cathode émergée de 4 cm (Figure 5.33). Les cathodes émergées de 12 cm assurent une vitesse d'abattement de  $807 \pm 62$  mg d'O<sub>2</sub>/L/h alors qu'elle est de  $306 \pm 40$  mg d'O<sub>2</sub>/L/h pour les contrôles, soit une consommation de DCO due aux Biotubas\_e12 de 500 mg d'O<sub>2</sub>/L/h.

La variation linéaire de la vitesse d'abattement avec la hauteur émergée indique que la totalité des 12 cm émergés est bien active, au moins durant la première heure. Si les parties hautes des électrodes émergées étaient moins actives, comme on aurait pu le craindre, la courbe s'infléchirait avec une valeur de pente qui diminuerait entre chaque point. Il est donc envisageable d'augmenter encore la hauteur émergée au-delà de 12 cm pour accroître l'efficacité des biotubas.

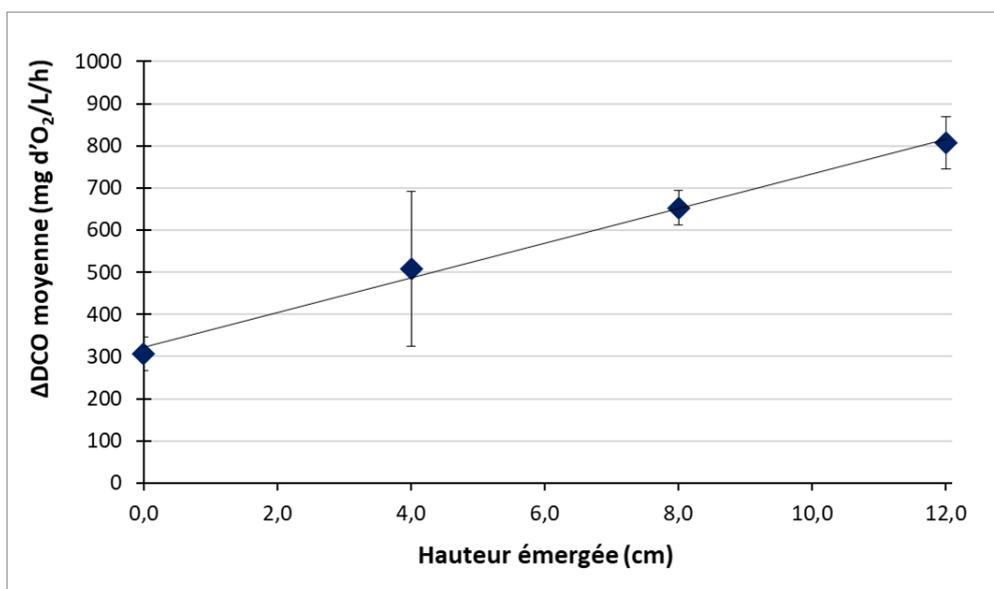


Figure 5.33 : Biotuba avec électrode capillaire émergée en milieu synthétique. Variation de la vitesse d'abattement de la DCO calculée sur 1 heure (valeurs moyennes) en fonction de la hauteur de la cathode émergée ; la hauteur égale à zéro correspond aux contrôles.

### 4.3 Observations aux microscopes

A la fin de cette expérience, des prélèvements du feutre de carbone sont réalisés sur les parties émergées et immergées de chacun des biotubas, c'est-à-dire à chacune des extrémités du feutre, comme décrit dans la partie 3.3.2 du chapitre 2. Les observations au microscope électronique à balayage (MEB) montrent que les deux parties sont colonisées mais la densité cellulaire semble plus importante au niveau de la partie basse immergée avec des amas beaucoup plus denses en cellules bactériennes visualisés sur les fibres du feutre (Figure 5.34). Des bactéries sont présentes à la surface de la partie haute émergée mais elles sont beaucoup plus rares et dispersées à la surface des fibres de l'électrode.

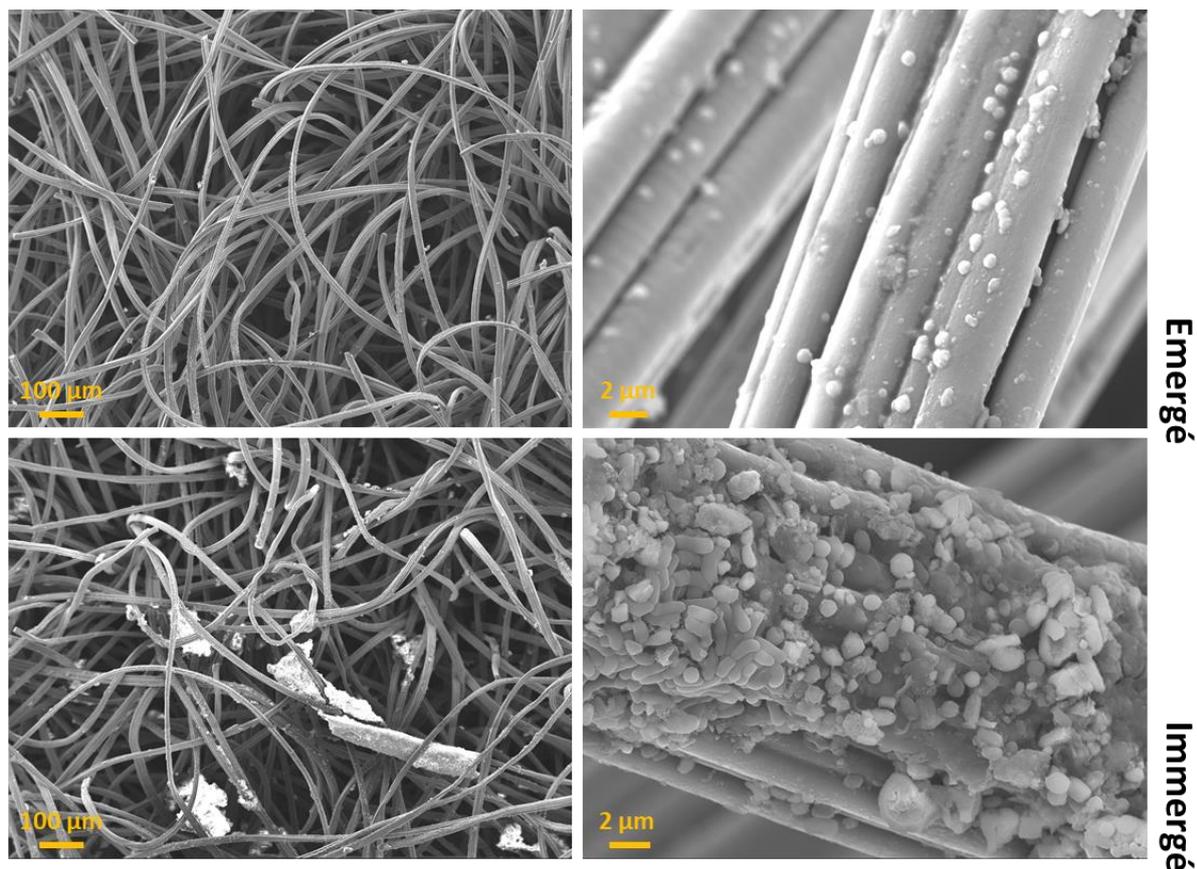


Figure 5.34 : Biotuba avec électrode capillaire émergée en milieu synthétique. Images MEB des parties immergées et émergées d'un biotuba avec électrode capillaire émergée de 8 cm.

D'autres observations sont réalisées au microscope à épifluorescence, à raison de 4 échantillons par biotuba, deux de la partie immergée et deux de la partie émergée, et 6 acquisitions aléatoires par échantillon, pour tenter d'être représentatif. Les échantillons sont les mêmes que ceux utilisés pour les observations au MEB mais ils sont traités différemment, selon le protocole de la partie 3.3.1 du chapitre 2. Les duplicats des Biotubas\_e4 et Biotubas\_e8 ont été observés, mais un seul des Biotubas\_e12 l'a été en raison d'un problème technique lourd survenu sur le microscope. Les images suggèrent une quantité de biofilm plus importante sur les échantillons provenant des parties immergées (Figure 5.35). Cependant, des variations importantes sont observées entre les différents spots observés pour un même échantillon.

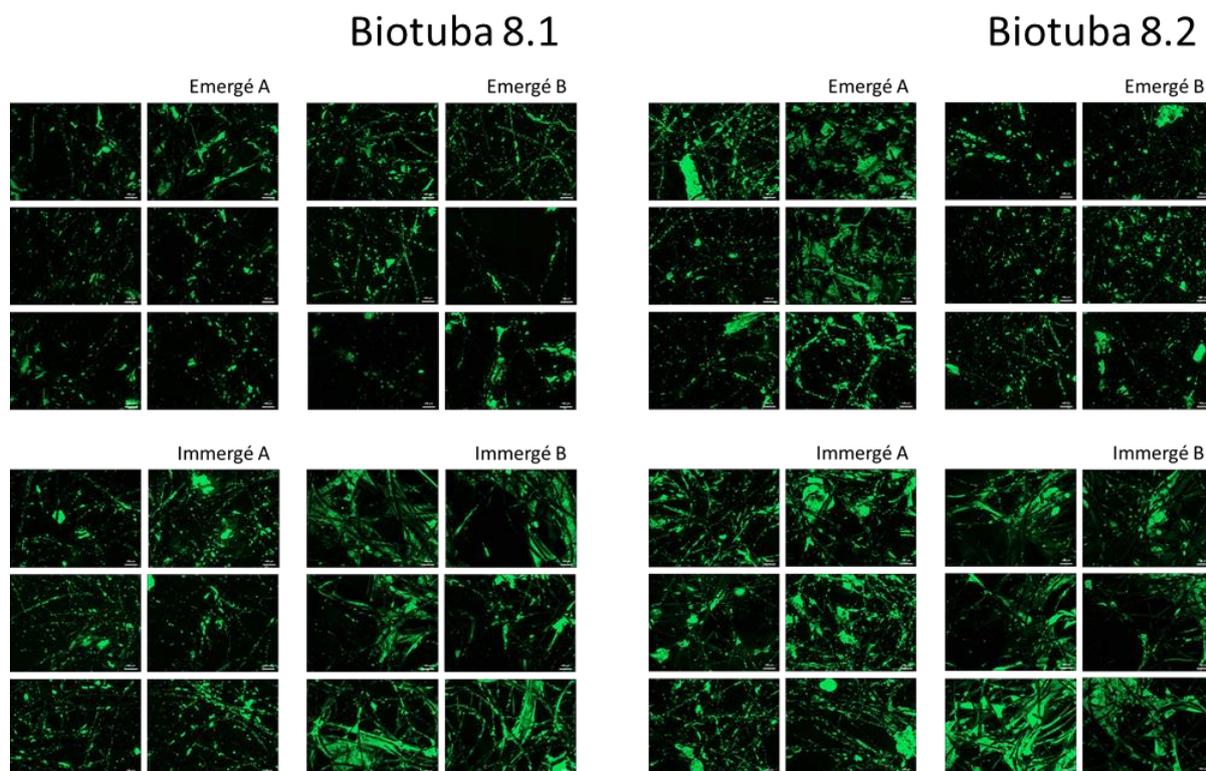


Figure 5.35 : Biotuba avec électrode capillaire émergée en milieu synthétique. Colonisation par le biofilm à la surface de deux biotubas avec électrode capillaire émergée de 8 cm obtenu par microscopie à épifluorescence.

Les moyennes des taux de recouvrement du biofilm ont été calculées à partir de 6 photographies effectuées sur 2 prélèvements pour chaque duplicat, soit un ensemble de 24 mesures pour les Biotubas\_e4 et Biotubas\_e8. Les moyennes ne portent que sur 12 mesures pour le Biotuba\_e12 dont un seul duplicat a été traité. Dues à la méthode, les incertitudes sont très importantes mais des tendances peuvent tout de même être observées (Figure 5.36). Le taux de recouvrement est plus important pour le biofilm immergé que pour le biofilm émergé, ce qui confirme les premières conclusions issues des observations au MEB. Les valeurs pour le biofilm émergé ne dépendent pas significativement de la hauteur émergée (entre  $8 \pm 8\%$  et  $13 \pm 12\%$ ). En revanche, le taux de recouvrement de la partie immergée varie proportionnellement à la hauteur émergée, de  $14 \pm 6\%$  pour les Biotubas\_e4 à  $25 \pm 7\%$  pour les Biotubas\_e12. Il semble donc qu'une plus grande surface émergée favorise le développement du biofilm sur la partie immergée.

Plus la hauteur émergée est importante, plus elle permet au biofilm de se développer sur la partie anodique immergée. Le biotuba joue donc parfaitement son rôle en assurant le développement du biofilm anodique grâce à la réduction déportée de l'oxygène. En outre, cette

observation corrobore la proportionnalité observée entre les vitesses d'abattement de la DCO et la hauteur de la partie émergée des biotubas (Figure 5.33).

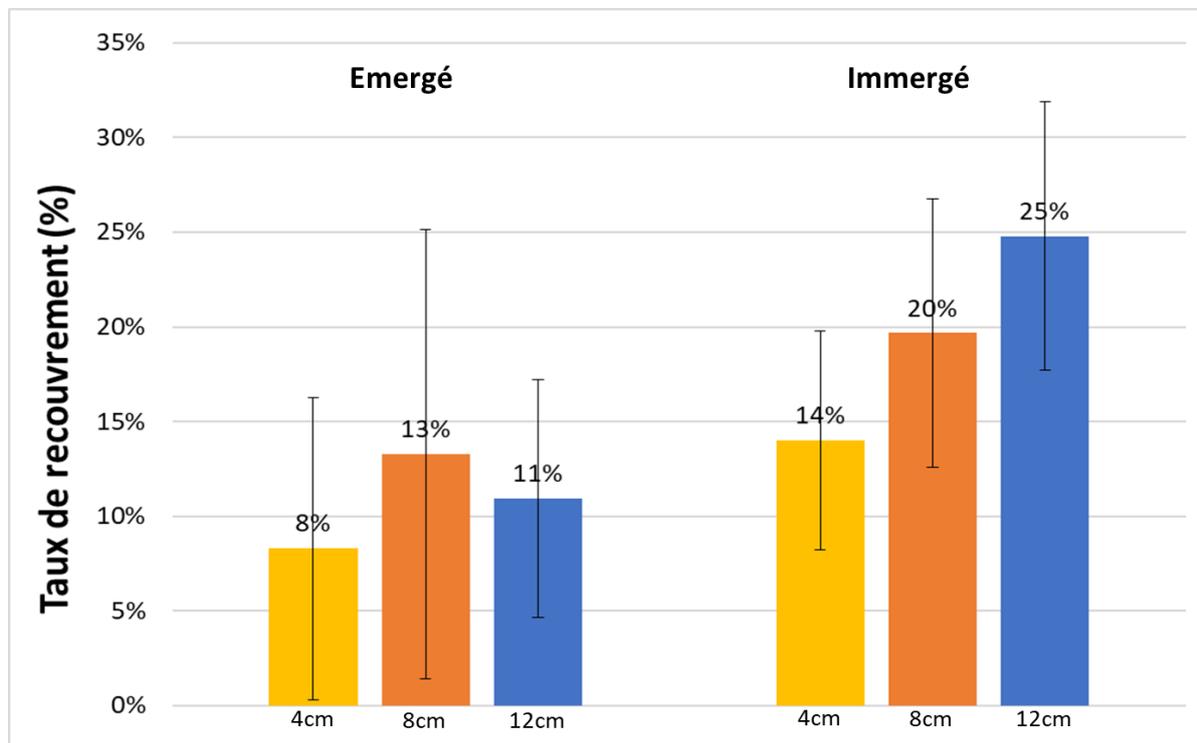


Figure 5.36 : Biotuba avec électrode capillaire émergée en milieu synthétique. Taux de recouvrement du matériau d'électrode par un biofilm microbien sur les parties émergées et immergées des biotubas, calculés à partir de l'analyse des images de microscopie à épifluorescence

#### 4.4 Analyses des populations microbiennes

De la même manière que pour la microscopie à épifluorescence, l'analyse des populations microbiennes a été réalisée sur quatre échantillons d'électrode, deux pour la partie émergée et deux pour la partie immergée, pour chacun des biotubas. Des échantillons de biofilm immergés ont également été collectés sur la grille de plastique des contrôles, de même que des échantillons de milieu réactionnel avant le changement de milieu (J14) et à la fin de l'expérience. Les abondances relatives sont présentées au niveau taxonomique de la classe pour des questions de lisibilité (Figure 5.37). Les échantillons étaient composés d'un total de 838 OTU dont les six classes majoritaires étaient les *Bacilli*, les *Bacteroidia*, les *Gammaproteobacteria*, les *Clostridia*, les *Alphaproteobacteria* et les *Negativicutes*.

166 OTU ont été identifiées jusqu'à la classe comme appartenant aux *Bacilli*, une classe du phylum des *Firmicutes*. 42 de ces OTUs ont été identifiées comme appartenant au genre *Bacillus*, connu pour comprendre des espèces électroactives (Logan et al., 2019). La classe des *Bacilli* est faiblement présente dans les échantillons de milieu de culture à J14, avec une abondance inférieure à 5% dans un tiers des cas. Cette classe est présente, avec une abondance relative de  $11 \pm 4\%$  à  $30 \pm 16\%$  dans tous les échantillons de biofilm et de milieu de culture final sauf pour le Contrôle 1.

La classe des *Bacteroidia*, du phylum des *Bacteroidota*, est présente dans tous les échantillons mais elle est majoritaire dans le biofilm immergé avec des abondances relatives allant de  $27 \pm 7\%$  à  $53 \pm 8\%$ . Sur les 74 OTUs de cette classe et les 21 genres affiliés, 5 appartiennent au genre des *Cloacibacterium* et 16 à celui des *Lentimicrobium* dont l'abondance atteint  $48 \pm 1\%$  dans les Biotubas\_e12. Les *Cloacibacterium* étaient caractéristiques des échantillons de biofilm pour les électrodes bidirectionnelles décrits dans le chapitre 3 (Article 3). Ces bactéries anaérobies facultatives ne souffrent ni du manque ni de l'excès d'oxygène. Elles sont connues comme électroactives et contribuent à la dégradation de composés organiques (Gao et al., 2020; Hassan et al., 2018; Zheng et al., 2019).

Les *Gammaproteobacteria* sont présentes dans tous les échantillons (94 OTUs) sauf le milieu à J14. Cette classe est majoritaire dans les contrôles pour le milieu de culture final ( $34 \pm 13\%$ ) et le biofilm ( $43 \pm 13\%$ ). Elle est présente à 83% dans un des Biotuba\_e12. Pour les autres biotubas, l'abondance est de  $29 \pm 12\%$  pour le biofilm émergé,  $20 \pm 12\%$  pour le milieu final, et  $10 \pm 16\%$  pour le biofilm immergé. Le genre dont l'abondance est majoritaire est *Pseudomonas* dans les échantillons de biofilm et *Acinetobacter* dans les échantillons de milieu. Ces deux genres ont déjà été décrits (chapitre 3 – Article 3) comme hébergeant des bactéries aérobies ou anaérobies facultatives, capables d'assurer des transferts d'électrons extracellulaires en conditions aérobies.

La classe des *Clostridia* est affiliée à 259 OTUs mais son abondance relative dans les échantillons reste faible. Elle est plus représentée dans les milieux de culture avec  $20 \pm 11\%$  à J14 et  $26 \pm 7\%$  dans le milieu final. Absente des biofilms des contrôles, elle représente  $14 \pm 4\%$  des échantillons de biofilm émergés et  $24 \pm 5\%$  de ceux immergés. Les deux genres majoritaires de cette classe sont les *Sedimentibacter* et les *Sporacetigenium*. Les *Negativicutes*, du phylum des *Firmicutes*, sont présents en grandes quantités dans le milieu J14 des contrôles ( $66 \pm 6\%$ ) et des Biotubas\_e4 ( $60 \pm 12\%$ ). Leur abondance est inférieure à 10% dans tous les autres cas. Le genre majoritaire de cette classe est celui des *Pelosinus* dont l'abondance atteint 56% dans le milieu de culture du Contrôle 2. Les *Sedimentibacter*, les *Sporacetigenium*, et les *Pelosinus* ne sont pas connus comme hébergeant des espèces

électroactives, ce qui pourrait expliquer leur abondance plus importante dans le milieu de culture par rapport au biofilm.

Les *Alphaproteobacteria* (63 OTUs) ne sont présentes que dans les échantillons de biofilm émergé avec une abondance qui décroît lorsque la hauteur émergée augmente : 18 ±5%, 13 ±7% et 9 ±4% pour les électrodes émergées de 4, 8 et 12 cm, respectivement. Le genre majoritaire de cette classe est celui des *Brevundimonas*. Ce genre était aussi présent dans les échantillons au jour 28 des électrodes bidirectionnelles (chapitre 3 – Article 3), même si le milieu et l'inoculum étaient différents. Ce genre appartient à la famille des *Caulobacteraceae*, déjà observés dans des procédés électro-microbiens d'oxydation dans le traitement de l'eau (Bennani et al., 2015). Des espèces de *Brevundimonas* ont aussi déjà été décrites comme capables de transferts extracellulaires d'électrons de ou vers des minéraux semi-conducteurs (Ren et al., 2019).

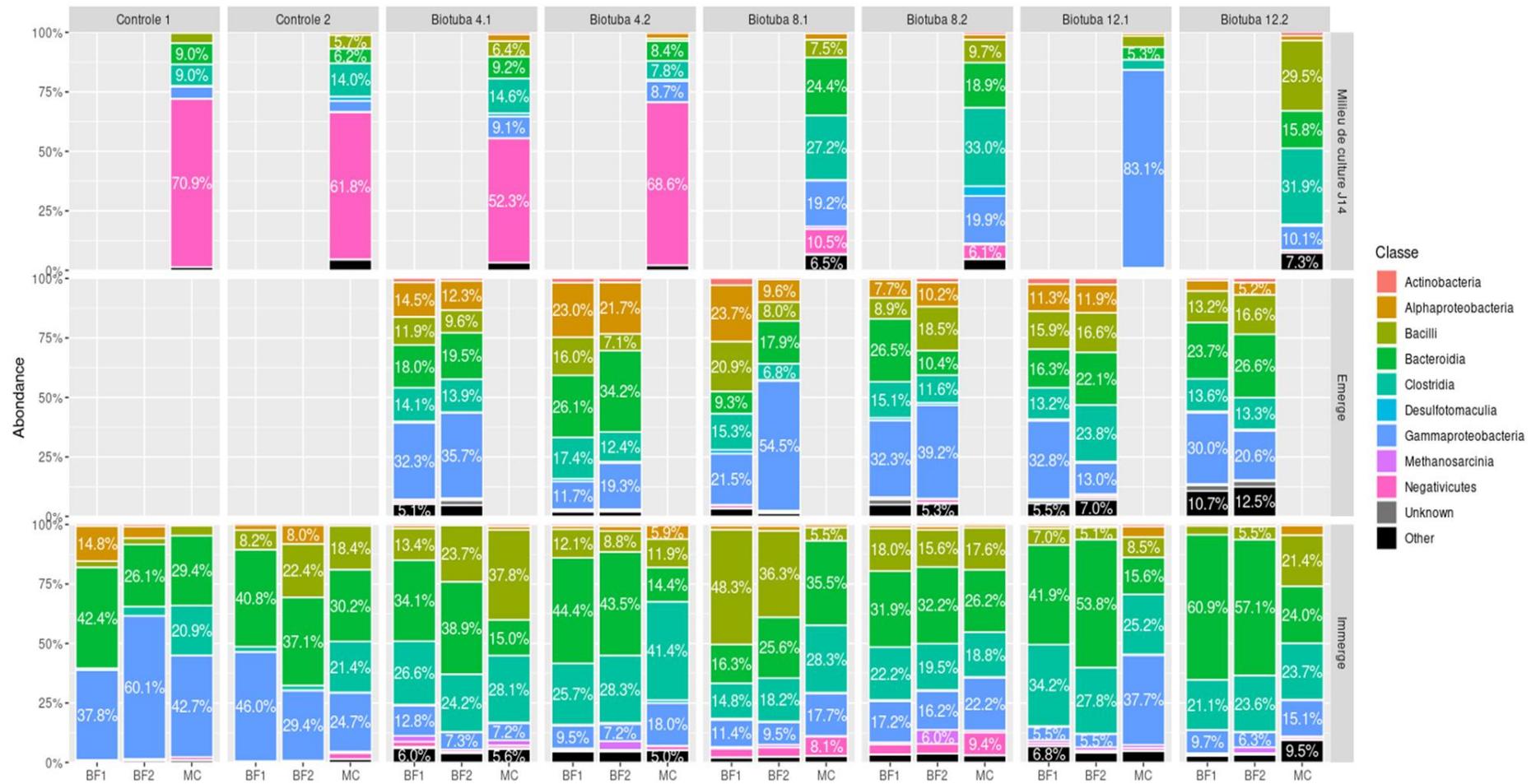


Figure 5.37 : Abondance relative des classes. Les colonnes présentent deux échantillons de biofilms (BF1 et BF2) et un échantillon de milieu de culture final (MC) pour les Contrôles et les Biotubas. Les lignes correspondent au milieu de culture à J14, et aux échantillons prélevés dans la partie émergée et immergée de l'électrode. Il n'y a pas d'échantillon de biofilm émergé pour les contrôles.

Au niveau de la classe, celles identifiées ici sont similaires à celles observées pour les électrodes bidirectionnelles ou pour les biotubas avec aération séquentielle, avec notamment les *Bacilli*, les *Bacteroidia*, les *Gammaproteobacteria*, les *Clostridia*, les *Alphaproteobacteria*. Cela peut s'expliquer par le fait qu'il s'agit de classes bactériennes ubiquitaires (Logan et al., 2019), présentes dans un grand nombre d'écosystèmes dont les boues activées (inoculum des chapitres 3 et 4) et le lombricompost (utilisé ici).

Au niveau des genres bactériens, 4 genres, *Cloacibacterium*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* et *Brevundimonas*, ont déjà été observés dans les échantillons d'électrodes bidirectionnelles, malgré un inoculum et une configuration différente. *Pseudomonas* et *Acinetobacter* sont des genres présents dans de nombreux écosystèmes. *Cloacibacterium* et *Brevundimonas* semblent capables de s'adapter à différentes conditions.

En revanche, les genres bactériens identifiés sont totalement différents de ceux qui ont été observés auparavant pour les biotubas avec aération séquentielle. Cette nouvelle configuration avec électrode émergée, et/ou le nouvel inoculum, le lombricompost, induisent une sélection d'espèces bactériennes différentes de celles colonisant les biotubas aérés.

Il n'y a pas de différence significative entre les réacteurs selon la hauteur d'électrode émergée. Celle-ci ne semble donc ne pas avoir d'influence sur la nature des populations microbiennes. Au contraire, la localisation du biofilm (émergé ou immergé) et le type d'échantillon (milieu de culture ou biofilm) présentent des différences de population notables. Cette tendance se confirme sur les analyses en composante principale (ACP) réalisées sur l'ensemble des données issues du séquençage de la région hyper variable V4-V5 du gène de l'ARNr 16S. La composante 1, qui représente 28% de la variance entre les échantillons, sépare ces derniers selon la localisation du biofilm, émergé ou immergé, alors que la composante 2, représentant 16% de la variance, les sépare selon le type d'échantillons (biofilm ou milieu) (Figure 5.38A). Il faut cependant noter que les biofilms immergés des contrôles se distinguent de cette ségrégation puisque, selon la composante 1, ils semblent plus proches des échantillons de biofilms émergés des biotubas.

L'ACP fait apparaître 4 groupes d'échantillons sur la représentation graphique des individus : les milieux de culture (J14 et finaux), les biofilms émergés des biotubas, les biofilms immergés des biotubas et les biofilms des contrôles (Figure 5.38A). Selon la composante 1, représentant la localisation de l'échantillon, les échantillons de milieux de culture et de biofilms immergés sont regroupés d'un côté alors que les échantillons de biofilms émergés sont étonnamment plus proches des contrôles. Selon la composante 2, représentant le type

d'échantillon, les échantillons émergés et immergés des biotubas sont regroupés d'un côté et les contrôles et les milieux de l'autre.

Les cercles de corrélation relient les modèles observés, c'est-à-dire la répartition des individus en fonction des conditions, aux abondances des OTUs identifiées chez ces individus (Figure 5.38B). Corrélés aux barplots, ces cercles montrent que les microorganismes les plus abondants sont aussi ceux ayant le plus d'influence sur la variance entre les échantillons. Les OTUs caractéristiques des milieux à J14 appartiennent à la classe des *Negativicutes*. Les *Alphaproteobacteria* et *Gammaproteobacteria* sont caractéristiques des échantillons de biofilms émergés des biotubas mais aussi des biofilms des contrôles. La classe des *Bacilli* est caractéristique des échantillons de biofilms émergés du biotuba. Enfin, les *Bacteroidia* et *Clostridia* sont caractéristiques des biofilms immergés et du milieu de culture.

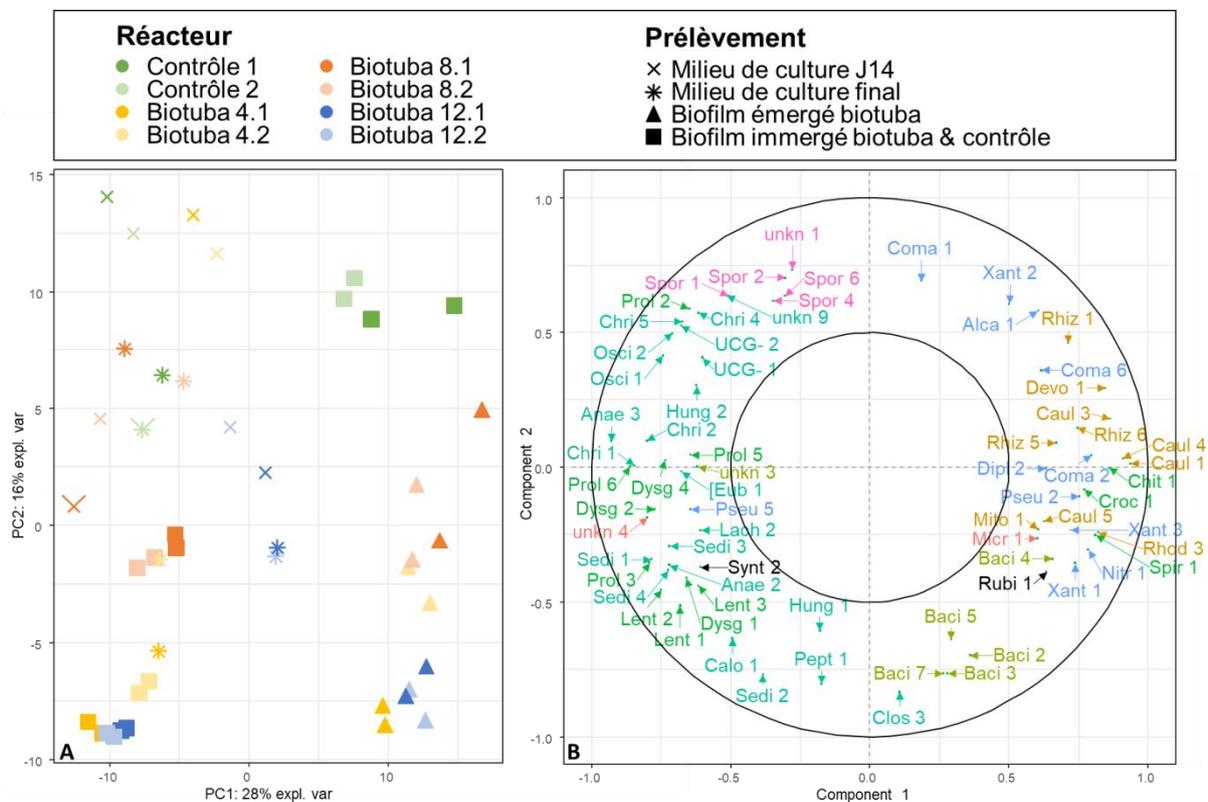


Figure 5.38 : Comparaison des échantillons basée sur la localisation du biofilm (émergé ou immergé) et le type d'échantillon (milieu de culture ou biofilm). Représentation graphique des individus (A) et cercle de corrélation (B) ; NB : Les OTU sur les cercles de corrélation (B) sont nommés et colorés selon la classe bactérienne avec les mêmes couleurs que celles utilisées dans la Figure 5.37.

## 4.5 Conclusion

Le potentiel des électrodes complètement immergées se stabilise à  $-0,45 \pm 0,03$  V vs ECS au bout de 0,5 jour. Après émergence partielle, celui-ci remonte à  $-0,16 \pm 0,02$  V vs ECS. Ces valeurs sont similaires à celles observées pour le biotuba avec aération séquentielle lors des phases avec et sans aération (chapitre 4). L'émergence partielle de l'électrode permet donc de porter le biotuba aux mêmes valeurs de potentiel que l'aération forcée.

Les deux premières phases en batch n'ont pas donné de résultats satisfaisants. Pour la première il est probable que les réacteurs Biotuba\_e8 et Biotuba\_e12 aient oxydé une quantité importante d'acétate entre l'émergence partielle et le batch 1, entraînant une chute de pH qui a inhibé le biofilm. En effet, le milieu n'a pas été changé avant le premier batch, seule la concentration d'acétate a été ajustée. Le second batch, qui a lieu juste après le changement de milieu, n'a pas été exploitable car la vidange des réacteurs a certainement fortement impacté les biotubas.

Le troisième batch a enfin été concluant et a apporté des résultats exploitables. Les vitesses moyennes d'abattement de la DCO croissent proportionnellement à la hauteur de la partie de l'électrode qui est émergée. Ces parties d'électrode émergées travaillent vraisemblablement comme des cathodes et réduisent l'oxygène. Les cathodes émergées de 12 cm assurent indirectement une vitesse d'abattement de  $807 \pm 62$  mg d'O<sub>2</sub>/L/h alors qu'elle est de  $306 \pm 40$  mg d'O<sub>2</sub>/L/h pour les contrôles, soit une vitesse d'abattement de DCO due au biotuba de 500 mg d'O<sub>2</sub>/L/h lorsque 12 cm sont émergés. La linéarité de la relation qui relie la vitesse d'abattement avec la hauteur d'émergence indique en outre que la vitesse pourrait certainement être encore accrue en augmentant la hauteur émergée.

Les taux de recouvrement de la surface des électrodes par les biofilms sont similaires pour tous les échantillons émergés, mais le taux de recouvrement de la partie immergée varie proportionnellement à la hauteur émergée. Il faut garder en mémoire la valeur élevée de l'incertitude sur ces mesures mais la tendance est cependant nette. Il semble donc qu'une plus grande surface émergée favorise le développement du biofilm anodique sur la partie immergée.

Les classes bactériennes les plus abondantes, notamment dans les échantillons d'électrodes immergées, *Bacteroidia*, *Gammaproteobacteria* et *Clostridia*, sont similaires à celles identifiées pour les électrodes bidirectionnelles ou les biotubas avec aération séquentielle, malgré un inoculum différent. Aucun genre bactérien commun n'est cependant observé entre les biotubas aérés (chapitre 4) et les biotubas avec électrode émergée (chapitre

5), cela peut être dû à la différence d'aération et/ou d'inoculum. En revanche, quatre des genres bactériens identifiés sur les biotubas avec électrode émergée, *Cloacibacterium*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* et *Brevundimonas* avaient déjà été identifiés sur les électrodes bidirectionnelles, même avec un inoculum différent.

Il n'y a pas de différence significative entre les populations microbiennes lorsque la hauteur d'électrode émergée varie. Au contraire, la localisation du biofilm (émergé ou immergé) représente 28% de la variance entre les échantillons et le type d'échantillon (milieu de culture ou biofilm) représente 16% de la variance.

## 5 Conclusion du chapitre 5

Après la description des objectifs, la seconde partie de ce chapitre a permis de déterminer la durée minimale en OC nécessaire pour initier le développement d'un biofilm anodique. Une période de 6 jours en OC semble être le minimum pour aboutir à une catalyse de l'oxydation de la matière organique.

La troisième partie consacrée à la partie cathodique avec des électrodes émergées, a montré qu'une étape de trempage préalable était indispensable pour initier la mouillabilité du feutre et qu'un trempage d'une semaine permet d'obtenir une augmentation significative du courant de réduction de l'oxygène. Après la phase de trempage, les performances de réduction sont meilleures pour les électrodes émergées lorsqu'elles sont laissées 6 jours en circuit ouvert plutôt que polarisés. Un courant maximal de  $-2,69 \pm 0,55$  mA est obtenu à  $-0,5$  V vs ECS dans le milieu tampon phosphate (10 mM, pH 7,4) lorsque sa conductivité est augmentée de 0,2 S/m (valeur proche de la conductivité des eaux usées) à 1,2 S/m. Le fait qu'il suffise de laisser les électrodes en circuit ouvert pour former les cathodes de réduction de l'oxygène est une bonne nouvelle dans un contexte applicatif, en revanche, l'effet de la conductivité ionique du milieu est moins enthousiasmant car il souligne la difficulté à mettre en œuvre des procédés électro-microbiens dans des eaux usées.

En présence d'inoculum et dans un milieu constitué d'eaux usées synthétiques, la concentration en oxygène dissous est nulle car il est consommé par les bactéries aérobies en solution. Les électrodes immergées conservent dans ces conditions une activité anodique tout au long de l'expérience, alors que les électrodes en partie émergées présentent une activité cathodique de réduction de l'oxygène lorsqu'il n'y a plus de matière organique. Les électrodes

émergées parviennent donc à établir un courant cathodique de réduction de l'oxygène dans un milieu chargé en microorganismes, sans recours à une aération.

Dans la quatrième partie, les parties anodique et cathodique sont associées sous la forme d'un biotuba dans un milieu constitué d'eaux usées synthétiques inoculées avec 5% (v/v) de lombricompost. Dans un premier temps, la totalité de l'électrode est immergée une semaine pour initier la formation du biofilm anodique (conformément aux informations issues de la partie 2) et favoriser la capillarité au sein du feutre (conformément aux informations issues de la partie 3). Dans un second temps, une partie est partiellement émergée pour former la cathode.

Les valeurs de potentiel avant et après l'émersion partielle sont similaires à celles observées dans le chapitre 4 pour le biotuba avec aération séquentielle lors des phases avec et sans aération. L'émersion partielle de l'électrode permet donc d'atteindre le potentiel obtenu avec une aération forcée.

Les biotubas avec les cathodes émergées de 12 cm permettent d'accélérer l'abattement de la DCO d'un facteur 2,6 par rapport aux contrôles sans biotuba. La vitesse d'abattement varie linéairement avec la hauteur de la partie émergée du biotuba. Cette linéarité suggère que nous n'avons pas atteint les vitesses d'abattement de la DCO maximales et qu'elles seraient améliorées avec une plus grande hauteur émergée.

Le taux de recouvrement du biofilm est plus élevé sur la partie immergée et est d'autant plus important que la surface émergée est importante. La surface émergée favorise donc le développement du biofilm sur la partie anodique du biotuba. En revanche, la surface d'électrode émergée n'a pas d'impact significatif sur les populations microbiennes. La quantité de biofilm varie donc mais pas sa composition.

Des classes bactériennes ubiquitaires communes avec les électrodes bidirectionnelles et les biotubas aérés sont retrouvées, malgré les différences de conditions et d'inoculum. Des genres communs avec les électrodes bidirectionnelles sont retrouvés mais ils sont totalement différents de ceux identifiés sur les biotubas avec aération séquentielle, probablement à cause de la différence d'inoculum et du type d'accès à l'oxygène (aération ou émersion).

Le résultat majeur de ce chapitre est la démonstration qu'une électrode partiellement émergée permet la formation d'une cathode de réduction de l'oxygène en feutre de carbone pérenne sur 10 jours sans nécessiter de ré-humidification, sur une hauteur d'au moins 12 cm. Cette étude montre également que la cathode contribue au développement du biofilm

anodique. Ce chapitre fait la preuve du concept du biotuba à électrode capillaire émergée dans les eaux usées synthétiques.

Le même type de biotuba sera mis en application dans le chapitre 6 qui suit, cette fois en milieu réel, avec des eaux usées domestiques inoculées avec 5% de boues activées.

***Chapitre 6 : Biotuba avec  
électrode capillaire émergée en  
eaux usées domestiques***



## 1 Objectifs et choix de l'étude

Suite aux chapitres 3 et 4 qui visaient le développement d'un biotuba avec aération séquentielle, le chapitre 5 a ouvert une voie différente mettant en œuvre un biotuba avec une électrode capillaire émergée. Pour cela, les expériences ont été réalisées dans un milieu bien maîtrisé au sein de l'équipe (lixiviat de terreau) car étudié dans le cadre de la thèse de Diana Pocaznoi (Pocaznoi et al., 2012), puis en eaux usées synthétiques. Ce chapitre 6 est également consacré au développement d'un biotuba avec électrode capillaire émergée mais, cette fois, en milieu réel constitué d'eaux usées inoculées avec des boues activées.

La première partie de ce chapitre porte sur la caractérisation électrochimique de la réaction de réduction de l'oxygène d'une électrode capillaire émergée en milieu réel. De la même façon que dans le chapitre 5, mais dans des eaux usées réelles, ces expériences sont réalisées avec un montage classique à trois électrodes afin d'évaluer l'influence d'un trempage préalable et de la hauteur d'émersion sur les performances de l'électrode pour la réduction de l'oxygène.

Grâce à ces premiers résultats et à ceux du chapitre 5, un biotuba avec électrode capillaire émergée est mis en œuvre en milieu réel. La seconde partie du chapitre décrit les résultats en termes de variation de potentiel, d'abattement de la matière organique et de populations microbiennes.

Les détails des montages expérimentaux utilisés dans ce chapitre, les techniques électrochimiques et analytiques, les méthodes d'observation et les protocoles d'analyse des populations microbiennes sont décrits dans le chapitre 2.

## 2 Electrode capillaire en eaux usées

Ces essais utilisent les protocoles suivis dans la partie 3 du chapitre 5 pour étudier la réduction de l'oxygène avec des cathodes capillaires émergées les plus hautes possibles, mais cette fois en milieu réel constitué d'eaux usées inoculées par des boues activées (EU + BA).

Quatre réacteurs « standards » avec un montage à trois électrodes « électrode capillaire émergée 2 » sont utilisés. L'électrode de travail est constituée de feutre de carbone de 2 cm de large et 5 cm de haut. Pour deux réacteurs, l'électrode de travail est en feutre sec, pour les deux autres, le feutre est préalablement trempé une semaine dans le milieu EU + BA.

L'impact de la partie émergée sur la réduction de l'oxygène et son évolution au cours du temps sont déterminés par le tracé de CVs pour 3 hauteurs d'émersion : l'électrode totalement immergée (0 cm), à moitié émergée (2,5 cm) et presque totalement émergée (4,5 cm). Entre les CVs, toutes les électrodes sont totalement immergées et aucun potentiel n'est appliqué. Pour permettre de comparer facilement toutes les CVs, on utilise les valeurs de densité de courant au potentiel de -0,5 V vs ECS. Les densités de courant sont toutes calculées par rapport à la surface totale projetée des électrodes (10cm<sup>2</sup>) et moyennées entre les duplicats.

## 2.1 Conditions opératoires

Les conditions opératoires sont résumées dans le Tableau 6.1.

Tableau 6.1 : Conditions expérimentales communes à l'étude de la capillarité du feutre de carbone en milieu réel.

<b>Montage « Electrode capillaire émergée 2 » (chapitre 2 – partie 2.2.5)</b>			
<b>Réacteurs « standards » en batch (chapitre 2 – partie 2.1.1)</b>	Electrode de travail : feutre de carbone 10 cm <sup>2</sup> + tige en titane		
	Contre électrode : Grille en acier inoxydable		
	Electrode de référence : ECS		
<b>Conditions testées</b>			
<b>Hauteur immergée</b>	5 cm	2,5 cm	0,5 cm
<b>Hauteur émergée</b>	0 cm	2,5 cm	45 cm
<b>Techniques électrochimiques (chapitre 2 – partie 3.1.3)</b>			
<b>CV (J1, J3 et J6)</b>	3 cycles à 5 mV/s de -0,8 à 0,6 V vs ECS		
<b>Milieu de culture + inoculum (chapitre 2 – parties 1.1.1 et 1.1.2)</b>			
<b>EU + BA</b>	500 mL d'eaux usées réelles + 5% (v/v) de boues activées		

## 2.2 Résultats

Les CVs obtenues aux jours 1, 3 et 6 (J1, J3, J6) pour chacun des duplicats, pour les trois configurations d'émersion (0, 2,5 et 4,5 cm), sont présentées sur la Figure 6.1 pour le

feutre sec, et sur la Figure 6.2 pour le feutre préalablement trempé. Le Tableau 6.2 présente les densités de courant moyennes, au potentiel de -0,5 V vs ECS, pour toutes ces CVs.

A J1, le feutre sec produit une densité de courant proportionnelle à la hauteur de feutre immergée. La partie émergée n'est donc pas utilisée. La densité de courant élevée, de  $-0,70 \pm 0,35 \text{ A/m}^2$ , obtenue avec le feutre sec totalement immergé à J1 est due à la présence d'oxygène emprisonné dans le feutre, directement disponible pour la réduction.

A la fin de la première série de mesures, le feutre est laissé totalement immergé jusqu'au jour 3. Cela a permis un mouillage de l'électrode et une initiation de la capillarité et à J3, le comportement des CVs obtenues avec le feutre sec est similaire à celui observé initialement au J1 pour les électrodes préalablement trempées une semaine. Une immersion de 3 jours est donc suffisante pour le développement de la cathode capillaire émergée.

A J6, les performances sont similaires à celles de J3. Les trois jours d'immersions sont donc suffisants.

Lorsque le feutre a été trempé au moins 3 jours, la réduction de l'oxygène est significativement plus importante lorsque les électrodes sont partiellement émergées que lorsqu'elles sont totalement immergées. En immersion complète, la densité de courant n'est que de  $-0,10 \pm 0,05 \text{ A/m}^2$  alors qu'elle est 3 fois plus élevée lorsque les électrodes sont partiellement émergées, sans qu'il n'y ait de différence significative entre une émergence de 2,5 cm ou de 4,5 cm ( $-0,31 \pm 0,08 \text{ A/m}^2$  pour 2,5 cm émergés et  $-0,30 \pm 0,08 \text{ A/m}^2$  pour 4,5 cm émergés).

Comme nous l'avons vu dans le chapitre 3, en présence de matière organique à oxyder, l'oxygène dissout est consommé très rapidement par les bactéries des eaux usées et des boues activées, il est donc probable qu'il n'y ait plus d'oxygène dans le feutre et peu en solution. L'électrode capillaire émergée permet dans ce cas de maintenir tout de même la réduction de l'oxygène, contrairement à l'électrode immergée. Lorsque l'électrode est émergée, elle n'est recouverte que d'un film de liquide très fin, la résistance au transfert de l'oxygène vers le matériau d'électrode et sa consommation au sein du film sont donc moindres que lorsque l'oxygène doit être transporté au sein de la solution contenue dans le réacteur pour atteindre l'électrode.

Les électrodes émergées de 2,5 et 4,5 cm produisent les mêmes densités de courant. Il est donc probable que la hauteur émergée vraiment active soit au plus égale à 2,5 cm.

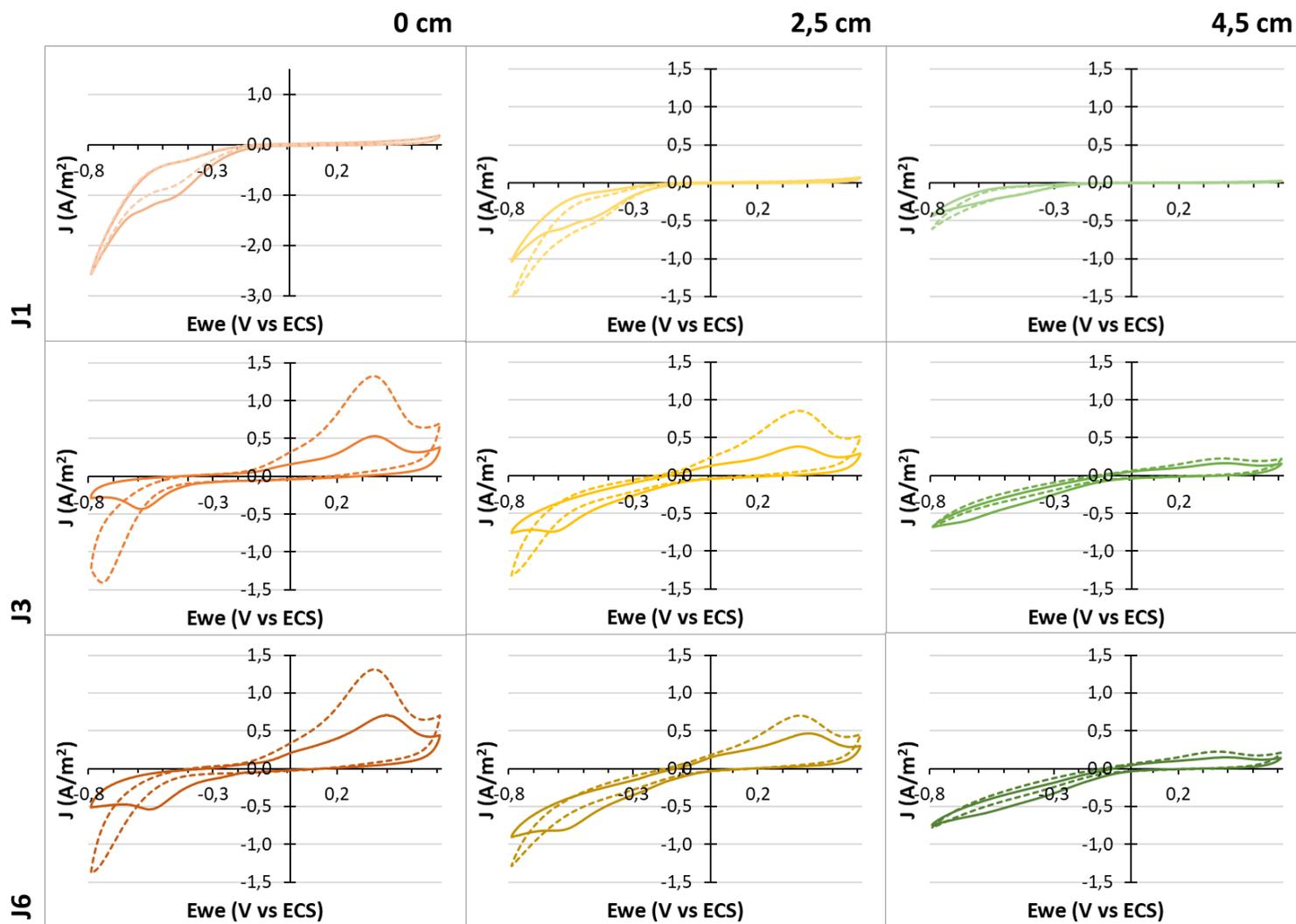


Figure 6.1 : Electrode capillaire en feutre de carbone en milieu EU+BA, feutre sec. CVs à J1, J3 et J6 pour une hauteur émergée de 0, 2,5 et 4,5 cm (duplicats). Vitesse de balayage de 5 mV/s entre -0,8 et +0,6 V vs ECS.

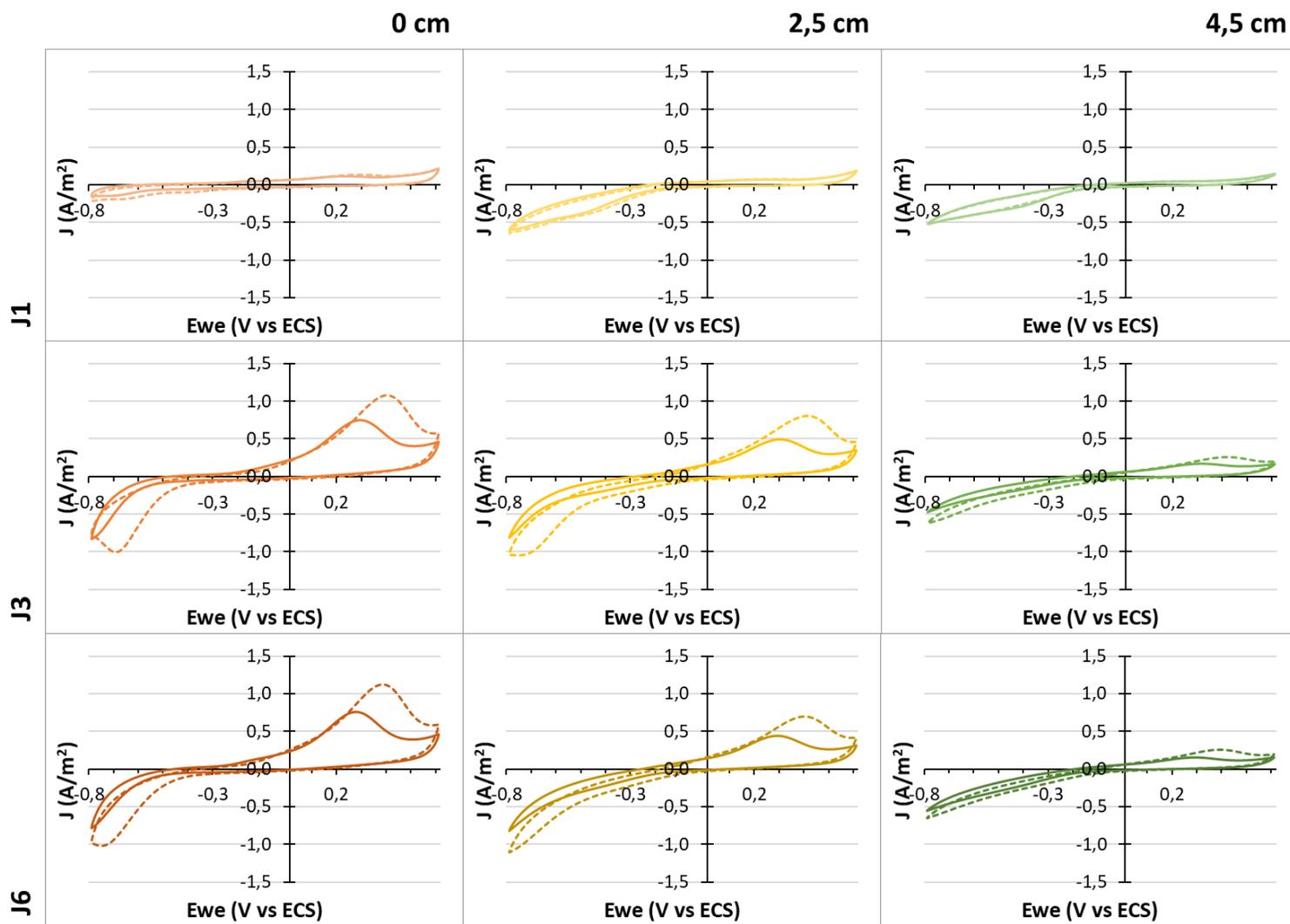


Figure 6.2 : Electrode capillaire en feutre de carbone en milieu EU+BA, feutre préalablement trempé une semaine. CVs à J1, J3 et J6 pour une hauteur émergée de 0, 2,5 et 4,5 cm (duplicats). Vitesse de balayage de 5 mV/s entre -0,8 et +0,6 V vs ECS.

Tableau 6.2 : Electrode capillaire en feutre de carbone en milieu EU+BA. Courants ( $A/m^2$ ) au potentiel de  $-0,5 V$  vs ECS sur les CVs à J1, J3 et J6 pour une hauteur émergée de 0, 2,5 et 4,5 cm.

Jour	Densité de courant ( $A/m^2$ ) au potentiel de $-0,5 V$ vs ECS					
	Feutre sec			Feutre trempé		
	0 mm	2,5 cm	4,5 cm	0 mm	2,5 cm	4,5 cm
J1	$-0,70 \pm 0,35$	$-0,36 \pm 0,21$	$-0,12 \pm 0,07$	$-0,04 \pm 0,05$	$-0,28 \pm 0,12$	$-0,26 \pm 0,09$
J3	$-0,12 \pm 0,11$	$-0,33 \pm 0,14$	$-0,39 \pm 0,10$	$-0,09 \pm 0,09$	$-0,23 \pm 0,12$	$-0,21 \pm 0,07$
J6	$-0,18 \pm 0,18$	$-0,44 \pm 0,17$	$-0,39 \pm 0,10$	$-0,09 \pm 0,08$	$-0,28 \pm 0,11$	$-0,26 \pm 0,07$

## 2.3 Conclusion

Cette première expérience confirme l'intérêt de l'électrode capillaire émergée pour favoriser la réduction de l'oxygène dans un milieu riche en microorganismes. En effet, une émergence de l'électrode de 2,5 ou 4,5 cm a permis d'obtenir des valeurs de courant 3 fois plus importantes à  $-0,5 V$  vs ECS que l'électrode totalement immergée. L'étape préalable de trempage est encore indispensable, mais un trempage de 3 jours dans le milieu semble suffire. Une électrode initialement sèche assure les mêmes performances après trois jours de trempage dans le milieu EU+BA qu'une électrode qui a trempé au préalable une semaine. Les valeurs de courant sont reproductibles entre les séries de mesures. L'électrode maintenue immergée entre chaque série produit, lorsqu'elle est à nouveau émergée, les mêmes densités de courant.

## 3 Biotuba avec électrode capillaire émergée en eaux usées

L'objectif de l'expérience décrite ci-après est la mise en application d'un biotuba avec électrode capillaire émergée en eaux usées. Chaque électrode, d'une hauteur de 26 cm, est composée de deux lanières de feutre de carbone assemblées en croix avec une tige en titane en leur centre (chapitre 2 – partie 2.3). Les électrodes sont placées dans les réacteurs nommés « Biotuba\_26 » (chapitre 2 – partie 2.1.2). Les quatre électrodes utilisées ici sont celles issues de l'expérience Biotuba\_26.3 du chapitre 4 (partie 3.1) et qui avaient été soumises à une

aération séquentielle : deux électrodes avaient été soumises à une aération de la partie haute uniquement, les deux autres à une aération sur toute leur hauteur.

Dans ce chapitre, ces quatre électrodes, bénéficiant d'un biofilm mature formé dans les eaux usées domestiques, sont utilisées dans une configuration d'émersion partielle. Les électrodes sont émergées de 8 cm. Cette hauteur est une sorte de compromis entre les 2.5 cm qui ont été déterminés dans la partie précédente comme la hauteur maximale active de la cathode, et les 12 cm qui semblent insuffisant pour exploiter pleinement le biotuba en milieu synthétique (chapitre 5).

Les émersion sont effectuées sur des périodes plus ou moins longues afin d'observer si au bout d'un certain temps la partie émergée sèche et si cela affecte les performances en termes de réduction de l'oxygène et d'abattement de la DCO.

### **3.1 Conditions opératoires**

Pour l'expérience de biotuba avec aération fréquentielle présentée dans le chapitre 4 (essai Biotuba\_26.3, partie 3.1), deux conditions différentes avaient été appliquées (Figure 6.3 A) :

- une aération en haut pour deux électrodes qui sont nommées ici EI\_1 et EI\_2
- et une aération en bas pour deux autres électrodes nommées ici EE\_1 et EE\_2.

Après les 76 jours de l'expérience précédente, les réacteurs ont été vidés et nettoyés, la tuyauterie de recirculation a été changée et l'expérience décrite ici est démarrée.

Les électrodes EI\_1 et EI\_2 sont immergées totalement et ne sont émergées de 8 cm que lors des phases de suivi de la DCO en batch (Figure 6.3 B). Les électrodes EE\_1 et EE\_2 sont émergées de 8 cm la plupart du temps. Elles ne sont immergées totalement que pendant 48 heures au jour 12, entre le premier et le second batch. Pour chacune des deux configurations, deux réacteurs de contrôles sont utilisés, dans les mêmes conditions, avec une grille de plastique pour remplacer l'électrode.

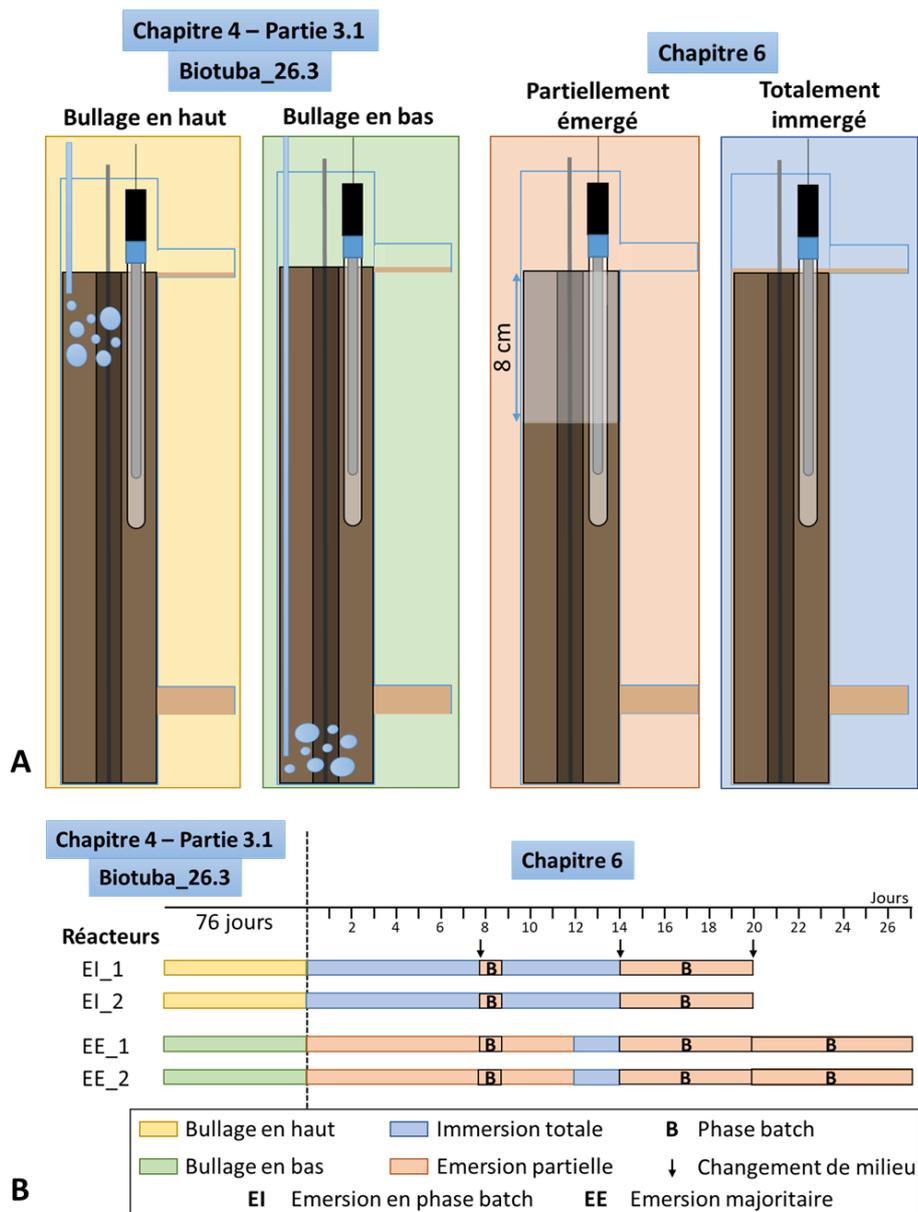


Figure 6.3 : Schéma des configurations de biotubas utilisés et chronologie de l'expérience.

Les conditions expérimentales sont présentées dans le Tableau 6.3. Le milieu initial est constitué d'eaux usées non hydrolysées inoculées avec 5% de boues activées. Avant chaque période de suivi de la DCO, la recirculation est arrêtée, les réacteurs sont vidés sous flux d'azote et remplis avec des eaux usées hydrolysées sans inoculum. La phase de suivi de la DCO se déroule en batch (Figure 6.3 B) puis la recirculation est redémarrée avec un nouveau réservoir d'eaux usées hydrolysés jusqu'au batch suivant. Le batch 1 dure 24 heures et commence au jour 8. Le batch 2 dure 6 jours et démarre au jour 14. EI\_1 et EI\_2 et les contrôles associés sont arrêtés à la fin du batch 2 à cause de leurs performances décevantes.

Le batch 3 qui dure 6 jours à partir du jour 20 ne porte donc que sur EE\_1 et EE\_2 et les contrôles associés.

Pour chacun des biotubas, un contrôle est mis en place avec une grille de plastique de même taille et de même forme que l'électrode. La grille de plastique est totalement immergée ou partiellement émergée de la même façon et au même moment que les électrodes correspondantes.

A la fin de l'expérience, des échantillons d'électrode et de milieu sont prélevés pour réaliser des observations en microscopie électronique à balayage (MEB) et en microscopie à épifluorescence, ainsi que des analyses des populations microbiennes, selon les protocoles décrits dans la partie 3 du chapitre 2.

*Tableau 6.3 : Conditions expérimentales de mise en œuvre des biotubas avec électrode capillaire émergée en milieu réel*

<b>Montage de type biotuba (chapitre 2 - parties 2.1.2 et 2.3)</b>	
<b>Réacteurs « Biotuba_26 »</b>	Electrode de travail : biotubas déjà colonisés de l'expérience Biotuba_26.3 du chapitre 4 - partie 3.1
<b>4 biotubas &amp; 4 contrôles</b>	Electrode de référence : ECS Contrôle : grille de plastique pour simuler l'électrode
<b>Conditions d'émersion</b>	8 cm émergés - 18 cm immergés
<b>Réservoir</b>	Débit de recirculation : 1,5 mL/min – Arrêt de la recirculation
<b>Flacon en verre de 2L</b>	lors des phases de suivi de la DCO en batch
<b>Milieu de culture + inoculum (chapitre 2 - parties 1.1.1 et 1.2.2)</b>	
<b>Milieu initial</b>	Eaux usées réelles non hydrolysées + 5% de boues activés
<b>Changements de milieu</b>	Eaux usées réelles hydrolysées
<b>Volume</b>	27 cm dans le réacteur, 300-350mL
<b>Techniques électrochimiques (chapitre 2 - partie 3.1.2)</b>	
<b>OCP</b>	Mesure toutes les 10 minutes durant toute l'expérience
<b>Observations MEB et épifluorescence, analyses des populations microbiennes (chapitre 2 - parties 3.3 et 3.4)</b>	

## 3.2 Résultats électrochimiques et performances d'abattement

Les huit premiers jours, en recirculation, l'un des biotubas avec électrode capillaire émergée de 8 cm, EE\_1 a un potentiel stable de  $-0,14 \pm 0,01$  V vs ECS similaire aux potentiels observés en émergence partielle dans le chapitre 5. Une légère diminution est observée pour EE\_2 au cours de la période d'émergence dont le potentiel passe de  $-0,11$  V vs ECS à la fin du jour 1 à  $-0,17$  V vs ECS au jour 8. Les biotubas avec électrode totalement immergée (EI\_1 et EI\_2) ont un potentiel qui a tendance à augmenter sur la période, d'une valeur de  $-0,46 \pm 0,01$  V vs ECS au jour 1 à une valeur de  $-0,41 \pm 0,03$  V vs ECS au jour 8. Ces valeurs restent proche des valeurs observées en immersion complète dans le chapitre 5 (Figure 6.4).

Au jour 8, les biotubas EI\_1 et EI\_2, jusque-là immergés, sont émergés de 8 cm pendant les 24 heures du batch 1. Leur potentiel augmente légèrement et se maintient à une valeur moyenne de  $-0,35 \pm 0,01$  V vs ECS.

Les potentiels des biotubas EE\_1 et EE\_2 chutent au début du batch jusqu'à une valeur de  $-0,21 \pm 0,04$  V vs ECS, probablement à cause du changement de milieu sous azote. Cette perturbation semble mineure puisque le potentiel remonte ensuite à sa valeur initiale. Le potentiel moyen sur la période est de  $-0,18 \pm 0,03$  V vs ECS, une valeur significativement plus élevée que pour EI\_1 et EI\_2.

Les potentiels plus élevés de EE\_1 et EE\_2 se rapprochent des valeurs observées pour des biotubas avec électrode capillaire émergée, permettant l'abattement de la matière organique et la réduction de l'oxygène dans le chapitre 5. Ces potentiels plus élevés sont probablement le signe d'un biotuba plus performant.

Lorsque EE\_1 et EE\_2 sont immergées totalement, au jour 12, leur potentiel chute à des valeurs respectives de  $-0,35 \pm 0,02$  V vs ECS et  $-0,19 \pm 0,08$  V vs ECS.

Durant le batch 2 tous les biotubas sont émergés de 8 cm. Les potentiels de EE\_1 et EE\_2 chutent alors à nouveau au début du batch à  $-0,24 \pm 0,05$  V vs ECS à cause du changement de milieu sous azote puis se stabilise à  $-0,15 \pm 0,05$ .

Le potentiel de EI\_1 et EI\_2 augmente tout au long de l'expérience, au cours des batches successifs, d'une valeur initiale de  $-0,42 \pm 0,03$  V vs ECS à une valeur finale de  $-0,32 \pm 0,04$  V vs ECS. Cependant, cette valeur reste plus faible que celle d'EE\_1 et EE\_2, correspondant au potentiel des biotubas émergés performants du chapitre 5. En effet, un

biotuba est d'autant plus performant qu'il fonctionne à un potentiel élevé. Les biotubas EI\_1 et EI\_2 ne présentant pas de résultats satisfaisants, ils sont arrêtés à la fin du batch 2.

Les biotubas EI\_1 et EI\_2 ont été formés au préalable avec une aération au fond du réacteur (chapitre 4, partie 3.1). Il est probable que les biofilms formés sous aération séquentielle sur toute la hauteur n'aient pas supporté les conditions d'immersion complète sans aération.

Pour le 3<sup>ème</sup> et dernier batch, il ne reste que EE\_1 et EE\_2, émergés depuis la fin du jour 13. Encore une fois, le potentiel chute à une valeur moyenne de  $-0,28 \pm 0,09$  V vs ECS avant de remonter et de se stabiliser à une valeur de  $-0,12 \pm 0,06$  V vs ECS.

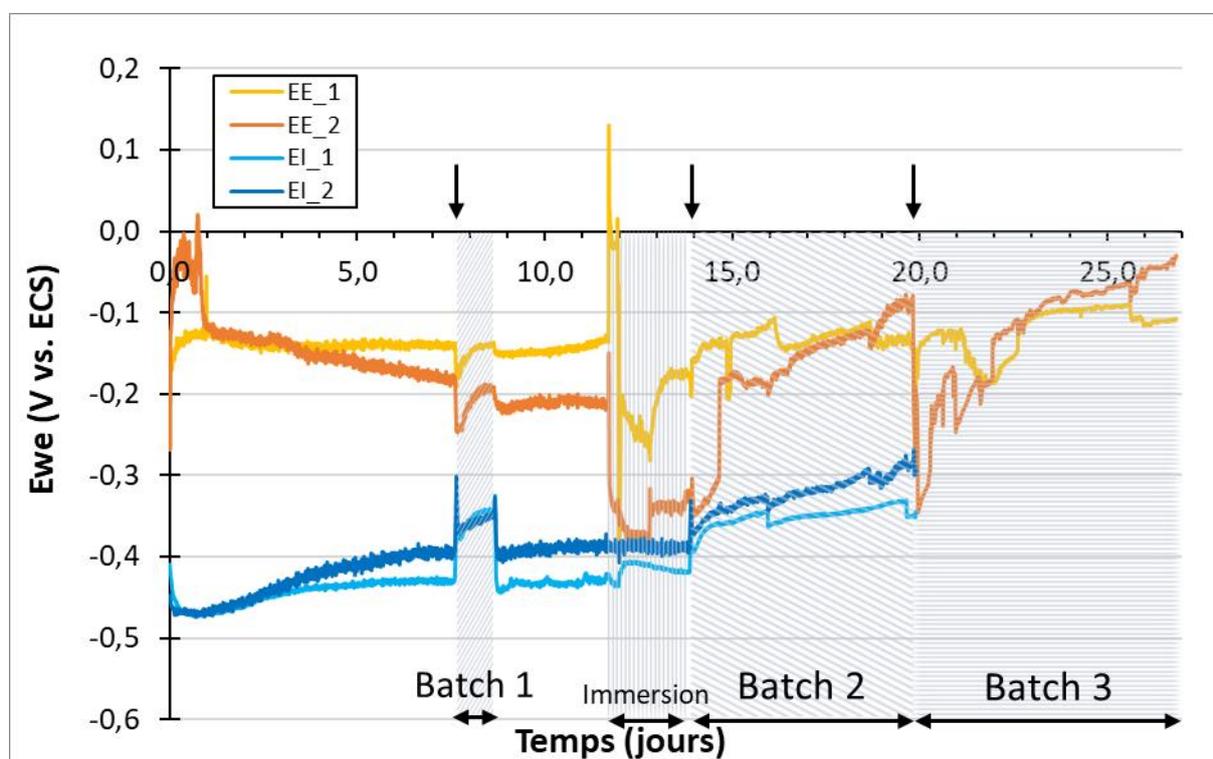


Figure 6.4 : Biotubas avec électrode capillaire émergée en eaux usées. Suivi de l'OCP des biotubas en fonction du temps (duplicats). Les « batch » sont les périodes de suivi de la DCO. La période notée « immersion » indique la phase d'immersion des biotubas EE. Les flèches correspondent aux changements de milieu.

Comme cela pouvait être prévu avec les valeurs de potentiel faibles, EI\_1 et EI\_2, émergés uniquement lors des phases batch, donnent un abattement de DCO nul de  $-2 \pm 3\%$  pour le batch 1, qui a duré 24 heures. La valeur négative peut-être liée aux incertitudes de la mesure et du prélèvement des analyses de DCO soluble, évaluées à  $\pm 7$  et  $\pm 5$  mg d'O<sub>2</sub>/L,

respectivement (chapitre 3, partie 2.2.2). Elle peut aussi être due à une hydrolyse de la DCO particulaire dans les eaux usées, augmentant la DCO soluble (chapitre 3, partie 2.2.1). Les contrôles ont un abattement de  $20 \pm 5\%$  sur cette période, qui peut être lié à une entrée d'oxygène lors du changement de milieu ou lors de l'émersion partielle de la grille de plastique. De plus, un biofilm s'est développé sur la grille de plastique, restée totalement immergée depuis le début de l'expérience. Il est possible que ce biofilm, alors émergé lors du batch 1, ait favorisé l'accès à l'oxygène, à la manière d'un traitement des eaux usées avec un biofilm fixé sur disque rotatif (Shuiliang Chen et al., 2019). Il n'est alors pas question d'électroactivité mais la rotation du support permet une oxygénation du biofilm, favorable à la dégradation de la matière organique.

Pour le batch 2, EI\_1 et EI\_2 présentent un abattement de  $15 \pm 6\%$  au bout de 6 jours, cette valeur plus importante que pour le premier batch pourrait confirmer une adaptation du biofilm au cours de l'expérience, comme le suggère l'augmentation lente du potentiel. L'abattement dans les contrôles est à nouveau plus important que dans les biotubas avec une valeur de  $57 \pm 3\%$  au bout de 6 jours. Ces résultats confirment que EI\_1 et EI\_2 n'ont pas permis la formation de biotubas partiellement émergés performants. Ces réacteurs sont arrêtés au jour 19, à la fin du batch 2.

EE\_1 et EE\_2, majoritairement émergés, en accord avec l'évolution du potentiel, donnent des résultats beaucoup plus intéressants (Figure 6.5). Ces biotubas ayant été formés avec une aération uniquement en partie haute (chapitre 4), les biofilms présentaient déjà une partie basse anaérobie et une partie haute aérobie qui deviennent ici les parties émergés et immergés. Pour le batch 1, ces biotubas ont permis un abattement de  $15 \pm 3\%$  contre  $0 \pm 3\%$  pour les contrôles. Ici les grilles de plastique des contrôles relatifs à EE\_1 et EE\_2 étaient en partie émergées dès le départ, aucun biofilm n'a donc pu croître sur la partie émergée et l'abattement est nul.

Le batch 2 est réalisé après que les biotubas EE aient subi 48 heures d'immersion. L'abattement est de  $24 \pm 3\%$  au bout de 24 heures pour les biotubas, et de  $15 \pm 7\%$  pour les contrôles. Pendant les 48 heures d'immersion, les grilles de plastique des contrôles ont aussi été immergées, là encore une immersion puis émersion de la grille de plastique a entraîné une amélioration de l'abattement pour les contrôles. Il est possible qu'une entrée d'oxygène ait été provoquée par les manipulations de la grille et le changement de milieu ou qu'un biofilm émergé se soit développé sur la grille de plastique, favorisant aussi l'abattement de la matière organique. Les abattements des contrôles restent toutefois moindres que ceux des biotubas. L'abattement semble se stabiliser entre le jour 2 et le jour 4 à une valeur de  $59 \pm 7\%$  pour les

biotubas contre une valeur de  $21 \pm 7\%$  pour les contrôles. Les biotubas permettent un abattement 2,8 fois plus important que les contrôles au bout de 6 jours.

Pour le batch 3, les valeurs au bout de 24 heures sont similaires à celles du batch 1 avec  $19 \pm 2\%$  pour les biotubas contre  $5 \pm 5\%$  pour les contrôles. Les valeurs finales d'abattement sont de  $64 \pm 3\%$  dans les biotubas et de  $41 \pm 2\%$  dans les contrôles. Pour ce batch, comme pour le batch 1, le maximum d'efficacité des biotubas s'exprime après 1 heure en assurant un abattement 3,8 fois plus important que les contrôles. Au bout de 6 jours, le gain n'est plus que de 1,6 fois.

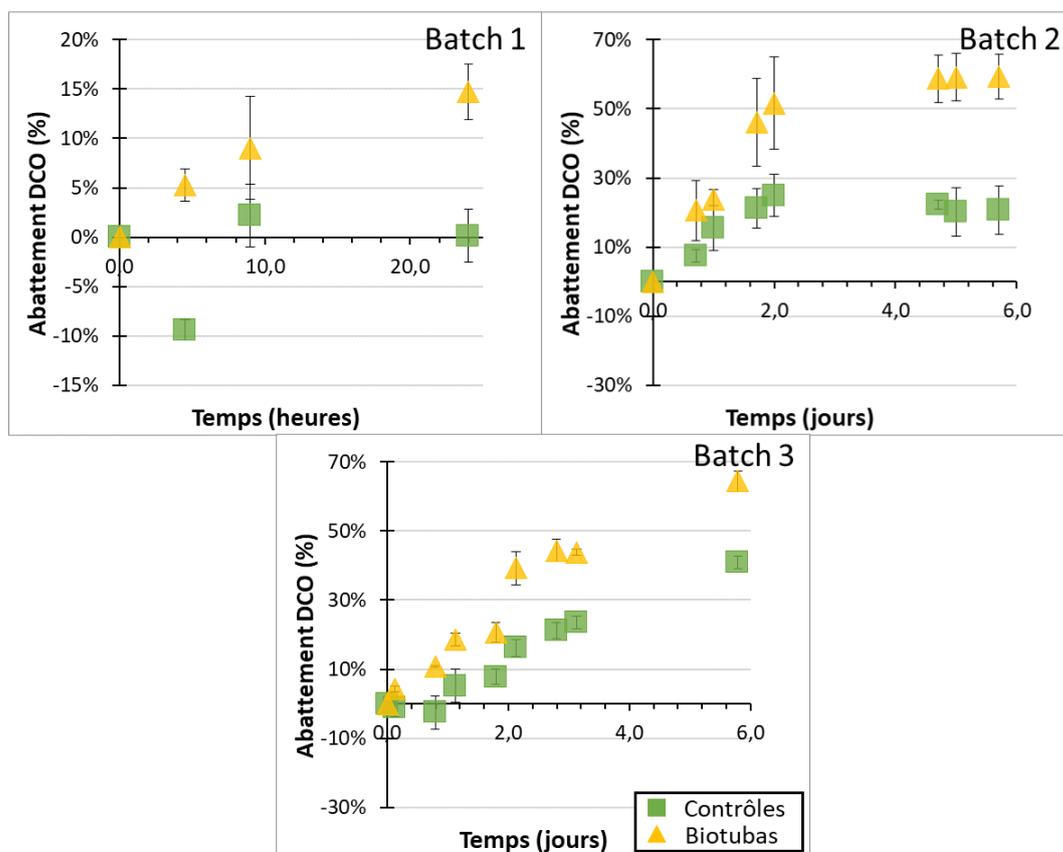


Figure 6.5 : Biotubas avec électrode capillaire émergée en eaux usées. Suivi de l'abattement moyen de la DCO dans les biotubas et contrôles en fonction du temps au cours des 3 batches.

Les vitesses maximales d'abattement obtenues avec les biotubas EE ont été calculées de la même façon que dans le chapitre 5, sur 24 heures pour le premier batch et sur 48 heures pour les deux suivants (Tableau 6.4). Pour les batchs 1 et 2, la vitesse d'abattement est beaucoup plus importante pour les biotubas que pour les contrôles. Pour le batch 1, la vitesse d'abattement est de  $40 \pm 12$  mg d'O<sub>2</sub>/L/jour pour les biotubas contre  $1 \pm 12$  pour les contrôles. Pour le batch 2, elle est de  $71 \pm 15$  mg d'O<sub>2</sub>/L/jour pour les biotubas contre  $39 \pm 13$  pour les

contrôles. Pour le batch 3, la différence est moins marquée avec des valeurs de  $25 \pm 5$  mg d'O<sub>2</sub>/L/jour et  $19 \pm 4$  pour les biotubas et les contrôles.

Dans tous les cas, les biotubas EE présentent des vitesses d'abattement de DCO supérieures aux contrôles. La vitesse d'abattement semble en outre corrélée à la durée de l'émersion : elle est de  $40 \pm 12$  mg d'O<sub>2</sub>/L/jour après 8 jours en émersion, augmente à  $71 \pm 15$  juste après l'immersion complète de 48 heures et retombe à  $25 \pm 5$  après 13 jours en émersion. Des périodes d'immersion seront donc nécessaires pour maintenir une vitesse d'abattement maximale.

Tableau 6.4 : Vitesses maximales d'abattement de la DCO soluble pour les trois batchs dans les eaux usées réelles.

Batch	Batch 1		Batch 2		Batch 3	
Réacteur	Contrôles	Biotubas	Contrôles	Biotubas	Contrôles	Biotubas
$\Delta_{\text{moy}} \text{DCO (mg d'O}_2\text{/L/jour)}$	$1 \pm 12$	$40 \pm 12$	$39 \pm 13$	$71 \pm 15$	$19 \pm 4$	$25 \pm 5$

Ces résultats sont moins frappants que ceux observés en milieu synthétique. Les biotubas émergés de 8 cm présentaient alors une vitesse d'abattement de  $653 \pm 42$  mg d'O<sub>2</sub>/L/heure. Cela peut s'expliquer de deux façons. Tout d'abord, les biotubas utilisés ici en eaux usées réelles avaient un biofilm formé auparavant dans des conditions d'aération séquentielle, alors que les biotubas en milieu synthétique du chapitre 5 étaient démarrés sans aération, avec immersion complète, puis émergés. Les biotubas mis en œuvre en eaux usées réelles n'étaient donc peut-être pas totalement adaptés à des conditions d'émersion partielle. Cela s'observe tout particulièrement avec les biotubas formés auparavant avec une avec aération séquentielle au fond du réacteur, qui ne s'adaptent pas aux nouvelles conditions. Les biotubas formés auparavant avec l'aération séquentielle en partie haute seulement sont logiquement mieux adaptés.

La deuxième raison possible est la différence de concentration en substrat au début des phases de mesure en batch. Le milieu synthétique, supplémenté en acétate, présentait une DCO initiale de  $1289 \pm 7$  mgO<sub>2</sub>/L alors que la concentration initiale des eaux usées réelles hydrolysées est de  $265 \pm 47$  mgO<sub>2</sub>/L. Il faut par ailleurs noter que la valeur était dans ces essais

particulièrement faible pour des eaux usées hydrolysées, car elle est généralement aux alentours de  $400 \pm 40$  mg d'O<sub>2</sub>/L.

### 3.3 Observations aux microscopes

Des échantillons des parties émergée et immergée des électrodes EE\_1 et EE\_2 ont été observées au microscope à épifluorescence. Les taux de recouvrement ont des valeurs similaires entre les échantillons émergés et immergés, de  $38 \pm 25\%$  et  $30 \pm 11\%$ , respectivement (Figure 6.6).

L'absence de différence de taux de colonisation microbienne entre la partie émergée et immergée, contrairement au chapitre 5, peut s'expliquer par le fait que le biofilm de ces biotubas a été formé lors d'une expérience précédente (Biotuba\_26.3 du chapitre 4), dans des conditions d'immersion complète avec aération séquentielle. De plus, il faut noter que le marqueur utilisé ici, l'acridine orange, marque les acides nucléiques, peu importe que les cellules soient viables ou non. Il est donc possible que la partie émergée présente moins de bactéries viables que le biofilm immergé.

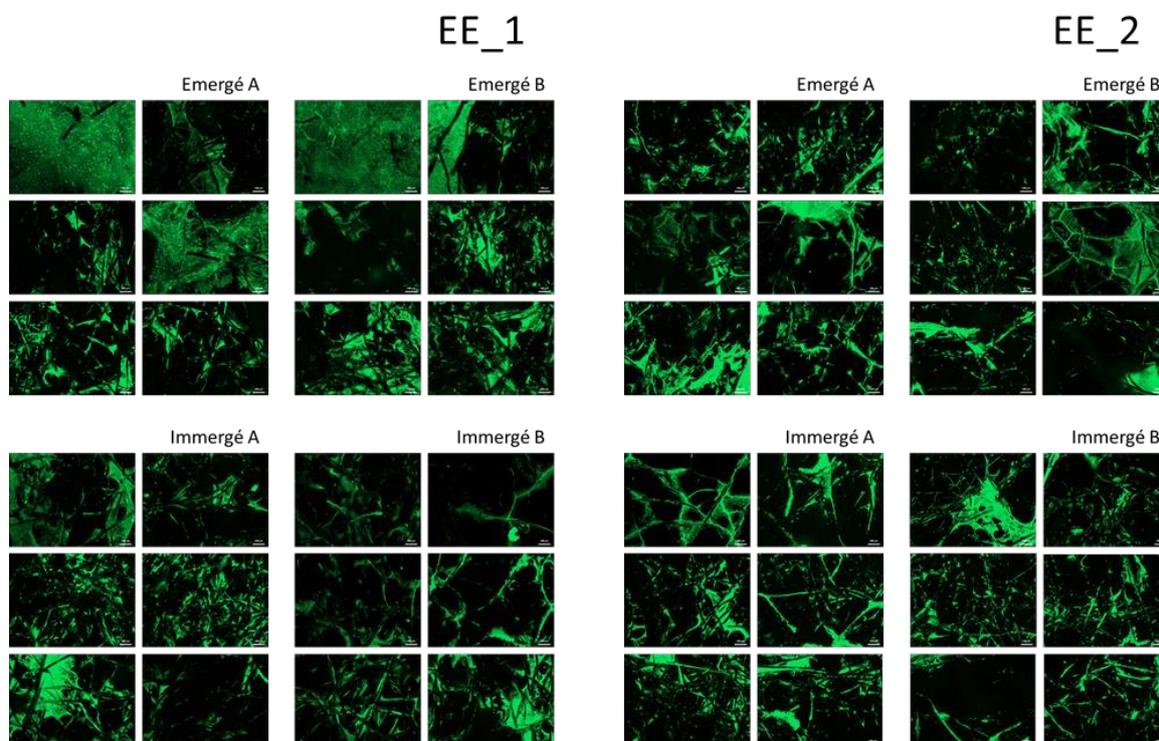
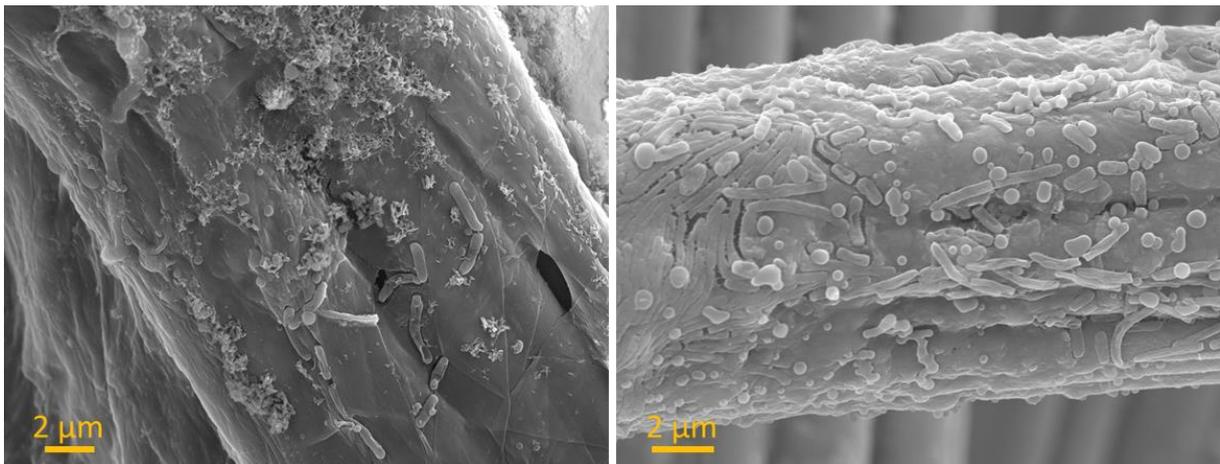


Figure 6.6 : Biotubas avec électrode capillaire émergée en eaux usées. Colonisation par le biofilm à la surface des deux biotubas avec émergence constante évalué par microscopie à épifluorescence.

Les observations réalisées au MEB corroborent l'hypothèse selon laquelle la partie immergée compterait plus de cellules viables (Figure 6.7). Dans les deux cas un biofilm est observable sur les fibres du feutre. En revanche, sur l'échantillon de biofilm immergé, de nombreuses bactéries sont observables alors que dans l'échantillon émergé seules quelques cellules sont présentes dans la matrice du biofilm. Il convient cependant de nuancer ces observations, réalisées sur une petite partie de fibre. De plus, le protocole de préparation des échantillons au MEB, décrit dans la partie 3.3.2 du chapitre 2, est susceptible d'endommager la structure du biofilm.



*Figure 6.7 : Biotuba avec électrode capillaire émergée en eaux usées. Images MEB des parties émergées (gauche) et immergées (droite) d'un biotuba avec émergence constante.*

### 3.4 Analyses des populations microbiennes

Des échantillons ont été collectés à différentes hauteurs sur les biotubas EE\_1 et EE\_2 (Figure 6.8) et leurs populations microbiennes analysées. L'objectif est de voir si les populations microbiennes varient en fonction de l'accès à l'oxygène.

Pour chaque hauteur, deux échantillons d'électrode de 2 cm<sup>2</sup> sont prélevés. Les biofilms interne et externe de l'électrode sont prélevés et leur ADN est extrait selon les protocoles présentés dans la partie 3.4 du chapitre 2.

La communauté de l'ensemble des échantillons était très riche puisque 1046 OTUs ont été identifiées, 1020 OTUs affiliées à des bactéries et 24 à des archées (2 OTUs n'ont pas pu être affiliées à un règne). Les trois classes bactériennes les plus abondantes (Figure 6.9) sont les *Bacteroidia* (168 OTUs), les *Gammaproteobacteria* (159 OTUs) et les *Clostridia* (135 OTUs).

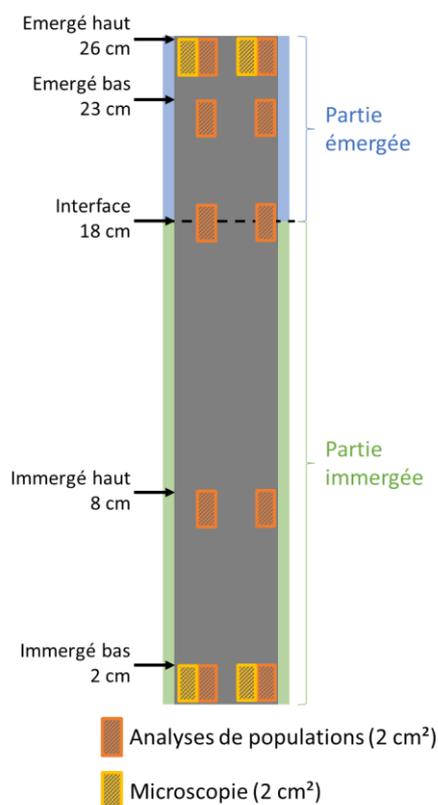


Figure 6.8 : Schéma des prélèvements réalisés sur EE\_1 et EE\_2 pour la microscopie et les analyses des populations microbiennes.

La classe des *Bacteroidia*, la plus abondante, est présente dans tous les échantillons. Son abondance décroît dans le biofilm externe entre le haut et le bas du biotuba, avec une valeur moyenne de  $37 \pm 11\%$  dans les échantillons émergés,  $24 \pm 9\%$  à l'interface et  $16 \pm 2\%$  dans les échantillons immergés. Dans le biofilm interne, qui est moins exposé aux conditions extérieures différentes entre zones immergée et émergée, l'abondance des *Bacteroidia* est de  $16 \pm 6\%$  dans tous les échantillons. Le genre majoritaire de cette classe est *Lentimicrobium* auquel 27 OTUs ont été affiliées. *Lentimicrobium* était également le genre majoritaire des *Bacteroidia* pour les biotubas mis en œuvre dans les eaux usées synthétiques (chapitre 5). Ce genre a été observé auparavant dans des systèmes électro-microbiens destinés à traiter les pollutions azotées (Joicy et al., 2019, 2020). Ce genre aérobic pourrait avoir un rôle particulier dans les systèmes avec électrode capillaire émergée.

La deuxième classe la plus abondante et présente dans tous les échantillons est celle des *Gammaproteobacteria*. De la même façon que pour les *Bacteroidia*, son abondance est la plus importante en partie émergée, avec une valeur moyenne de  $27 \pm 14\%$ . Les genres majoritaires sont *Arenimonas* (10 OTUs), présent essentiellement dans les échantillons émergés, et *Candidatus Competibacter* (27 OTUs). Bien que la classe des *Gammaproteobacteria* ait été observée dans tous les échantillons des chapitres précédents, ce qui s'explique par l'ubiquité des bactéries qui la composent, ces deux genres n'avaient pas été rencontrés. *Candidatus Competibacter* et *Arenimonas* regroupent des bactéries aérobies qui ont été observées dans des biofilms cathodiques permettant une dénitrification aérobie (Xu et al., 2019, 2021).

La classe des *Clostridia* est très peu présente dans les échantillons émergés ( $6 \pm 3\%$ ). Les bactéries de cette classe sont des anaérobies stricts, ce qui explique qu'elles soient peu présentes dans le biofilm émergé. Son abondance est de  $21 \pm 6\%$  à l'interface et de  $23 \pm 8\%$  dans la partie immergée. Le principal genre de cette classe dans les échantillons immergés, *Anaerovorax* (8 OTUs), est un genre de bactéries anaérobies strictes retrouvé notamment dans le microbiote de bovins (Lau et al., 2018). Ce genre a déjà été identifié dans des biofilms anodiques inoculés avec des boues activées (G. Zhang et al., 2012) ou des boues sédimentaires (Uria et al., 2017).

Deux autres classes ne sont retrouvées que dans certains échantillons et avec une abondance moindre, la classe des *Anaerolineae* (111 OTUs) dans le biofilm externe et la classe des *Synergista* (17 OTUs) dans le biofilm interne. Les 111 OTUs de la classe des *Anaerolineae* sont affiliés au genre *Leptolinea*, des bactéries anaérobies strictes, déjà identifié dans des communautés anodiques (Barua et al., 2019; Cao et al., 2021). Il est surprenant ici de rencontrer ce genre dans le biofilm externe des parties émergées, même si son abondance reste faible, de l'ordre de 12%. Il est possible que, même au niveau de la partie émergée, l'accès à l'oxygène ne soit pas identique en tout point du biofilm, permettant tout de même la croissance de genres anaérobies.

Les *Synergista* sont affiliées à la famille des *Synergistaceae*, déjà présente, bien que minoritaire, dans les échantillons des réacteurs sous azote de l'Article 3 du chapitre 3. Les réacteurs étant en conditions aérobies, cela pourrait expliquer que cette classe, composée de bactéries anaérobies, ne soit présente que dans le biofilm interne, où l'accès à l'oxygène est bien moindre.

Si les classes sont similaires, les genres sont très différents de ceux observés dans les chapitres précédents, ce qui est dû aux différences de conditions et/ou d'inoculum. Dans les

expériences précédentes qui ont utilisé des boues activées comme inoculum, il s'agissait soit d'un montage à trois électrodes (chapitre 3, partie 4), soit d'un biotuba avec aération séquentielle (chapitre 4, partie 4.3). Même si l'inoculum était le même, les conditions expérimentales ont entraîné le développement de populations différentes.

Les biotubas avec électrode capillaire émergée, qu'ils soient mis en œuvre dans des eaux usées réelles inoculées avec des boues activées ou en milieu synthétique inoculé avec du lombricompost (chapitre 4, partie 4.4), voient toujours le genre *Lentimicrobium* être majoritaire. L'inoculum semble jouer un rôle moins important que les conditions opératoires dans la sélection des populations microbiennes.

Ici, en eaux usées réelles, dans les échantillons de biofilm externe, la classe des *Bacteroidia* est majoritaire sur la partie émergée et la classe des *Clostridia* sur la partie immergée.

Pour le biofilm interne, la classe des *Gammaprotobacteria* est majoritaire pour la partie émergée. Le biofilm de la partie immergée est constitué de plusieurs classes sans qu'aucune ne soit réellement majoritaire (*Bacteroidia*, *Clostridia*, *SJA-28*, *Synergistia*). Des différences sont donc observées entre les biofilms externes et internes ainsi qu'entre les biofilms immergés et émergés.

On peut en outre affirmer que certaines différences sont bien induites par la condition immergée ou émergée car les échantillons présentaient une répartition des populations microbiennes semblable qu'ils aient été collectés en haut ou en bas de la partie immergée et en haut ou en bas de la partie émergée. La hauteur n'a pas d'impact intrinsèque, seule la présence ou l'absence d'oxygène affecte la composition des populations.

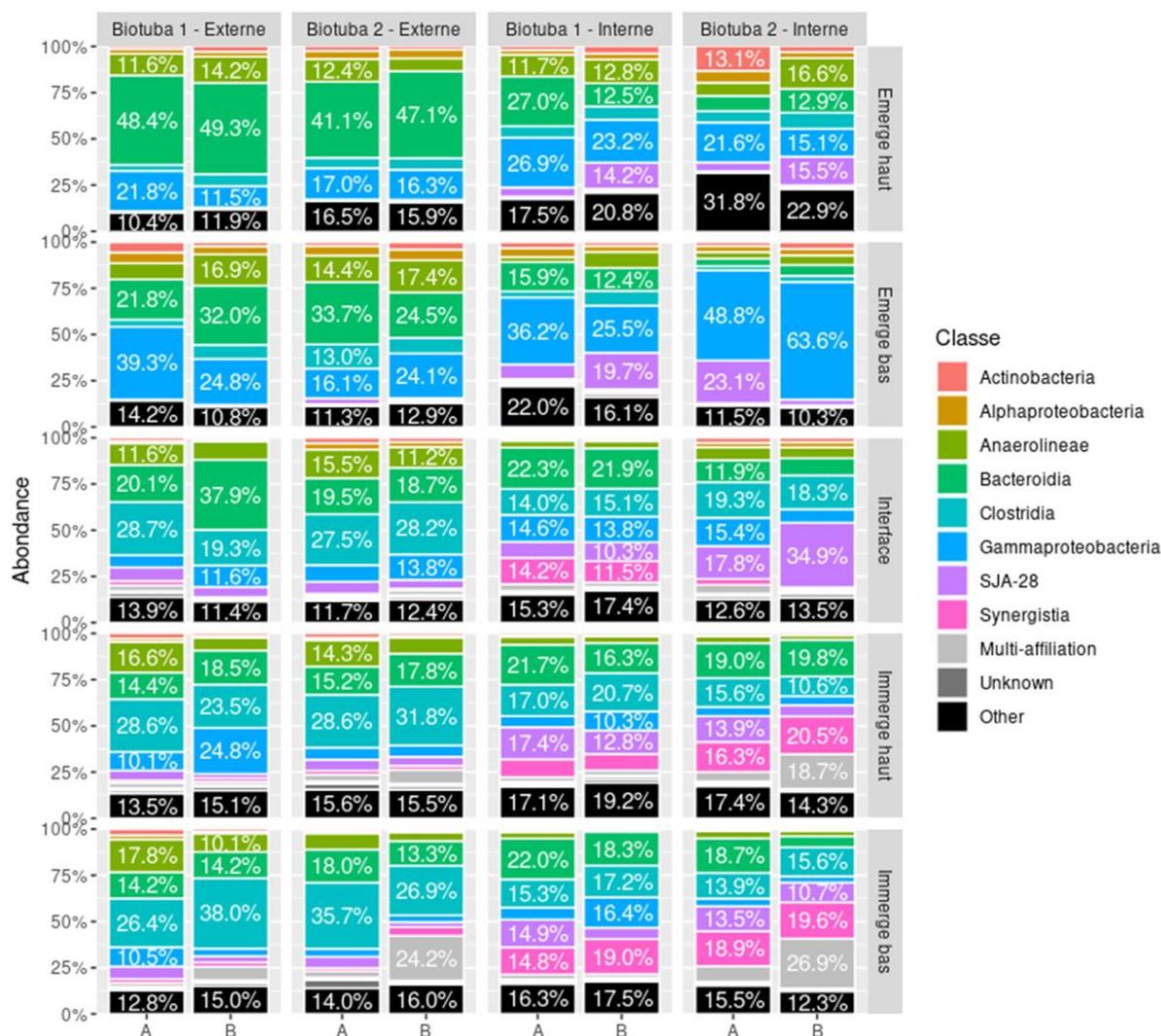


Figure 6.9 : Abondance relative des classes. Les colonnes présentent deux échantillons de biofilms (A et B) pour les parties externes et internes de l'électrode des deux biotubas avec émergence constante. Les lignes correspondent aux hauteurs de prélèvement sur l'électrode.

Les tendances induites par la condition immergée ou émergée se confirment sur les analyses en composantes principales (ACP) réalisées sur l'ensemble des données du marqueur de l'ARN 16S. La composante 1, qui représente 47% de la variance entre les échantillons, sépare ces derniers selon la localisation du prélèvement sur l'électrode, émergé ou immergé, alors que la composante 2, représentant 12% de la variance, les sépare selon la localisation de la biomasse, interne ou externe. L'ACP fait alors apparaître quatre groupes d'échantillons : le biofilm externe émergé, interne émergé, externe immergé et externe immergé (Figure 6.10A).

Les cercles de corrélation permettent d'identifier les OTUs caractéristiques de chaque groupe d'échantillon, c'est-à-dire les OTUs ayant le plus d'influence sur la variance entre les échantillons et donc leur répartition (Figure 6.10B). De la même façon que pour les barplots, les *Bacteroidia* sont présents dans tous les échantillons. La composante 1, qui sépare les échantillons selon la localisation du prélèvement sur l'électrode, montre que les *Clostridia* sont caractéristiques des échantillons immergés et à l'interface, alors que les *Gammaproteobacteria* sont caractéristiques des échantillons émergés. Quelques OTUs appartenant aux *Actinobacteria* et *Alphaproteobacteria* sont aussi identifiés dans les échantillons émergés. Il semble donc que bien que l'abondance de ces classes soit limitée, elles aient un rôle au niveau de la partie émergée. La composante 2 qui sépare les échantillons selon la localisation de la biomasse, montre que les *Synergista* sont caractéristiques du biofilm interne alors que les *Anaerolineae* sont caractéristiques du biofilm externe.

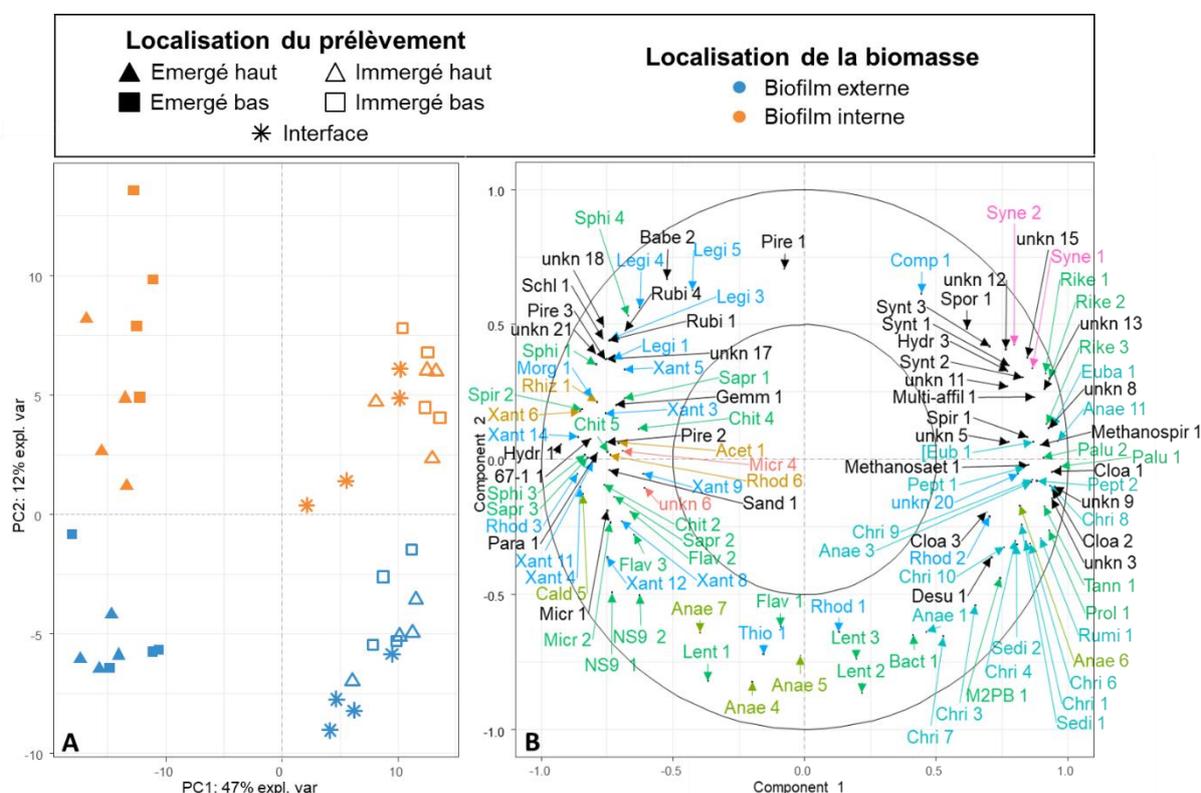


Figure 6.10 : Comparaison des échantillons basée sur la localisation du prélèvement de l'électrode (émergé, interface ou immergé) et la localisation de la biomasse (biofilm interne ou externe). (A) Représentation graphique des individus et (B) cercle de corrélation ; NB : les OTUs sur les cercles de corrélation (B) sont nommés et colorés selon la classe bactérienne avec les mêmes couleurs que celles utilisées dans la Figure 6.9.

### 3.5 Conclusion

Il n'a pas été possible de former des biotubas émergés lors des phases batch à partir d'électrodes formées avec aération séquentielle au fond du réacteur. En revanche, les électrodes formées avec aération séquentielle en haut du réacteur ont permis la formation de biotubas émergés dans les eaux usées. Pour ces derniers, le potentiel varie entre  $-0,14 \pm 0,03$  V vs ECS (début de l'émersion partielle) et  $-0,10 \pm 0,04$  V vs ECS (batch 3). Ces valeurs sont similaires à celles observées lors de l'aération des biotubas au chapitre 4 et avec les biotubas émergés en milieu synthétique du chapitre 5.

Les biotubas qui ont fonctionné ont permis d'abattre la matière organique des eaux usées réelles plus rapidement que dans les contrôles pour chacune des trois séries de mesures en batch. Les vitesses d'abattement des biotubas étaient de  $40 \pm 12$ ,  $71 \pm 15$  et  $25 \pm 5$  mg d' $O_2$ /L/jour pour les batch 1, 2 et 3 respectivement. Pour les contrôles, ces mêmes vitesses étaient de  $1 \pm 12$ ,  $40 \pm 12$  et  $19 \pm 4$  mg d' $O_2$ /L/jour. Ces biotubas avec électrode capillaire émergée permettent un abattement jusqu'à 2,8 plus important que dans les contrôles, sans aucune aération forcée. La vitesse d'abattement des biotubas diminue cependant au cours du temps lorsque l'électrode est émergée : la vitesse d'abattement de  $71 \pm 15$  mg d' $O_2$ /L/jour, observée juste après 48 heures d'immersion complète, n'est plus que de  $25 \pm 5$  mg d' $O_2$ /L/jour après 13 jours d'émersion.

Les observations au microscope à épifluorescence montrent une couverture du biofilm similaire sur les parties émergés et immergés, contrairement aux observations réalisées au chapitre précédent. Cette différence est probablement due à la formation préalable des biofilms en condition d'immersion complète pendant 76 jours. Toutefois, nous n'avons pas déterminé si les bactéries composant le biofilm étaient viables ou non. En effet, les observations au MEB semblent montrer moins de bactéries intègres sur la partie émergée.

L'analyse des populations microbiennes a montré des différences significatives entre les communautés bactériennes des parties émergée et immergée. En effet, 47% de la variance entre les populations microbiennes sont dus à la position émergée ou immergée de l'échantillon. La classe majoritaire des *Bacteroidia* est présente dans tous les échantillons. Les *Clostridia* sont caractéristiques des échantillons immergés et à l'interface, alors que les *Gammaproteobacteria*, les *Actinobacteria*, et les *Alphaproteobacteria* sont caractéristiques des échantillons émergés. 12% de la variance entre les échantillons sont dus à la localisation de la biomasse, interne ou externe. Les *Synergista* sont caractéristiques du biofilm interne alors que les *Anaerolineae* sont caractéristiques du biofilm externe.

## **4 Conclusion du chapitre 6**

La première partie de ce chapitre a montré l'intérêt de la cathode émergée pour la réduction de l'oxygène. Des courants 3 fois plus importants ont été obtenus lorsque les électrodes sont émergées de 2,5 ou 4,5 cm par rapport à une électrode totalement immergée, dans un milieu constitué d'eaux usées réelles inoculées avec des boues activées. L'électrode capillaire émergée assure donc la réduction de l'oxygène, sans aération forcée et malgré l'absence d'oxygène dissout en solution, du fait de sa consommation par les bactéries aérobies. L'oxygène est accessible grâce à la partie émergée, uniquement recouverte d'un film liquide.

Dans la seconde partie, le principe de l'électrode capillaire émergée a été mis en œuvre dans une configuration biotuba. Le biotuba avec une hauteur émergée de 8 cm a assuré sans aucune aération un abattement de la matière organique jusqu'à 2,8 fois plus important que les contrôles. Les populations microbiennes varient en fonction des conditions émergé ou immergé et en fonction de la localisation du biofilm interne ou externe à la structure de l'électrode. Ces résultats confirment les conclusions du chapitre 5, faisant la preuve du concept du biotuba à électrode capillaire émergée, cette fois, dans un milieu constitué d'eaux usées réelles inoculées avec des boues activées.



***Chapitre 7 : Premiers éléments  
d'étude de la capacité de double  
couche de l'interface***



## 1 Objectifs et choix de l'étude

Ce chapitre pose quelques premiers jalons vers l'amélioration des performances des biotubas par l'augmentation de leur capacité de double couche.

Le chapitre 4 a mis en lumière que le biotuba avec aération séquentielle avait une période d'activité de 30 minutes après l'arrêt de l'aération. Pendant cette période, le biotuba continue de collecter des charges provenant de l'oxydation de la matière organique sans pouvoir les décharger vers l'oxygène. En effet, la concentration de l'oxygène dissout retombe très rapidement à zéro dès que l'aération est stoppée. Une augmentation de la capacité de double couche (Cdl) pourrait permettre d'allonger cette durée en augmentant la capacité de stockage de charges de l'interface électrode/biofilm/solution.

Dans la mesure où la capillarité du biofilm est élément clé du développement des biotubas à cathode émergée, l'augmentation de la double couche, et corollairement l'augmentation de la concentration ionique du biofilm, pourrait aussi être une voie d'amélioration des biotubas à cathode émergée.

La Cdl des interfaces électrode/solution est à l'origine du courant capacitif. Lorsque le potentiel d'une électrode est modifié, des électrons circulent dans le circuit électrique et modifient la charge du matériau de l'électrode. En regard, le transport d'ions en solution vient compenser les modifications de la charge du matériau. Les charges distribuées dans le matériau de l'électrode sont compensées en solution par la formation d'une couche d'ions de charge opposée. Il s'agit de la double couche électrique (Figure 7.1A). Le courant capacitif est le courant associé à la charge ou la décharge de cette double couche électrique. Pour chaque électron transporté de l'anode vers la cathode par le circuit électrique, l'interface anodique perd un anion ou gagne un cation tandis que l'inverse se produit à l'interface cathodique (Figure 7.1B). Le courant capacitif n'entraîne pas de changement dans la composition chimique de la solution, mais seulement dans la répartition des charges électriques à la surface des électrodes.

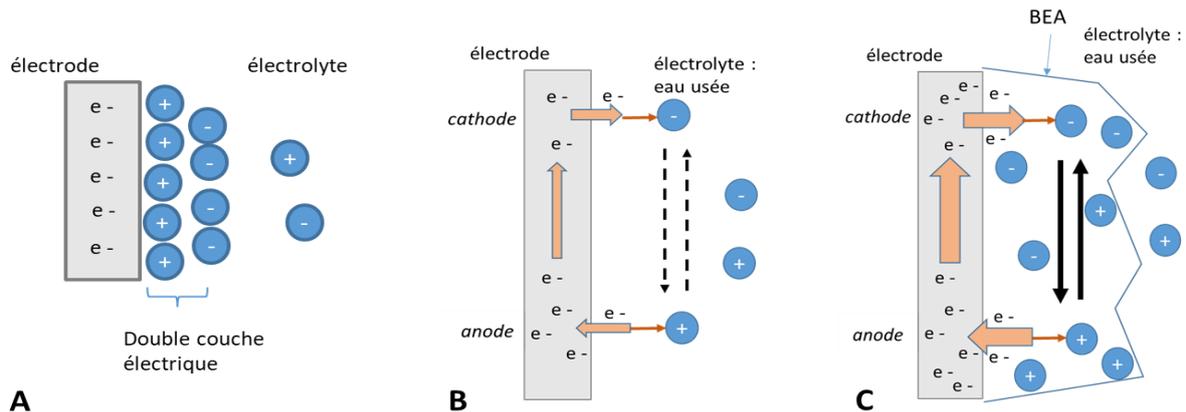


Figure 7.1 : (A) Double couche électrique à la surface d'une électrode. (B) biotuba sans biofilm et (C) en présence d'un biofilm, modifié d'après Hugo Terol.

La Cdl d'un matériau, exprimée en Farad, caractérise son aptitude à stocker des charges électriques. La présence d'un biofilm à la surface de l'électrode peut augmenter la Cdl (Figure 7.1C), grâce au stockage de charges dans le biofilm (ter Heijne et al., 2021). La Cdl des électrodes microbiennes a été étudiée dans le cadre du développement de PCM dites capacitives. L'utilisation d'une anode capacitive permet d'obtenir un courant plus important et de le maintenir au cours des phases de charge et de décharge de la PCM (Deeke et al., 2012). Une plus grande capacité de double couche, dans le cas du biotuba, permettrait un stockage de charge plus important et donc une période d'activité plus longue en l'absence d'aération.

Les travaux présentés dans ce chapitre ont constitué l'objet du stage de Master de Hugo Terol. L'objectif était de déterminer l'évolution de la capacité de double couche (Cdl) de l'électrode au cours de la formation d'un biofilm électroactif anodique, sur du feutre de carbone classique et sur du feutre recouvert d'un composite à base de charbon actif.

Deux expériences successives ont été réalisées dans les mêmes conditions, la première porte sur l'influence de la formation du biofilm sur l'évolution de la Cdl de l'interface et la seconde reprend l'étude avec des électrodes à surface modifiée. La capacité de double couche de l'interface est évaluée en milieu contrôlé (montage à trois électrodes et milieu synthétique), en fonction de la croissance du biofilm et en fonction de modifications de la surface de l'électrode. Les variations des populations microbiennes des biofilms sont également discutées.

Les détails des montages expérimentaux utilisés dans ce chapitre, les techniques électrochimiques et analytiques, les méthodes d'observation et les protocoles d'analyse des populations microbiennes sont décrits dans le chapitre 2.

Les courants capacitifs sont généralement très brefs et n'apparaissent que lorsque le potentiel de l'électrode est modifié. En revanche, en voltammétrie à balayage linéaire (partie 3.1.3 du chapitre 2), comme le potentiel de l'électrode est modifié de façon continue, le courant capacitif est constant. La voltammétrie est donc une technique pratique pour mesurer les courants capacitifs et en extraire les valeurs de Cdl.

## 2 Conditions opératoires

Les conditions opératoires sont présentées dans le Tableau 7.1. Les réacteurs standards étaient remplis, en batch, de 700 mL d'eaux usées synthétiques inoculées avec 5% (v/v) de lombricompost, supplémentés avec 20 mM d'acétate et mis sous un flux constant d'azote. Les conditions anaérobies ont pour objectif d'éviter la consommation parasite du substrat par les bactéries aérobies. Le montage expérimental est décrit dans les parties 2.1.1 et 2.2.3 du chapitre 2. Les contrôles ne sont pas supplémentés en acétate. Deux fois par semaine environ, la concentration d'acétate a été évaluée. Elle est restée proche de la valeur initiale tout au long de l'expérience, aucun ajout supplémentaire n'a donc été fait.

Des CVs sont réalisées aux vitesses de 5, 10 et 20 mV/s de -0,2 à 0,4 V vs ECS dans tous les réacteurs à intervalles réguliers afin de déterminer la capacité de double couche grâce à la méthode présentée dans la partie 3.1.3 du chapitre 2. A la fin de l'expérience, des échantillons d'électrode sont prélevés pour analyser les populations microbiennes, selon les protocoles décrits dans la partie 3.4 du chapitre 2.

Tableau 7.1 : Conditions expérimentales communes à l'étude de la capacité de double couche du feutre de carbone en milieu synthétique.

<b>Montage « Electrode immergée 2 » (chapitre 2 – parties 2.1.1 et 2.2.5)</b>	
<b>Réacteurs</b>	Electrode de travail : feutre de carbone 10 cm <sup>2</sup> + tige en titane
<b>« standards »</b>	Contre électrode : Feutre de carbone circulaire + fil de platine
	Electrode de référence : ECS

---

Techniques électrochimiques (chapitre 2 – parties 2.1.1 et 2.2.5)	
CA	E = -0,1 V vs ECS
CV	3 cycles à 5, 10, 20 mV/s de -0,2 à 0,4 V vs ECS
Milieu de culture + inoculum (chapitre 2 – parties 1.1.2 et 1.2.3)	
Milieu	EU synthétiques + 5% (v/v) lombricompost + acétate 20mM, 700 mL
Conditions	Bullage constant à l'azote
Analyses des populations microbiennes (chapitre 2 – parties 3.4)	

### 3 Influence du biofilm sur la capacité de double couche de l'interface

Huit réacteurs sont mis en œuvre, chacun équipé d'un système à 3-électrodes. Quatre électrodes sont polarisées à -0,1 V vs ECS et quatre sont laissées en OC. Pour chacune des conditions électrochimiques, 2 réacteurs sont inoculés et 2 ne le sont pas.

Dans les réacteurs inoculés, à partir du 4<sup>ème</sup> jour, la densité de courant croit de façon régulière jusqu'à atteindre une valeur aux alentours de 1 A/m<sup>2</sup> au 9<sup>ème</sup> et 10<sup>ème</sup> jours (Figure 7.2). Pour le premier duplicat, cette densité de courant continue à augmenter, en oscillant, jusqu'à dépasser les 1,6 A/m<sup>2</sup> après 14 jours. Pour le second duplicat la densité de courant se stabilise autour de 1 A/m<sup>2</sup> jusqu'au 12<sup>ème</sup> jour à partir duquel elle diminue légèrement ensuite. Toutes ces valeurs de courant sont finalement assez faibles, en comparaison de travaux similaires réalisés avec le même milieu qui ont reporté jusqu'à 8,9 A/m<sup>2</sup> (Cercado et al., 2013).

Dans les réacteurs de contrôle, la densité de courant ne dépasse jamais 0,002 A/m<sup>2</sup>. Le plateau de courant anodique visible entre le 6<sup>ème</sup> et le 8<sup>ème</sup> jour pour un des contrôles est dû à un problème de connexion électrique et ne doit pas être pris en compte dans l'interprétation des résultats.

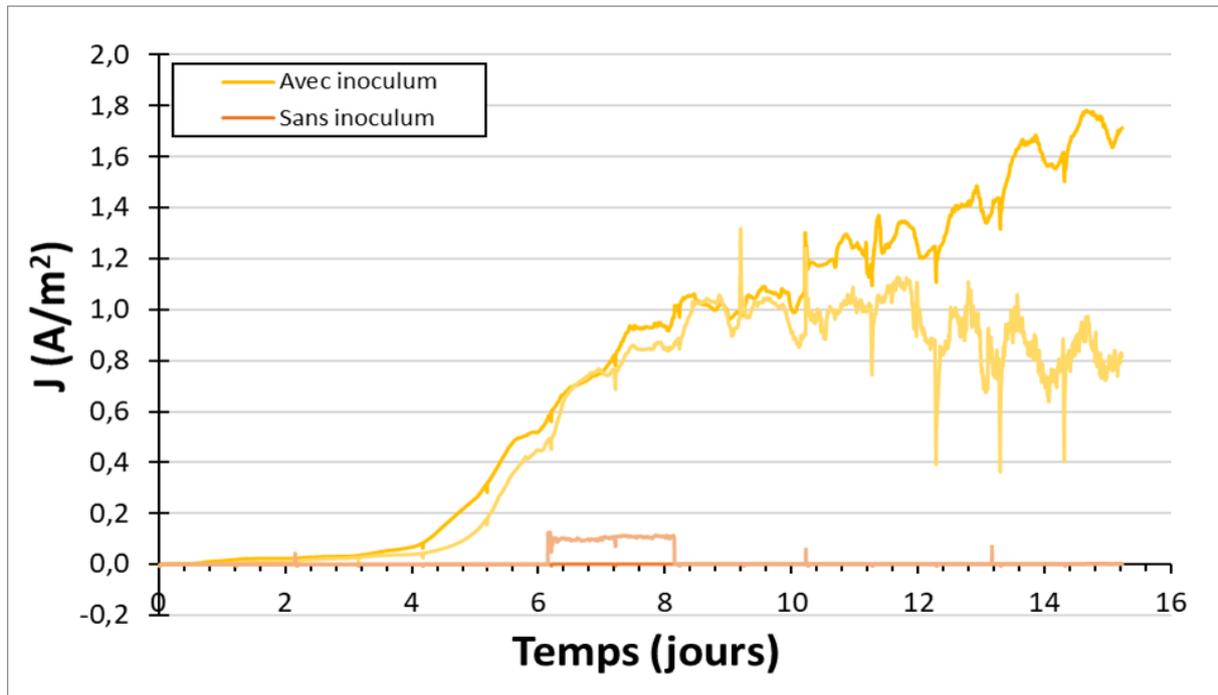


Figure 7.2 : Influence du biofilm sur la capacité de double couche de l'électrode. CAs obtenues avec une polarisation à  $-0,1$  V vs ECS.

Les CVs réalisées à intervalles de temps réguliers ont permis de suivre l'évolution de la Cdl au cours du temps (Figure 7.3). Elle est inférieure à  $5 \text{ F/m}^2$  au début de l'expérience et augmente très légèrement durant les 4 premiers jours. Pour les électrodes non polarisées, la Cdl reste globalement stable et constante jusqu'à la fin de l'expérience et ne dépasse pas  $10 \text{ F/m}^2$ . Les électrodes polarisées des réacteurs sans inoculum présentent la plus faible Cdl, qui reste à une valeur inférieure à  $5 \text{ F/m}^2$ .

En revanche, pour les électrodes polarisées avec inoculum, une nette augmentation de la Cdl a été observée après les 4 premiers jours. Dès le 5<sup>ème</sup> jour de l'expérience la Cdl passe les  $10 \text{ F/m}^2$  et croît de façon constante jusqu'au 12<sup>ème</sup> jour où elle atteint  $25 \text{ F/m}^2$ . L'évolution de la Cdl est assez répétable pour les duplicats d'électrodes polarisées avec inoculum bien qu'ils donnent une variation de courant différente en CA, le courant produit ne semble donc pas influencer la Cdl.

L'augmentation de la Cdl n'est observée que dans les réacteurs inoculés et sous polarisation. De plus, l'augmentation concomitante de la densité de courant (Figure 7.2) et de la Cdl (Figure 7.3) à partir du jour 4 suggère que la croissance du biofilm électroactif, mesurée par la production de courant, est à l'origine de l'augmentation de la Cdl. Les mesures effectuées ici donnent donc une valeur de la capacité globale du couple « électrode + biofilm »

qui doit inclure l'interface matériau/biofilm, le biofilm et l'interface biofilm/milieu. Nous continuerons toutefois à l'appeler, sans doute improprement, Cdl par la suite.

Dans la bibliographie, des valeurs de Cdl de 10 F/m<sup>2</sup> sont observés pour des anodes microbiennes en graphite (Heijne et al., 2011; ter Heijne et al., 2015). La Cdl du biofilm seul atteint des valeurs de 4,5 F/m<sup>2</sup> sur une électrode en oxyde d'étain dopé au fluor (fluorine-doped tin oxide, FTO), matériau choisi car il présente une Cdl très faible (100 fois plus faible que les matériaux carbonés), ce qui permet de mesurer précisément la Cdl du biofilm (Heijne et al., 2018). Cette valeur est plus faible que le gain de 15 F/m<sup>2</sup> observé ici lors de la croissance du biofilm. Ce gain important peut s'expliquer par la nature de l'électrode, ici du feutre de carbone, qui permet probablement le développement d'un biofilm plus conséquent par rapport à l'électrode en oxyde d'étain fluoré. En effet, les électrodes en FTO sont très lisses et en 2D, contrairement au feutre qui est en 3D et présente une porosité importante. La surface spécifique beaucoup plus importante du feutre a permis le développement d'une quantité plus importante de biofilm et donc d'augmenter la contribution de ce dernier à la Cdl.

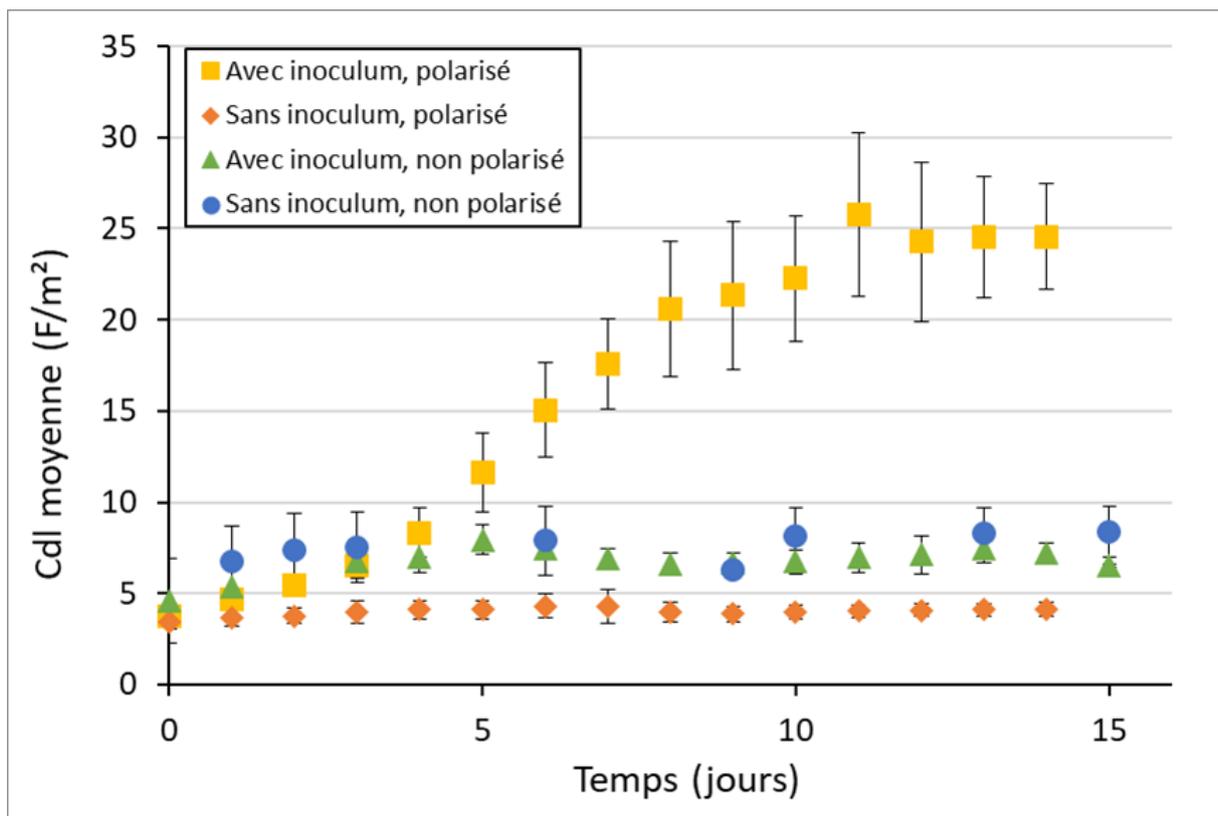


Figure 7.3 : Influence du biofilm sur la capacité de double couche de l'électrode. Evolution de la capacité de double couche (Cdl) en F/m<sup>2</sup> au cours du temps pour les différentes conditions expérimentales (moyennes des Cdl calculées pour les CVs à 5, 10 et 20 mV/s, en duplicats).

## 4 Influence du traitement de surface sur la capacité de double couche de l'interface

L'utilisation de matériaux carbonés, modifiés ou non, est souvent jugée prometteuse pour le développement de systèmes capacitifs. L'utilisation d'un matériau capacitif a conduit à une augmentation de la production de courant d'une PCM de 0,79 à 1,02 A/m<sup>2</sup>, avec un courant qui reste stable durant les phases de charge et de décharge (Deeke et al., 2012). L'objectif de la seconde expérience est donc d'évaluer l'influence du traitement de surface sur la Cdl.

Les électrodes ont été gracieusement fournies par Francesca Soavi de l'université de Bologne. Elles sont constituées de feutre de carbone recouvert de 0 à 5 mg/cm<sup>2</sup> d'un composite qui augmente leur Cdl. Le composite est constitué de 80% de charbon actif (Norit), 10% de noir de carbone et 10% de polyfluorure de vinylidène (PVdF). Les échantillons ont été préparés en recouvrant le feutre de carbone par ce mélange dans un solvant, le n-méthyl-2-pyrrolidone puis en procédant à un séchage. La quantité de composite, de 0 à 5 mg/cm<sup>2</sup>, utilisée pour différencier les échantillons dans la suite de l'étude correspond à la charge du mélange charbon actif-noir de carbone-PVdF à la surface du feutre traité.

Vu les conclusions de l'expérience précédente, la polarisation et l'inoculation semblent indispensables, tous les réacteurs sont donc inoculés avec du lombricompost et toutes les électrodes sont polarisées à -0,1 V vs ECS. Pour chacun des 6 réacteurs, l'électrode de travail est du feutre de carbone recouvert ou non de différentes quantités de composite, soit 0 (x2) ; 1 ; 2,5 ; 4,5 et 5 mg/cm<sup>2</sup>. Ce feutre, même lorsqu'il n'est pas recouvert de composite, a été fourni par Francesca Soavi de l'université de Bologne et est donc différent du feutre utilisé dans tout le reste de ce manuscrit, y compris dans la partie 2 de ce chapitre.

Toutes les électrodes produisent un courant initial proche de 0 (Figure 7.4). Le courant produit par l'électrode avec 4,5 mg/cm<sup>2</sup> de composite a une évolution anormale, jusqu'au jour 9 où il rejoint les autres. Il est possible qu'il y ait eu un problème de polarisation pour ce réacteur, qui a été résolu au jour 9. L'électrode avec 2,5 mg/cm<sup>2</sup> de composite présente une augmentation du courant dès le jour 1. Pour tous les autres réacteurs, cette augmentation est observée à partir du jour 2. Le matériau a accéléré la croissance du biofilm, puisque l'augmentation du courant n'apparaissait qu'au jour 4 lors de l'essai précédent. Il ne s'agit pas ici d'un effet du traitement de surface, mais plutôt d'un effet du matériau, puisque même les électrodes avec 0 mg/cm<sup>2</sup> de composite voient leur courant croître à partir du jour 2.

Il n'est pas possible d'identifier un lien entre la modification de surface et la densité de courant puisque le réacteur qui a produit la densité de courant la plus élevée est un contrôle dont l'électrode n'a pas été modifiée (absence de composite) avec une valeur maximale de  $3,6 \text{ A/m}^2$ , similaire à la densité de courant produite par l'électrode traitée avec  $2,5 \text{ mg/cm}^2$  de composite ( $2,8 \text{ A/m}^2$ ). Pour les électrodes avec  $4,5$  et  $5 \text{ mg/cm}^2$  la densité de courant maximale n'était en revanche que de  $1,9 \text{ A/m}^2$  et  $1,8 \text{ A/m}^2$ , respectivement. Le deuxième contrôle et l'électrode avec  $1 \text{ mg/cm}^2$  présentent tous deux une valeur intermédiaire de  $2,2 \text{ A/m}^2$ .

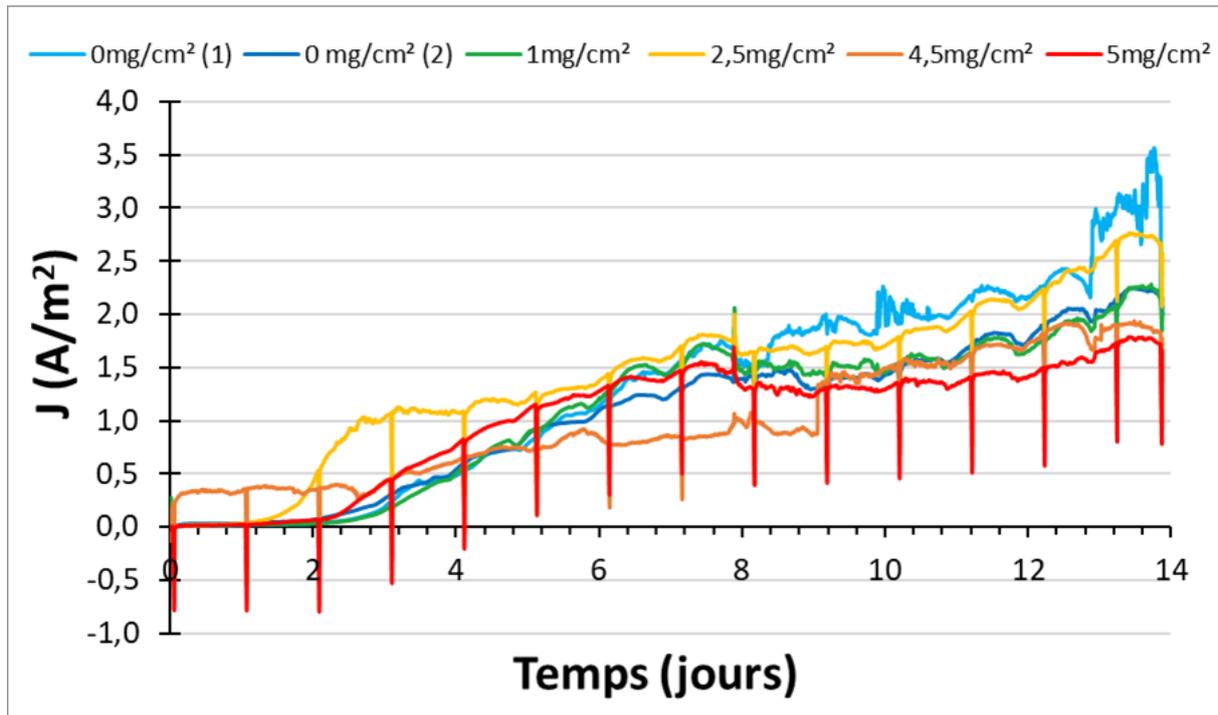


Figure 7.4 : Influence du traitement de surface sur la capacité de double couche de l'électrode. CAs obtenues avec une polarisation à  $-0,1 \text{ V vs ECS}$ .

Au début de l'expérience, en l'absence de biofilm, la Cdl initiale des matériaux est, comme attendu, fonction de la quantité de composite (Figure 7.5). Les contrôles présentent une Cdl de  $18 \pm 8 \text{ F/m}^2$ , un ordre de grandeur similaire aux Cdl observées lors de l'expérience précédente. Les Cdl sont de  $77 \pm 24$ ,  $183 \pm 76$  et  $300 \pm 102 \text{ F/m}^2$  pour des concentrations en composite de  $1$ ,  $2,5$  et  $5 \text{ mg/cm}^2$ , respectivement.

Le suivi de la Cdl au cours du temps montre une influence du traitement de surface et de la croissance du biofilm (Figure 7.5). L'électrode avec  $4,5 \text{ mg/cm}^2$  de composite présente une évolution anormale jusqu'au jour 10, tout comme sur la CA. Il y avait probablement un faux contact entre l'électrode et le collecteur. Pour les autres électrodes, de la même façon que lors de l'expérience précédente, la Cdl augmente avec la croissance du biofilm.

L'augmentation est plus importante en présence de composite, sans qu'une distinction puisse être faite entre les électrodes recouvertes de 2,5 et 5 mg/cm<sup>2</sup> de composite. L'augmentation due à la croissance du biofilm, c'est-à-dire la différence entre la valeur maximale et la valeur initiale, va de 20 F/m<sup>2</sup> pour les contrôles à 111 et 117 F/m<sup>2</sup> pour les électrodes recouvertes de 2,5 et 5 mg/cm<sup>2</sup> de composite.

Dans la bibliographie, plusieurs études dédiées aux anodes microbiennes montrent une augmentation de la Cdl grâce à des modifications de surface impliquant notamment l'utilisation de charbon actif (Deeke et al., 2013, 2012). Des électrodes constituées de granules de charbon actif ont également donné des Cdl similaires à celles obtenues ici, de l'ordre de 300 F/m<sup>2</sup> (Santoro et al., 2017b). Les résultats présentés ici et les informations de la bibliographie offrent des pistes très intéressantes pour accroître les performances des biotubas avec aération séquentielle en allongeant leur période d'activité en l'absence d'aération forcée.

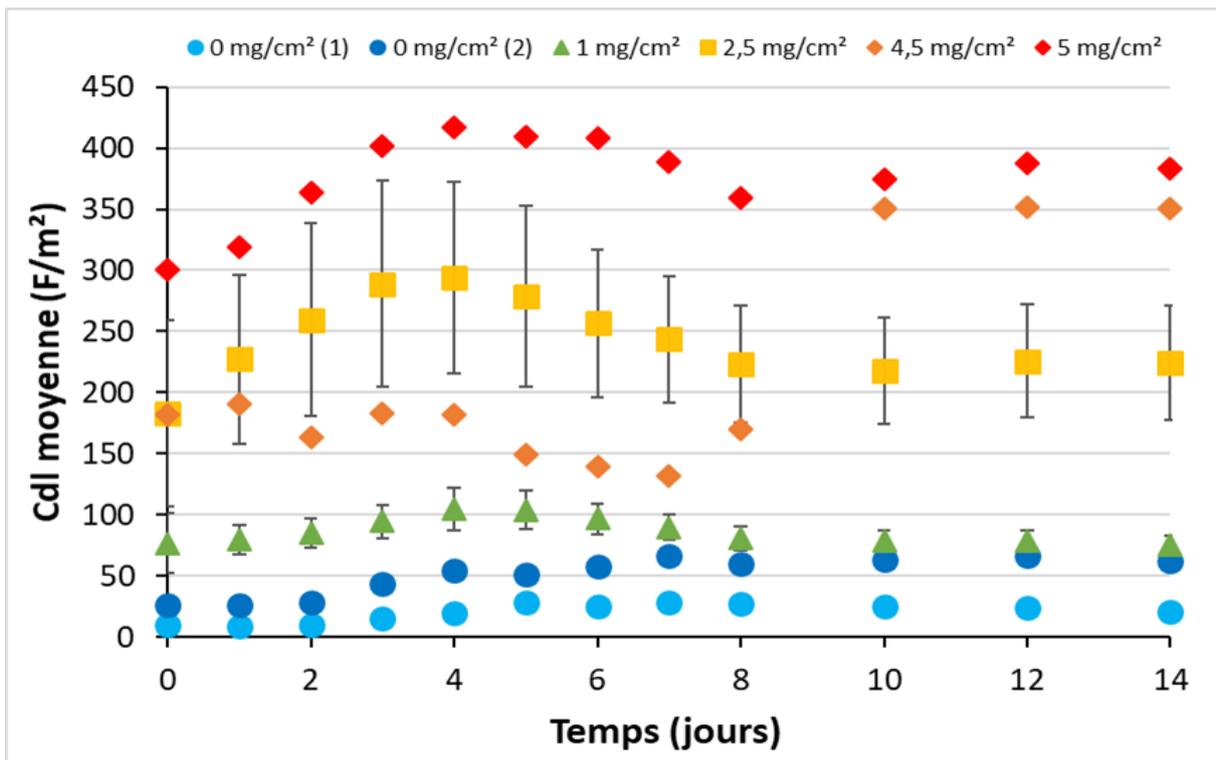


Figure 7.5 : Influence du traitement de surface sur la capacité de double couche de l'électrode. Evolution de la capacité de double couche (Cdl) en F/m<sup>2</sup> au cours du temps pour les différentes concentrations de composite à la surface du feutre (moyennes des Cdl calculées pour les CVs à 5, 10 et 20 mV/s).

## 5 Analyses des populations microbiennes

Pour les analyses de populations microbiennes de l'expérience 1, deux échantillons de chaque électrode provenant des réacteurs avec inoculum ont été prélevés. Ils sont nommés 1.1, 1.2 et 2.1, 2.2 pour les réacteurs polarisés et 3.1, 3.2 et 4.1, 4.2 pour les réacteurs non polarisés. Pour l'expérience 2, un échantillon de chacune des électrodes non traitées ainsi qu'un échantillon des électrodes avec 2,5 et 5 mg/cm<sup>2</sup> de composite ont été prélevés. Ils sont nommés selon la quantité de composite, 0 (1), 0 (2), 2,5 et 5. Les électrodes avec 2,5 et 5 mg/cm<sup>2</sup> de composite sont choisies car ce sont celles qui donnent les Cdl les plus élevés, sur toute la durée de l'expérience (Figure 7.5).

Contrairement aux expériences précédentes, les populations microbiennes sont beaucoup moins diversifiées, avec 542 OTUs identifiées, probablement en raison des conditions expérimentales. En effet, si le milieu était constitué d'eaux usées synthétiques inoculées avec du lombricompost, comme dans les parties 3 et 4 du chapitre 5, les réacteurs étaient ici en conditions anaérobies. Les populations microbiennes étant moins diversifiées, elles ont pu être identifiées au niveau du genre (Figure 7.6).

Pour la première expérience (partie 4.2), qui analysait l'influence du biofilm sur la Cdl, les échantillons des deux électrodes polarisées sont très différents (1.1, 1.2 vs 2.1, 2.2). Ces deux électrodes avaient des comportements différents en termes de CA (Figure 7.2). Pour la première électrode (Figure 7.6 – 1.1 et 1.2), dont la densité de courant croît tout au long de la CA, le genre *Citri fermentans* est largement majoritaire avec une abondance de 81 ±4%. Ce genre est très peu décrit. Cela est dû au fait qu'il s'agissait d'espèces affiliées au genre *Geobacter* et donc à la famille des *Geobacteraceae*, et dont l'affiliation a été modifiée récemment (Waite et al., 2020). Ce genre, avant ré-affiliation, avait tout de même été identifié comme favorisant la production d'électricité dans des PCM inoculées avec des sédiments marins (Holmes et al., 2004).

L'autre réacteur (Figure 7.6 – 2.1 et 2.2), dont le courant se stabilise aux alentours de 0,90 A/m<sup>2</sup> du 12<sup>ème</sup> au 15<sup>ème</sup> jour, présente un mélange de *Geobacter*, *Thermincola* et *Hydrogenophaga* avec des abondances relatives de 28 ±7%, 17 ±6% et 10 ±2%, respectivement. La présence de genres anaérobies électroactifs tels que *Geobacter* montre que le problème n'est pas lié à une entrée d'air dans le réacteur mais peut-être à un problème de dérive du potentiel de l'électrode référence.

Les échantillons non polarisés de l'expérience 1 (Figure 7.6 – 3.1, 3.2, 4.1 et 4.2) présentent tous des populations microbiennes similaires avec une majorité de « multi-

affiliations » (13 OTUs). Il s'agit de la famille des *Pseudomonaceae* qui n'a pas pu être affiliée jusqu'au genre. Les bactéries de cette famille, telles que *Pseudomonas* ou *Acinetobacter*, appartenant à la classe des *Gammaproteobacteria*, ont déjà été décrites dans les chapitres 3 et 5 comme des bactéries aérobies ou anaérobies facultatives, capables d'assurer des transferts d'électrons extracellulaires en conditions aérobies.

Les genres *Hydrogenophaga*, *Lentimicrobium* et *Sedimentibacter* sont aussi identifiés dans les échantillons non polarisés de l'expérience 1 avec des abondances variant de 5 à 12%. Des bactéries des genres *Lentimicrobium* et *Sedimentibacter*, connues comme électroactives et contribuant à la dégradation de composés organiques (Gao et al., 2020; Hassan et al., 2018; Zheng et al., 2019), ont déjà été observées dans les biotubas émergés en milieu synthétique inoculé avec du lombricompost (chapitre 5). Ces genres étaient majoritaires dans les échantillons immergés anaérobies. Cela semble logique qu'ils soient présents ici en conditions anaérobies et dans le même milieu. Le genre *Hydrogenophaga* comporte des bactéries électroactives connues pour oxyder l'hydrogène (Zheng et al., 2019). Ce genre a aussi déjà été isolé du biofilm anodique d'une PCM alimentée en acétate (Kimura and Okabe, 2013). Ces bactéries sont donc anaérobies, électroactives et capables d'oxyder l'acétate, trois éléments qui expliquent leur développement dans le cas présent.

Pour la seconde expérience consacrée à l'effet de la modification de surface (partie 4.3), les électrodes (Figure 7.6 – 0 (1), 0 (2), 2,5 et 5) présentent une majorité de *Citrifermantans* avec une abondance relative de  $61 \pm 16\%$ . Rappelons que les échantillons du réacteur 1 (Figure 7.6 1.1, 1.2), dont la densité de courant croit tout au long de la CA, présentaient également une majorité de *Citrifermantans*. Le second genre majoritaire est *Thermincola* ( $17 \pm 15\%$ ). L'espèce *Thermincola ferriacetica* affiliée à ce genre a été décrite comme capable de transfert direct d'électrons vers l'électrode dans une PCM supplémentée en acétate (W. Marshall and D. May, 2009).

Alors que l'expérience précédente mettait en lumière l'influence évidente de la polarisation, au contraire, la présence du composite sur les électrodes ne semble pas affecter les populations microbiennes.

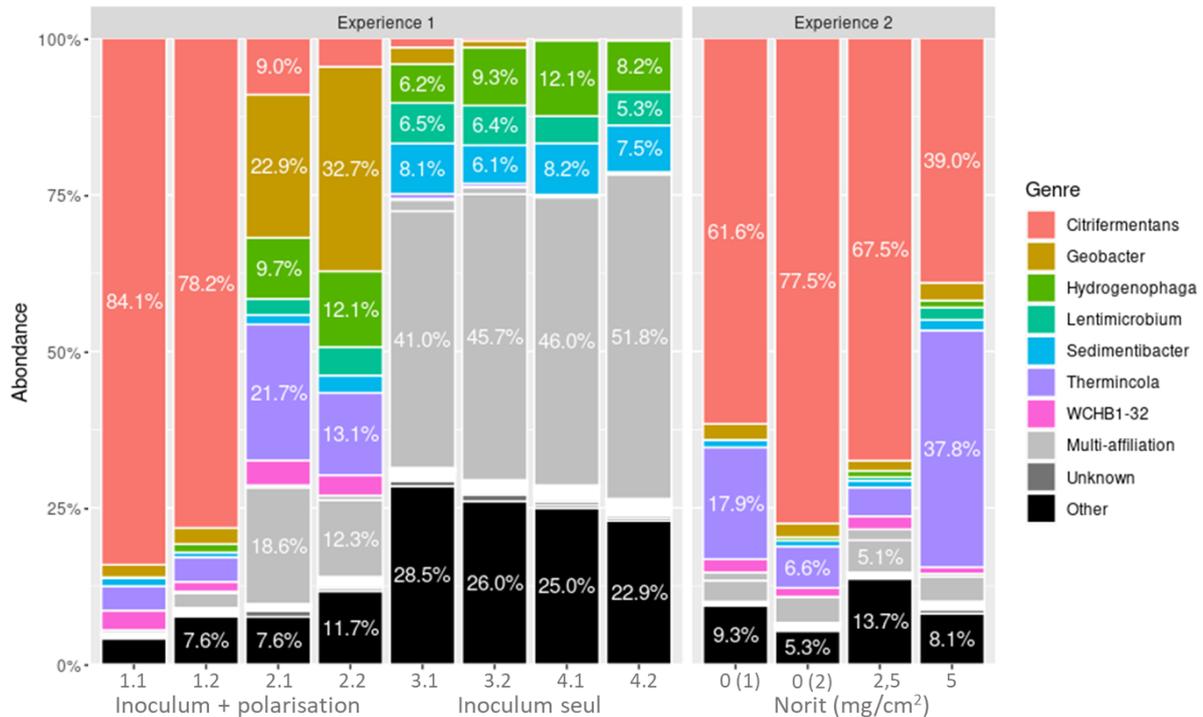


Figure 7.6 : Abondance relative des genres. Pour l'expérience 1, les colonnes présentent 2 échantillons de chacune des 2 électrodes polarisées (1.1, 1.2, 2.1, 2.2) et non polarisées (3.1, 3.2, 4.1, 4.2). Pour l'expérience 2, chaque colonne représente un échantillon d'électrode avec une concentration en composite de 0 (x2), 2,5 ou 5 mg/cm<sup>2</sup>.

La charge en composite sur les électrodes n'influence pas la communauté bactérienne du biofilm. Cette tendance se confirme avec les analyses en composantes principales (ACP) réalisées sur l'ensemble des données issues du séquençage de la région hyper variable V4-V5 du gène de l'ARNr 16S. La composante 1, qui représente 57% de la variance, sépare les échantillons selon qu'ils sont polarisés ou non, alors que la composante 2, représentant 21% de la variance, les sépare selon les deux expériences et donc probablement selon le type de feutre utilisé.

L'ACP fait apparaître 3 groupes distincts (Figure 7.7A). Tout d'abord les échantillons du réacteur 1 avec polarisation de l'expérience 1 (échantillons 1.1 et 1.2) sont groupés avec ceux de l'expérience 2, aussi polarisés. Il faut cependant noter une légère séparation entre les échantillons de l'expérience 1 et ceux de l'expérience 2, liée au feutre, différent dans les deux cas. Les échantillons du réacteur 2 avec polarisation de l'expérience 1 sont à part, ce qui semble logique puisque leurs populations microbiennes étaient différentes de celles des autres électrodes polarisées. Enfin, les échantillons d'électrodes non polarisées de l'expérience 1

(3.1, 3.2, 4.1 et 4.2) forment un troisième groupe. Cette répartition confirme les observations obtenues avec la représentation en barplots, montrant trois groupes d'échantillons.

Les cercles de corrélation relient la répartition des individus en fonction des conditions aux OTUs qui les caractérisent, c'est-à-dire les OTUs ayant le plus d'influence sur la variance entre les échantillons (Figure 7.7B). Ces cercles confirment les conclusions extraites de la représentation en barplots. Le genre caractéristique des échantillons des électrodes polarisés est *Citri fermentans* sauf pour les échantillons du réacteur 2 de l'expérience 1 (2.1 et 2.2). Il s'agit de la seule électrode qui a un comportement électrochimique singulier et dont le principal genre ayant une influence sur l'ACP est *Geobacter*. Les électrodes non polarisées (3.1, 3.2, 4.1 et 4.2) se distinguent car le genre caractéristique de l'absence de polarisation est *Sedimentibacter*.

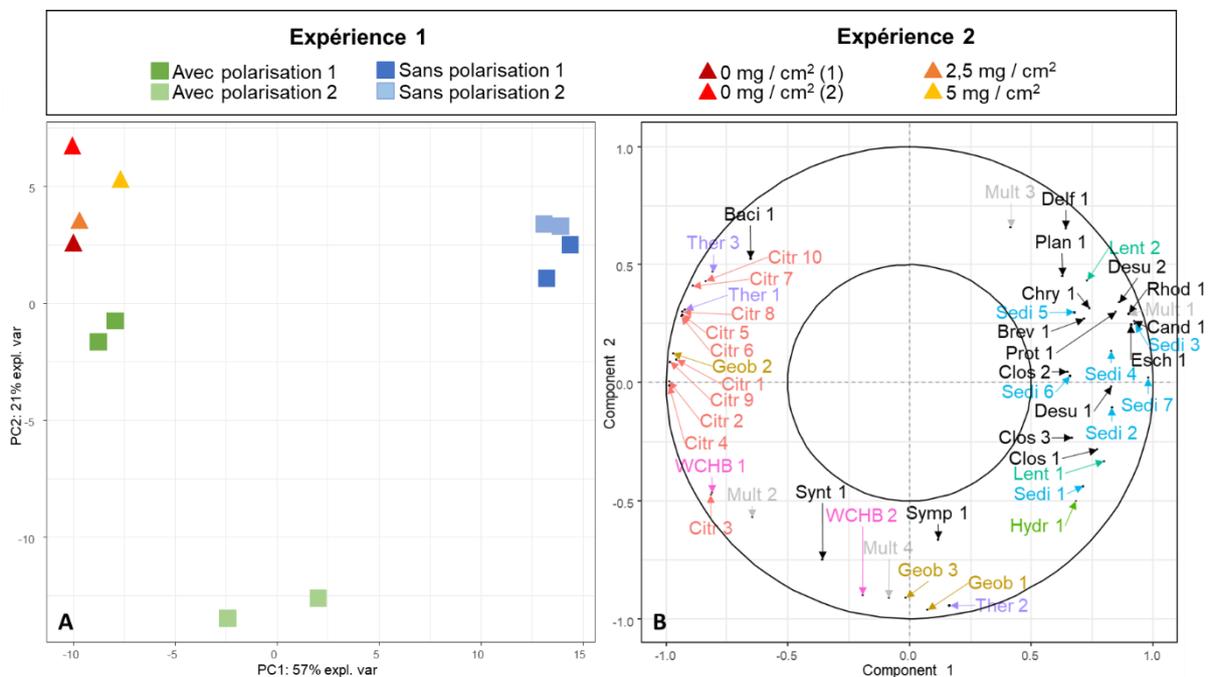


Figure 7.7 : Comparaison des échantillons basée sur l'expérience (1 ou 2) et la polarisation. (A) Représentation graphique des individus et (B) cercle de corrélation ; NB : Les OTUs sur les cercles de corrélation (B) sont nommés et colorés selon le genre bactérien avec les mêmes couleurs que celles utilisées dans la Figure 7.6.

## 6 Conclusion

La croissance d'un biofilm sous polarisation augmente considérablement la Cdl de l'interface, jusqu'à une valeur maximale de 25 F/m<sup>2</sup>. La plupart des études dédiées aux

électrodes microbiennes ne mesure pas la contribution du biofilm à la Cdl. Il est donc difficile de situer la valeur obtenue ici par rapport à l'état de l'art. Une valeur de 4,5 F/m<sup>2</sup> a été reportée récemment (Heijne et al., 2018). Cette valeur a été obtenue avec une électrode non poreuse, il est donc possible que la quantité de biofilm, plus importante dans le feutre utilisé ici, soit la raison du bon résultat que nous avons obtenu.

Pour la deuxième expérience, la surface de feutre de carbone a été modifiée avec 0, 1, 2,5, 4,5 et 5 mg/cm<sup>2</sup> de composite, constitué de charbon actif, de noir de carbone et de PVdF, afin d'augmenter sa capacité de double couche. La Figure 7.8 rassemble les valeurs de Cdl mesurées pour l'électrode propre et l'électrode recouverte de biofilm et en déduit par soustraction la contribution du biofilm seul.

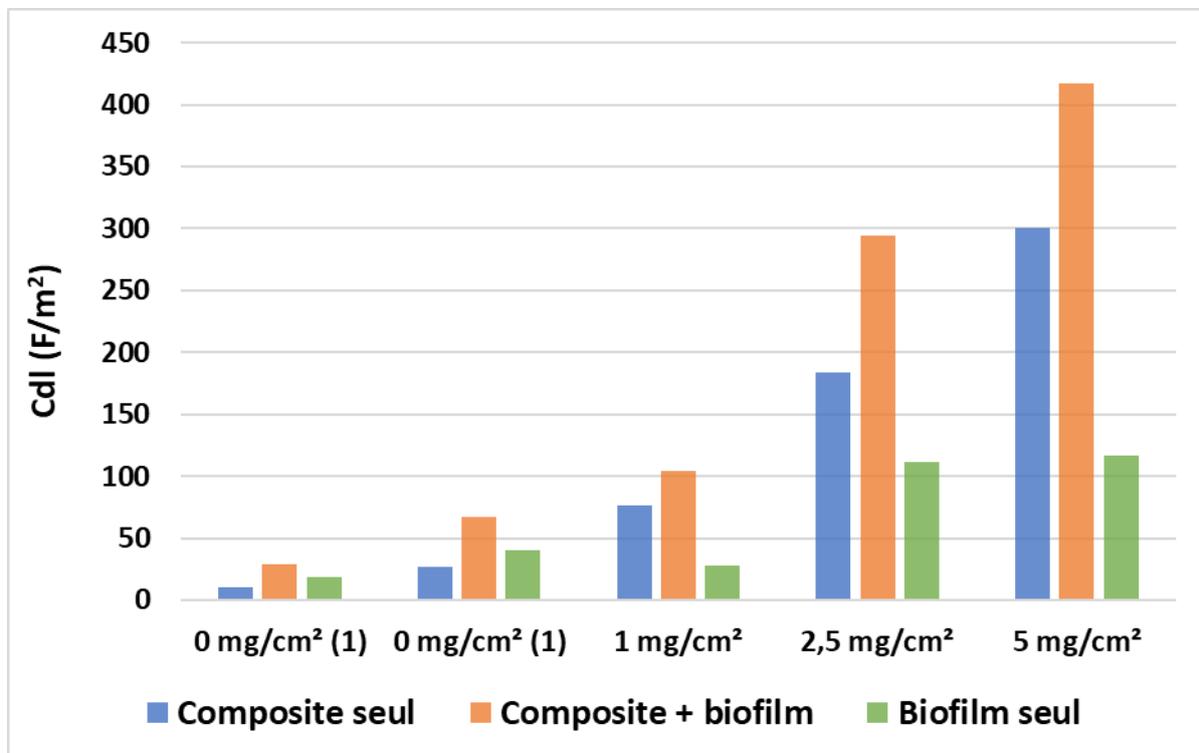


Figure 7.8 : Cdl obtenues avec les électrodes à surface modifiée par différentes quantités de composite, pour la surface propre, la surface + biofilm et contribution du biofilm seul.

La contribution du biofilm est similaire pour les contrôles et l'électrode recouverte de 1 mg/cm<sup>2</sup> de composite. En revanche elle est plus importante pour les électrodes recouvertes de 2,5 et 5 mg/cm<sup>2</sup> de composite. Elle n'augmente cependant que très peu entre 2,5 et 5 mg/cm<sup>2</sup> (de 111 à 117 F/m<sup>2</sup>) ce qui pourrait signifier qu'il s'agit de la Cdl maximale du biofilm avec ce matériau.

Il est évident que la Cdl croît avec la charge en composite. L'association de 5 mg/cm<sup>2</sup> de composite et du biofilm multiplie par 16 la Cdl par rapport au matériau propre sans modification de surface. Les valeurs, de l'ordre de quelques centaines de F/m<sup>2</sup>, sont cohérentes avec les Cdl obtenues pour d'autres matériaux carbonés capacitifs (Santoro et al., 2017b). Ces résultats ouvrent une perspective très intéressante pour allonger la période d'activité du biotuba avec aération séquentielle.

Le genre bactérien majoritaire identifié sur les électrodes qui produisent les densités de courant et les valeurs de Cdl les plus élevées est *Citrifermentans*, très peu décrit. Il appartient à la famille des *Geobacteraceae*. La concentration en composite n'a pas d'influence sur la communauté du biofilm anodique en revanche l'application ou non de polarisation est responsable de 57% de la variance entre les échantillons. La polarisation est à l'origine de la sélection microbienne, le composite permet lui une augmentation de la Cdl, c'est-à-dire du stockage de charge, sans influencer la composition des populations microbiennes.

## **7 Conclusion du chapitre 7**

Que ce soit pour les biotubas avec électrode aérée du chapitre 4, pour les biotubas avec électrode capillaire émergée du chapitre 5 ou pour celui-ci, toutes les expériences ont été réalisées avec du feutre de carbone non traité. Une des voies d'amélioration possible consiste à augmenter la capacité de double couche de l'électrode afin d'allonger la période d'activité du biotuba avec aération séquentielle (chapitre 4).

Les expériences réalisées dans ce sens ont montré que le développement d'un biofilm électroactif à la surface d'une anode augmente sa capacité de double couche électrique. Le traitement de la surface de l'électrode ou, comme testé ici, la modification de sa surface par l'ajout d'une couche de composite augmente encore l'effet du biofilm. La combinaison des deux a augmenté la capacité de double couche de l'interface d'un facteur 16 par rapport à l'électrode non traitée et sans biofilm. L'utilisation de matériaux capacitifs, couplé au développement d'un biofilm électroactif, semble donc être une option prometteuse pour augmenter les performances des biotubas en allongeant leur période d'activité en l'absence d'aération.



# ***Conclusions générales et perspectives***



Le biotuba a été développé dans l'objectif de diminuer le coût d'aération du traitement des eaux usées en passant d'une aération intensive de tout le bassin à une aération la plus réduite possible d'une partie du bassin. La thèse a eu pour objectif d'optimiser un biotuba pour le traitement des eaux usées domestiques en minimisant le besoin d'aération. Le principal verrou étant la concentration en oxygène dissous quasi-nulle dans les eaux usées à cause de sa consommation quasi instantanée par les bactéries présentes dans les eaux usées et les boues activées, il était donc nécessaire de faciliter au maximum le transfert de l'oxygène vers la partie cathodique du biotuba.

Les premiers travaux ont tenté de développer des cathodes microbiennes de réduction de l'oxygène sans aération forcée. Ces essais se sont montrés décevants à cause du faible transfert d'oxygène vers l'électrode. Il semblait alors que le recours à une aération forcée soit indispensable. L'objectif a donc été réorienté vers la minimisation de cette aération forcée.

Dans ce cadre, une électrode capable de transferts d'électrons extracellulaires bidirectionnels, c'est-à-dire qui se comporte en anode ou en cathode selon les conditions opératoires appliquées (apport de substrat ou d'oxygène), a été développée. Un protocole optimisé avec une alternance de phases anodiques et cathodiques a été mis en place. L'électrode bidirectionnelle assure des densités maximales de courant d'oxydation de l'ordre de  $6,4 \text{ A/m}^2$ , c'est-à-dire au niveau des meilleures performances reportées dans la bibliographie avec des eaux usées domestiques réelles. La densité de courant cathodique maximale est de  $0,15 \text{ A/m}^2$ .

Un premier biotuba a été mis en place, avec une aération réalisée en continu sur la partie haute. Cette configuration n'a pas été concluante car il est difficile de maintenir une partie haute aérobie et une partie basse anaérobie sur le long terme. Une aération séquentielle de la partie haute a alors été testée en exploitant le protocole de formation des électrodes bidirectionnelles.

Les résultats indiquent que le potentiel du biotuba est un paramètre clé pour son pilotage. Le potentiel se situe entre  $-0,4$  à  $-0,5 \text{ V}$  vs ECS lors des phases anaérobies et entre  $0$  et  $+0,1 \text{ V}$  vs ECS lors des phases aérobies. Lorsque l'aération est stoppée, le passage du potentiel haut au potentiel bas correspond à la période d'activité du biotuba pendant laquelle il assure l'oxydation de la matière organique et donc l'abattement de la DCO. Dans la configuration mise en œuvre, cette période dure environ 30 minutes, alors que l'abattement de la DCO cesse dès l'arrêt de l'aération pour les contrôles sans biotuba. Il est ainsi possible de régler la fréquence des aérations, puisqu'une durée sans aération de plus de 30 minutes est inutile pour ce qui concerne l'abattement de la DCO. Toutefois, une aération trop

importante gêne le développement du biofilm anodique, du fait de la compétition avec les bactéries aérobies.

Dans les eaux usées réelles, avec une aération de 30 minutes toutes les 1 heure 30, les biotubas ont permis un abattement jusqu'à 3 fois plus important que dans les contrôles sans biotuba soumis aux mêmes conditions d'aération. L'abattement était 3 à 6,3 fois plus important avec une aération de 30 minutes toutes les 5 heures 30. Le biotuba permet donc une accélération du traitement de la matière organique par rapport à une aération seule. Cependant ces systèmes exigent encore une aération forcée.

Au cours ces expérimentations, lors d'une baisse involontaire du niveau de solution qui a laissé une partie du biotuba à l'air libre, le potentiel est remonté aux valeurs normalement observées lors des phases d'aération forcée. Cette observation nous a amenés à développer la seconde stratégie de gestion de l'oxygène. L'hypothèse qu'une partie émergée de l'électrode pouvait travailler en cathode a d'abord été testée dans des milieux contrôlé (eaux usées synthétiques) ou connu (lixiviat de terreau), inoculés avec du lombricompost, en formant les anodes et cathodes séparément avant de concevoir un biotuba complet.

Dans le milieu lixiviat de terreau, il a été possible de former une anode microbienne capable d'oxyder l'acétate après avoir simplement laissé l'électrode en solution durant 3 à 6 jours en circuit ouvert. Pour la cathode, la même période en circuit ouvert était nécessaire pour le développement d'une cathode capillaire émergée. En présence d'un biofilm et dans un milieu anoxique, la cathode capillaire émergée permet de maintenir une activité de réduction de l'oxygène, contrairement à une cathode totalement immergée. Les cathodes de 20 cm de hauteur dont 19 cm sont émergés produisent un courant de réduction de l'oxygène au potentiel de -0,5 V vs ECS jusqu'à 7,6 fois plus important que les cathodes de 1 cm de hauteur totalement immergées.

Les informations acquises sur les anodes et les cathodes sont ensuite couplées pour concevoir le premier biotuba avec électrode capillaire émergée. Il est testé sur l'oxydation de l'acétate en milieu synthétique. Les électrodes sont d'abord totalement immergées pendant une semaine, correspondant au temps de formation des anodes et cathodes microbiennes. Le potentiel est alors de  $-0,45 \pm 0,03$  V vs ECS, similaire au potentiel observé précédemment en absence d'aération. Lorsque les électrodes sont émergées de 4, 8 et 12 cm (pour 14 cm immergés dans tous les cas) le potentiel augmente jusqu'à  $-0,16 \pm 0,02$  V, comme en présence d'aération forcée. L'émersion entraîne donc bien un effet similaire à l'aération. En une heure, le biotuba avec une électrode émergée de 12 cm a permis d'abattre 63% de la matière organique contre 24% pour les contrôles. La vitesse d'abattement de la DCO est

proportionnelle à la hauteur d'électrode émergée, avec une vitesse atteignant  $807 \pm 62$  mgO<sub>2</sub>/L/h pour le biotuba avec électrode émergée de 12 cm contre  $306 \pm 40$  mgO<sub>2</sub>/L/h pour les contrôles.

La technologie d'électrode capillaire émergée a ensuite été appliquée dans les eaux usées domestiques réelles inoculées avec des boues activées. De la même façon que dans le milieu synthétique, une cathode capillaire émergée est d'abord développée. La période de trempage en circuit ouvert reste nécessaire mais sa durée peut être abaissée à 3 jours. Une émergence d'au moins la moitié de l'électrode a assuré la production d'un courant de réduction de l'oxygène 3 fois plus important qu'une cathode complètement immergée.

Les premiers biotubas avec électrode capillaire émergée mis en place dans les eaux usées réelles ont utilisé les électrodes microbiennes formées auparavant pour les biotubas avec aération séquentielle. L'expérience est démarrée directement avec 8 cm d'électrode émergés. Les électrodes provenant de biotubas avec une aération séquentielle sur la partie haute se sont bien adaptées à la configuration émergée. Le potentiel moyen de  $-0,14 \pm 0,03$  V vs ECS est cohérent avec celui des biotubas émergés en eaux usées synthétiques. L'abattement de la DCO, avec une vitesse maximale de  $71 \pm 15$  mg d'O<sub>2</sub>/L/jour, est 2,8 fois plus important que pour les contrôles. Ces valeurs sont plus faibles que celles obtenues en eaux usées synthétiques. Cela peut être dû au fait que les biofilms utilisés en eaux usées réelles avaient été formés au préalable pendant une longue période dans des conditions différentes de l'émergence. La différence peut aussi être due aux concentrations initiales de substrat plus faibles dans les eaux usées réelles.

L'ensemble de ces résultats, obtenus en eaux usées synthétiques et réelles, fait la preuve du concept du biotuba à électrode capillaire émergée.

Des analyses de populations microbiennes ont été réalisées tout au long des travaux. Pour l'électrode bidirectionnelle, elles ont montré que le biofilm évolue peu au cours du temps et est peu sensible aux changements de conditions, ce qui explique la robustesse de l'électrode bidirectionnelle qui maintient ses performances au cours du temps. La plupart des OTUs affiliées aux *Gammaproteobacteria*, la classe majoritaire dans tous les échantillons, ont été affiliées au genre *Acinetobacter*.

Pour les autres études, les prélèvements ont tous été réalisés en fin d'expérience. Ils ont montré une riche diversité des populations microbiennes dans tous les cas, avec des distinctions entre les communautés des zones aérobies et anaérobies des biotubas. L'accès à l'oxygène est le critère déterminant, au-delà de la stratégie de transfert de l'oxygène

(aération séquentielle ou émergence partielle). Certaines classes tels que les *Bacteroidia*, les *Gammaproteobacteria* ou les *Clostridia* sont identifiées dans tous les chapitres. Cela peut s'expliquer par le fait qu'il s'agit de classes bactériennes ubiquitaires (Logan et al., 2019), présentes dans un grand nombre d'écosystèmes. Les *Bacteroidia* et les *Gammaproteobacteria* sont majoritairement présents dans les échantillons ayant accès à l'oxygène (biofilm externe, partie de l'électrode émergée ou aérée). A l'inverse, la classe des *Clostridia* est retrouvée dans les échantillons en zone anaérobie ou dans les échantillons de biofilm interne à l'électrode.

Quelques genres dominants tels que *Acinetobacter* ou *Pseudomonas* ont été identifiés aussi bien sur les électrodes bidirectionnelles formées dans les eaux usées réelles inoculées avec les boues activées que sur les biotubas avec électrode capillaire émergée dans les eaux usées synthétiques inoculées avec du lombricompost. Les espèces affiliées à ces genres sont aérobies ou anaérobies facultatives, naturellement présentes dans de nombreux écosystèmes, et connues comme électroactives. Même lorsqu'elles proviennent d'inocula différents, l'électrode qui a l'accès à l'oxygène sélectionne ces espèces.

La technologie du biotuba avec électrode capillaire émergée est nouvelle et de nombreux axes d'amélioration sont à explorer pour améliorer les cinétiques de réduction de l'oxygène et d'oxydation de la matière organique.

Le biotuba a donné les vitesses d'abattement de la DCO les plus élevées avec la hauteur émergée la plus élevée qui a été testée (12 cm). La hauteur maximale utile reste donc à déterminer. La plus longue période sans immersion complète était de 12 jours, avec une légère perte de performances à la fin. La hauteur et la période d'émergence doivent faire l'objet des prochaines études afin de définir leur valeur optimale. De plus, l'immersion régulière étant sans doute indispensable pour maintenir l'humidité du biofilm émergé, plusieurs options sont à envisager: changement du niveau dans le bassin, changement de hauteur du biotuba ou encore ruissellement sur la partie haute.

Evidemment, il est indispensable d'explorer plus finement les mécanismes réactionnels afin de cerner les processus et les microorganismes responsables d'abattement aussi rapides. La compréhension des mécanismes pourrait conduire à de nouvelles voies d'amélioration, par exemple en tentant de favoriser le développement des espèces bactériennes appropriées.

Un travail doit être fait sur les matériaux, afin de sélectionner les plus appropriés pour les parties anodiques et cathodiques. Dans le cas du biotuba aéré, la période d'activité est de 30 minutes après l'arrêt de l'aération. Une augmentation de la capacité de double couche

permettrait un stockage de charges plus important au niveau de l'interface électrode-milieu et donc une période d'activité du biotuba plus longue.

L'étude de l'influence de la croissance du biofilm sur la capacité de double couche de l'interface a été initiée au cours du stage de Master de Hugo Terol. Cette étude a confirmé l'augmentation de la capacité de double couche lors de la croissance du biofilm. La capacité de double couche a atteint un maximum de  $300 \pm 102 \text{ F/m}^2$  en augmentant les propriétés capacitives de l'électrode par la modification de sa surface par un composite. L'augmentation de capacité induite par la croissance du biofilm est plus importante en présence du composite. Il est possible que le traitement de surface permette une meilleure adhésion et le développement d'une plus grande quantité de biofilm, augmentant ainsi la capacité de double couche. Au vu de ces premiers résultats, il serait intéressant de tester ce type de matériaux pour la conception d'un biotuba.

Le biochar, un matériau issu de la pyrolyse de végétaux, constitue une autre proposition de matériau pour le biotuba car il permet d'obtenir des électrodes avec une surface spécifique et une capacité de double couche importantes. Des électrodes en biochar ont déjà été utilisées dans des procédés électro-microbiens performants (Prado et al., 2019; PrévotEAU et al., 2016). Des tests avec des cubes de biochar fournis par le partenaire du projet 6TMIC étaient programmés mais n'ont pas pu être mis en place à cause des confinements liés à la Covid-19. Le biochar permettrait d'atteindre l'un des objectifs du projet ANR Biotuba visant l'utilisation de matériaux peu coûteux, recyclés ou recyclables. A l'heure actuelle, le principal verrou à l'utilisation de ces matériaux est leur faible résistance mécanique.

Dans l'optique de développer un biotuba avec une électrode capillaire émergée, des études supplémentaires doivent être réalisées pour identifier un matériau, et éventuellement un traitement de surface, assurant les meilleures propriétés mécaniques, électrochimiques et capillaires. Afin de se rapprocher du feutre de carbone utilisé ici, des essais de pyrolyse de matériaux fibreux ont été menés par la société 6TMIC, mais ils ne permettent pas pour l'instant d'obtenir une tenue mécanique suffisante pour être appliqués au biotuba.

Enfin, cette étude a été réalisée à l'échelle de pilotes de laboratoire, dans des réacteurs d'un volume de quelques centaines de millilitres. Les efforts doivent maintenant porter sur la démonstration du concept de biotuba avec électrode capillaire émergée sur des pilotes de plus grande taille. Les travaux se poursuivent dans ce sens dans le cadre du projet ANR Biotuba.



## ***Références bibliographiques***



- Aelterman, P., Rabaey, K., Clauwaert, P., Verstraete, W., 2006. Microbial fuel cells for wastewater treatment. *Water Science and Technology* 54, 9–15. <https://doi.org/10.2166/wst.2006.702>
- Agence de l'Eau Rhône-Méditerranée-Corse, 2018. Consommations énergétiques des stations d'épuration françaises. Etat des lieux et recommandations.
- Aguirre-Sierra, A., Bacchetti-De Gregoris, T., Berná, A., Salas, J.J., Aragón, C., Esteve-Núñez, A., 2016. Microbial electrochemical systems outperform fixed-bed biofilters in cleaning up urban wastewater. *Environmental Science: Water Research & Technology* 2, 984–993. <https://doi.org/10.1039/C6EW00172F>
- Ahn, Y., Hatzell, M.C., Zhang, F., Logan, B.E., 2014. Different electrode configurations to optimize performance of multi-electrode microbial fuel cells for generating power or treating domestic wastewater. *Journal of Power Sources* 249, 440–445. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2013.10.081>
- Ahn, Y., Logan, B.E., 2010. Effectiveness of domestic wastewater treatment using microbial fuel cells at ambient and mesophilic temperatures. *Bioresource Technology* 101, 469–475. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.07.039>
- Aldrovandi, A., Marsili, E., Stante, L., Paganin, P., Tabacchioni, S., Giordano, A., 2009. Sustainable power production in a membrane-less and mediator-less synthetic wastewater microbial fuel cell. *Bioresource Technology* 100, 3252–3260. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.01.041>
- Ali, A.E.-H., Gomaa, O.M., Fathey, R., Kareem, H.A.E., Zaid, M.A., 2015. Optimization of double chamber microbial fuel cell for domestic wastewater treatment and electricity production. *Journal of Fuel Chemistry and Technology* 43, 1092–1099. [https://doi.org/10.1016/S1872-5813\(15\)30032-3](https://doi.org/10.1016/S1872-5813(15)30032-3)
- Amorim, T.L., Duarte, L.M., Silva, E.M. da, Oliveira, M.A.L. de, 2021. Capillary electromigration methods for fatty acids determination in vegetable and marine oils: A review. *ELECTROPHORESIS* 42, 289–304. <https://doi.org/10.1002/elps.202000260>
- Bajracharya, S., ter Heijne, A., Dominguez Benetton, X., Vanbroekhoven, K., Buisman, C.J.N., Strik, D.P.B.T.B., Pant, D., 2015. Carbon dioxide reduction by mixed and pure cultures in microbial electrosynthesis using an assembly of graphite felt and stainless steel as a cathode. *Bioresource Technology, Microbial Fuel Cells* 195, 14–24. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.05.081>
- Bardal, E., Drugli, J.M., Gartland, P.O., 1993. The behaviour of corrosion-resistant steels in seawater: A review. *Corrosion Science, Advances in Corrosion and Protection* 35, 257–267. [https://doi.org/10.1016/0010-938X\(93\)90157-C](https://doi.org/10.1016/0010-938X(93)90157-C)
- Barua, S., Zakaria, B.S., Lin, L., Dhar, B.R., 2019. Shaping microbial communities with conductive carbon fibers to enhance methane productivity and kinetics. *Bioresource Technology Reports* 5, 20–27. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2018.11.008>
- Baudler, A., Schmidt, I., Langner, M., Greiner, A., Schröder, U., 2015. Does it have to be carbon? Metal anodes in microbial fuel cells and related bioelectrochemical systems. *Energy & Environmental Science* 8, 2048–2055. <https://doi.org/10.1039/C5EE00866B>
- Bennani, Y., Peters, M.C.F.M., Appel, P.W., Rietveld, L.C., 2015. Electrochemically active biofilm and photoelectrocatalytic regeneration of the titanium dioxide composite electrode for advanced oxidation in water treatment. *Electrochimica Acta* 182, 604–612. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2015.09.101>
- Bennetto, H.P., 1990. Electricity generation by microorganisms. *Biotechnology Education* 1, 163–168.

- Bergel, A., Basséguy, R., Délia, M.-L., Erable, B., Etcheverry, L., 2013. Des biofilms pour produire de l'électricité. *Biofutur* 341, 45.
- Bergel, A., Etcheverry, L., Erable, B., 2008. Procédé et équipement pour l'oxydation de matières organiques. FR 0850833.
- Bergel, A., Féron, D., Mollica, A., 2005. Catalysis of oxygen reduction in PEM fuel cell by seawater biofilm. *Electrochemistry Communications* 7, 900–904. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2005.06.006>
- Bitton, G., Balkwill, D.L., Burlage, R.S., Capone, D., Crisman, T.L., Dowd, S.E., Flemming, H.-C., Gerba, C.P., 2002. *Encyclopedia of Environmental Microbiology*.
- Blanchet, E., 2016. Conception d'un procédé d'électrosynthèse microbienne.
- Blanchet, E., Desmond, E., Erable, B., Bridier, A., Bouchez, T., Bergel, A., 2015. Comparison of synthetic medium and wastewater used as dilution medium to design scalable microbial anodes: Application to food waste treatment. *Bioresource Technology* 185, 106–115. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.02.097>
- Blanchet, E., Erable, B., De Solan, M.-L., Bergel, A., 2016. Two-dimensional carbon cloth and three-dimensional carbon felt perform similarly to form bioanode fed with food waste. *Electrochemistry Communications* 66, 38–41. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2016.02.017>
- Blanchet, E., Pécastaings, S., Erable, B., Roques, C., Bergel, A., 2014. Protons accumulation during anodic phase turned to advantage for oxygen reduction during cathodic phase in reversible bioelectrodes. *Bioresource Technology* 173, 224–230. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.09.076>
- Blázquez, E., Gabriel, D., Baeza, J.A., Guisasaola, A., 2016. Treatment of high-strength sulfate wastewater using an autotrophic biocathode in view of elemental sulfur recovery. *Water Research* 105, 395–405. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.09.014>
- Boitier, V., Alonso, C., 2005. Dimensionnement d'un Système Photovoltaïque 6.
- Bond, D.R., Holmes, D.E., Tender, L.M., Lovley, D.R., 2002. Electrode-Reducing Microorganisms That Harvest Energy from Marine Sediments. *Science* 295, 483–485. <https://doi.org/10.1126/science.1066771>
- Bond, D.R., Lovley, D.R., 2003. Electricity Production by *Geobacter sulfurreducens* Attached to Electrodes. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1548–1555. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.3.1548-1555.2003>
- Bosire, E.M., Rosenbaum, M.A., 2017. Electrochemical Potential Influences Phenazine Production, Electron Transfer and Consequently Electric Current Generation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Front. Microbiol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00892>
- Bouffier, L., Sojic, N., Kuhn, A., 2017. Capillary-assisted bipolar electrochemistry: A focused mini review. *ELECTROPHORESIS* 38, 2687–2694. <https://doi.org/10.1002/elps.201600568>
- Brigmon, R.L., Furlong, M., Whitman, W.B., 2003. Identification of *Thiothrix unzii* in two distinct ecosystems. *Letters in Applied Microbiology* 36, 88–91. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2003.01256.x>
- Cai, H., Wang, J., Bu, Y., Zhong, Q., 2013. Treatment of carbon cloth anodes for improving power generation in a dual-chamber microbial fuel cell. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 88, 623–628. <https://doi.org/10.1002/jctb.3875>
- Caizán-Juanarena, L., Sleutels, T., Borsje, C., ter Heijne, A., 2020. Considerations for application of granular activated carbon as capacitive bioanode in bioelectrochemical

- systems. *Renewable Energy* 157, 782–792. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.05.049>
- Cao, X., Wang, H., Long, X., Nishimura, O., Li, X., 2021. Limitation of voltage reversal in the degradation of azo dye by a stacked double-anode microbial fuel cell and characterization of the microbial community structure. *Science of The Total Environment* 754, 142454. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142454>
- Cercado, B., Byrne, N., Bertrand, M., Pocaznoi, D., Rimboud, M., Achouak, W., Bergel, A., 2013. Garden compost inoculum leads to microbial bioanodes with potential-independent characteristics. *Bioresource Technology* 134, 276–284. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.123>
- Cercado-Quezada, B., Delia, M.-L., Bergel, A., 2011. Electrochemical micro-structuring of graphite felt electrodes for accelerated formation of electroactive biofilms on microbial anodes. *Electrochemistry Communications* 13, 440–443. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2011.02.015>
- Chabert, N., Amin Ali, O., Achouak, W., 2015. All ecosystems potentially host electrogenic bacteria. *Bioelectrochemistry* 106, 88–96. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2015.07.004>
- Champigneux, P., Renault-Sentenac, C., Bourrier, D., Rossi, C., Delia, M.-L., Bergel, A., 2019. Effect of surface roughness, porosity and roughened micro-pillar structures on the early formation of microbial anodes 28.
- Chandrasekaran, P., Dexter, S.C., Eashwar, M., 1993. Factors contributing to ennoblement of passive metals due to biofilms in seawater. P. Chandrasekaran, S. C. Dexter, and M. Eashwar, Paper.
- Chang, C.-C., Kao, W., Yu, C.-P., 2020. Assessment of voltage reversal effects in the serially connected biocathode-based microbial fuel cells through treatment performance, electrochemical and microbial community analysis. *Chemical Engineering Journal* 397, 125368. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.125368>
- Chen, G.-W., Choi, S.-J., Cha, J.-H., Lee, T.-H., Kim, C.-W., 2010. Microbial community dynamics and electron transfer of a biocathode in microbial fuel cells. *Korean J. Chem. Eng.* 27, 1513–1520. <https://doi.org/10.1007/s11814-010-0231-6>
- Chen, J., Hu, Y., Huang, W., Zhang, L., 2017. Enhanced electricity generation for biocathode microbial fuel cell by in situ microbial-induced reduction of graphene oxide and polarity reversion. *International Journal of Hydrogen Energy* 42, 12574–12582. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.03.012>
- Chen, J., Wang, C., Pan, Y., Farzana, S.S., Tam, N.F.-Y., 2018. Biochar accelerates microbial reductive debromination of 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47) in anaerobic mangrove sediments. *Journal of Hazardous Materials* 341, 177–186. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.07.063>
- Chen, L., Zhang, P., Shang, W., Zhang, H., Li, Y., Zhang, W., Zhang, Z., Liu, F., 2018. Enrichment culture of electroactive microorganisms with high magnetic susceptibility enhances the performance of microbial fuel cells. *Bioelectrochemistry* 121, 65–73. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2018.01.005>
- Chen, Shuiliang, Brown, R.K., Patil, S.A., Huber, K.J., Overmann, J., Schröder, U., 2019. Aerobic microbial electrochemical technology based on the coexistence and interactions of aerobes and exoelectrogens for synergistic pollutant removal from wastewater. *Environmental Science* 10.
- Chen, S., He, G., Liu, Q., Harnisch, F., Zhou, Y., Chen, Y., Hanif, M., Wang, S., Peng, X., Hou, H., Schröder, U., 2012. Layered corrugated electrode macrostructures boost microbial

- bioelectrocatalysis. *Energy & Environmental Science* 5, 9769. <https://doi.org/10.1039/c2ee23344d>
- Chen, Shaohua, He, S., Wu, C., Du, D., 2019. Characteristics of heterotrophic nitrification and aerobic denitrification bacterium *Acinetobacter* sp. T1 and its application for pig farm wastewater treatment. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 127, 201–205. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.07.025>
- Cheng, K.Y., Ho, G., Cord-Ruwisch, R., 2010. Anodophilic Biofilm Catalyzes Cathodic Oxygen Reduction. *Environmental Science & Technology* 44, 518–525. <https://doi.org/10.1021/es9023833>
- Cheng, S., Liu, H., Logan, B.E., 2006a. Increased Power Generation in a Continuous Flow MFC with Advective Flow through the Porous Anode and Reduced Electrode Spacing. *Environmental Science & Technology* 40, 2426–2432. <https://doi.org/10.1021/es051652w>
- Cheng, S., Liu, H., Logan, B.E., 2006b. Increased Power Generation in a Continuous Flow MFC with Advective Flow through the Porous Anode and Reduced Electrode Spacing. *Environ. Sci. Technol.* 40, 2426–2432. <https://doi.org/10.1021/es051652w>
- Choi, J., Ahn, Y., 2013. Continuous electricity generation in stacked air cathode microbial fuel cell treating domestic wastewater. *Journal of Environmental Management* 130, 146–152. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2013.08.065>
- Chong, P., Erable, B., Bergel, A., 2019a. Effect of pore size on the current produced by 3-dimensional porous microbial anodes: A critical review. *Bioresource Technology* 289, 121641. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121641>
- Chong, P., Erable, B., Bergel, A., 2019b. Microbial anodes: What actually occurs inside pores? *International Journal of Hydrogen Energy* 44, 4484–4495. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.09.075>
- Choudhury, P., Narayan Ray, R., Nath Tiwari, O., Kanti Bandyopadhyay, T., Muthuraj, M., Bhunia, B., 2021. Strategies for improvement of microbial fuel cell performance via stable power generation from real dairy wastewater. *Fuel* 288, 119653. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.119653>
- Corbella, C., Puigagut, J., 2018. Improving domestic wastewater treatment efficiency with constructed wetland microbial fuel cells: Influence of anode material and external resistance. *Science of The Total Environment* 631–632, 1406–1414. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.084>
- Corteselli, E.M., Aitken, M.D., Singleton, D.R., 2017. *Rugosibacter aromaticivorans* gen. nov., sp. nov., a bacterium within the family Rhodocyclaceae, isolated from contaminated soil, capable of degrading aromatic compounds. *Int J Syst Evol Microbiol* 67, 311–318. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001622>
- Cristiani, P., Carvalho, M.L., Guerrini, E., Daghighi, M., Santoro, C., Li, B., 2013. Cathodic and anodic biofilms in Single Chamber Microbial Fuel Cells. *Bioelectrochemistry* 92, 6–13. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2013.01.005>
- Croese, E., Pereira, M.A., Euserink, G.-J.W., Stams, A.J.M., Geelhoed, J.S., 2011. Analysis of the microbial community of the biocathode of a hydrogen-producing microbial electrolysis cell. *Appl Microbiol Biotechnol* 92, 1083–1093. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3583-x>
- Cruz Vigg, C., Matturro, B., Frascadore, E., Insogna, S., Mezzi, A., Kaciulis, S., Sherry, A., Mejha, O.K., Head, I.M., Vaiopoulou, E., Rabaey, K., Rossetti, S., Aulenta, F., 2017. Bridging spatially segregated redox zones with a microbial electrochemical snorkel triggers biogeochemical cycles in oil-contaminated River Tyne (UK) sediments. *Water Research* 127, 11–21. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.10.002>

- Cruz Viggi, C., Presta, E., Bellagamba, M., Kaciulis, S., Balijepalli, S.K., Zanaroli, G., Petrangeli Papini, M., Rossetti, S., Aulenta, F., 2015. The “Oil-Spill Snorkel”: an innovative bioelectrochemical approach to accelerate hydrocarbons biodegradation in marine sediments. *Frontiers in Microbiology* 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00881>
- Davis, J.B., Yarbrough, H.F., 1962. Preliminary Experiments on a Microbial Fuel Cell. *Science* 137, 615–616.
- Debuy, S., Pecastaings, S., Bergel, A., Erable, B., 2015. Oxygen-reducing biocathodes designed with pure cultures of microbial strains isolated from seawater biofilms. *International Biodeterioration & Biodegradation* 103, 16–22. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.03.028>
- Deeke, A., Sleutels, T.H.J.A., Hamelers, H.V.M., Buisman, C.J.N., 2012. Capacitive Bioanodes Enable Renewable Energy Storage in Microbial Fuel Cells. *Environ. Sci. Technol.* 46, 3554–3560. <https://doi.org/10.1021/es204126r>
- Deeke, A., Sleutels, T.H.J.A., Heijne, A.T., Hamelers, H.V.M., Buisman, C.J.N., 2013. Influence of the thickness of the capacitive layer on the performance of bioanodes in Microbial Fuel Cells. *Journal of Power Sources* 243, 611–616. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2013.05.195>
- Desmond-Le Quéméner, E., Rimboud, M., Bridier, A., Madigou, C., Erable, B., Bergel, A., Bouchez, T., 2016. Biocathodes reducing oxygen at high potential select biofilms dominated by Ectothiorhodospiraceae populations harboring a specific association of genes. *Bioresource Technology* 214, 55–62. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.04.087>
- Do, M.H., Ngo, H.H., Guo, W.S., Liu, Y., Chang, S.W., Nguyen, D.D., Nghiem, L.D., Ni, B.J., 2018. Challenges in the application of microbial fuel cells to wastewater treatment and energy production: A mini review. *Science of The Total Environment* 639, 910–920. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.136>
- Domínguez-Garay, A., Quejigo, J.R., Dörfler, U., Schroll, R., Esteve-Núñez, A., 2017. Bioelectroventing: an electrochemical-assisted bioremediation strategy for cleaning-up atrazine-polluted soils. *Microbial Biotechnology* 11, 50–62. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12687>
- Donaldson, G.P., Lee, S.M., Mazmanian, S.K., 2016. Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nature Reviews Microbiology* 14, 20–32. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3552>
- Dumas, C., Mollica, A., Féron, D., Basséguy, R., Etcheverry, L., Bergel, A., 2007. Marine microbial fuel cell: Use of stainless steel electrodes as anode and cathode materials. *Electrochimica Acta* 53, 468–473. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2007.06.069>
- Duteanu, N., Erable, B., Senthil Kumar, S.M., Ghangrekar, M.M., Scott, K., 2010. Effect of chemically modified Vulcan XC-72R on the performance of air-breathing cathode in a single-chamber microbial fuel cell. *Bioresource Technology* 101, 5250–5255. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.120>
- Emerson, D., Rentz, J.A., Lilburn, T.G., Davis, R.E., Aldrich, H., Chan, C., Moyer, C.L., 2007. A Novel Lineage of Proteobacteria Involved in Formation of Marine Fe-Oxidizing Microbial Mat Communities. *PLoS ONE* 2, e667. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000667>
- Erable, B., Duteanu, N., Kumar, S.M.S., Feng, Y., Ghangrekar, M.M., Scott, K., 2009a. Nitric acid activation of graphite granules to increase the performance of the non-catalyzed oxygen reduction reaction (ORR) for MFC applications. *Electrochemistry Communications* 11, 1547–1549. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2009.05.057>

- Erable, B., Etcheverry, L., Bergel, A., 2011. From microbial fuel cell (MFC) to microbial electrochemical snorkel (MES): maximizing chemical oxygen demand (COD) removal from wastewater. *Biofouling* 27, 319–326. <https://doi.org/10.1080/08927014.2011.564615>
- Erable, B., Féron, D., Bergel, A., 2012. Microbial Catalysis of the Oxygen Reduction Reaction for Microbial Fuel Cells: A Review. *ChemSusChem* 5, 975–987. <https://doi.org/10.1002/cssc.201100836>
- Erable, B., Roncato, M.-A., Achouak, W., Bergel, A., 2009b. Sampling Natural Biofilms: A New Route to Build Efficient Microbial Anodes. *Environ. Sci. Technol.* 43, 3194–3199. <https://doi.org/10.1021/es803549v>
- Escudié, F., Auer, L., Bernard, M., Mariadassou, M., Cauquil, L., Vidal, K., Maman, S., Hernandez-Raquet, G., Combes, S., Pascal, G., 2018. FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution. *Bioinformatics* 34, 1287–1294. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx791>
- Estrada-Arriaga, E.B., Hernández-Romano, J., García-Sánchez, L., Guillén Garcés, R.A., Bahena-Bahena, E.O., Guadarrama-Pérez, O., Moeller Chavez, G.E., 2018. Domestic wastewater treatment and power generation in continuous flow air-cathode stacked microbial fuel cell: Effect of series and parallel configuration. *Journal of Environmental Management* 214, 232–241. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.03.007>
- Fang, D., Chen, B., 2017. Linkage analysis for the water–energy nexus of city. *Applied Energy* 189, 770–779. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2016.04.020>
- Feng, Y., He, W., Liu, J., Wang, X., Qu, Y., Ren, N., 2014. A horizontal plug flow and stackable pilot microbial fuel cell for municipal wastewater treatment. *Bioresource Technology* 156, 132–138. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.104>
- Firdous, S., Jin, W., Shahid, N., Bhatti, Z.A., Iqbal, A., Abbasi, U., Mahmood, Q., Ali, A., 2018. The performance of microbial fuel cells treating vegetable oil industrial wastewater. *Environmental Technology & Innovation* 10, 143–151. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2018.02.006>
- Flemming, H.-C., 1995. Sorption sites in biofilms. *Water Science and Technology* 32, 27–33. <https://doi.org/10.2166/wst.1995.0256>
- Fredrickson, J.K., Romine, M.F., Beliaev, A.S., Auchtung, J.M., Driscoll, M.E., Gardner, T.S., Nealson, K.H., Osterman, A.L., Pinchuk, G., Reed, J.L., Rodionov, D.A., Rodrigues, J.L.M., Saffarini, D.A., Serres, M.H., Spormann, A.M., Zhulin, I.B., Tiedje, J.M., 2008. Towards environmental systems biology of *Shewanella*. *Nature Reviews Microbiology* 6, 592–603. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1947>
- Freguia, S., Rabaey, K., Yuan, Z., Keller, J., 2008. Sequential anode–cathode configuration improves cathodic oxygen reduction and effluent quality of microbial fuel cells. *Water Research* 42, 1387–1396. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.10.007>
- Gao, Y., Huang, H., Peng, C., Fan, X., Hu, J., Ren, H., 2020. Simultaneous nitrogen removal and toxicity reduction of synthetic municipal wastewater by micro-electrolysis and sulfur-based denitrification biofilter. *Bioresource Technology* 316, 123924. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123924>
- Garrity, G.M., Bell, J.A., Lilburn, T., 2015. Hydrogenophilaceae fam. nov. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* 1–1.
- Gil, G.-C., Chang, I.-S., Kim, B.H., Kim, M., Jang, J.-K., Park, H.S., Kim, H.J., 2003. Operational parameters affecting the performance of a mediator-less microbial fuel cell. *Biosensors and Bioelectronics* 18, 327–334. [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(02\)00110-0](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(02)00110-0)

- Global Water Microbiome Consortium, Wu, L., Ning, D., Zhang, B., Li, Y., Zhang, P., Shan, X., Zhang, Q., Brown, M.R., Li, Z., Van Nostrand, J.D., Ling, F., Xiao, N., Zhang, Y., Vierheilig, J., Wells, G.F., Yang, Y., Deng, Y., Tu, Q., Wang, A., Zhang, T., He, Z., Keller, J., Nielsen, P.H., Alvarez, P.J.J., Criddle, C.S., Wagner, M., Tiedje, J.M., He, Q., Curtis, T.P., Stahl, D.A., Alvarez-Cohen, L., Rittmann, B.E., Wen, X., Zhou, J., 2019. Global diversity and biogeography of bacterial communities in wastewater treatment plants. *Nature Microbiology* 4, 1183–1195. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0426-5>
- González-García, J., Bonete, P., Expósito, E., Montiel, V., Aldaz, A., Torregrosa-Maciá, R., 1999. Characterization of a carbon felt electrode: structural and physical properties. *J. Mater. Chem.* 9, 419–426. <https://doi.org/10.1039/A805823G>
- Guadarrama-Pérez, O., Gutiérrez-Macías, T., García-Sánchez, L., Guadarrama-Pérez, V.H., Estrada-Arriaga, E.B., 2019. Recent advances in constructed wetland-microbial fuel cells for simultaneous bioelectricity production and wastewater treatment: A review. *International Journal of Energy Research* 43, 5106–5127. <https://doi.org/10.1002/er.4496>
- Guo, K., Freguia, S., Dennis, P.G., Chen, X., Donose, B.C., Keller, J., Gooding, J.J., Rabaey, K., 2013. Effects of Surface Charge and Hydrophobicity on Anodic Biofilm Formation, Community Composition, and Current Generation in Bioelectrochemical Systems. *Environ. Sci. Technol.* 47, 7563–7570. <https://doi.org/10.1021/es400901u>
- Guo, K., PrévotEAU, A., Patil, S.A., Rabaey, K., 2015. Engineering electrodes for microbial electrocatalysis. *Current Opinion in Biotechnology, Environmental biotechnology • Energy biotechnology* 33, 149–156. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.02.014>
- Harnisch, F., Schröder, U., 2009. Selectivity versus Mobility: Separation of Anode and Cathode in Microbial Bioelectrochemical Systems. *ChemSusChem* 2, 921–926. <https://doi.org/10.1002/cssc.200900111>
- Hassan, H., Jin, B., Donner, E., Vasileiadis, S., Saint, C., Dai, S., 2018. Microbial community and bioelectrochemical activities in MFC for degrading phenol and producing electricity: Microbial consortia could make differences. *Chemical Engineering Journal* 332, 647–657. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.09.114>
- Hau, H.H., Gralnick, J.A., 2007. Ecology and Biotechnology of the Genus *Shewanella*. *Annu. Rev. Microbiol.* 61, 237–258. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.61.080706.093257>
- He, L., Du, P., Chen, Y., Lu, H., Cheng, X., Chang, B., Wang, Z., 2017. Advances in microbial fuel cells for wastewater treatment. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 71, 388–403. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.12.069>
- He, Z., Angenent, L.T., 2006. Application of Bacterial Biocathodes in Microbial Fuel Cells. *Electroanalysis* 18, 2009–2015. <https://doi.org/10.1002/elan.200603628>
- Heijne, A.T., Schaetzle, O., Gimenez, S., Fabregat-Santiago, F., Bisquert, J., Strik, D.P.B.T.B., Barrière, F., Buisman, C.J.N., Hamelers, H.V.M., 2011. Identifying charge and mass transfer resistances of an oxygen reducing biocathode. *Energy Environ. Sci.* 4, 5035–5043. <https://doi.org/10.1039/C1EE02131A>
- Heijne, A. ter, Liu, D., Sulonen, M., Sleutels, T., Fabregat-Santiago, F., 2018. Quantification of bio-anode capacitance in bioelectrochemical systems using Electrochemical Impedance Spectroscopy. *Journal of Power Sources* 400, 533–538. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2018.08.003>
- Hoareau, M., Erable, B., Bergel, A., 2021a. Oxygen-reducing bidirectional microbial electrodes: A mini-review. *Electrochemistry Communications* 106930. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2021.106930>

- Hoareau, M., Erable, B., Bergel, A., 2019. Microbial electrochemical snorkels (MESs): A budding technology for multiple applications. A mini review. *Electrochemistry Communications* 104, 106473. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2019.05.022>
- Hoareau, M., Erable, B., Chapleur, O., Midoux, C., Bureau, C., Goubet, A., Bergel, A., 2021b. Oxygen-reducing bidirectional microbial electrodes designed in real domestic wastewater. *Bioresource Technology* 326, 124663. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124663>
- Holmes, D.E., Nicoll, J.S., Bond, D.R., Lovley, D.R., 2004. Potential Role of a Novel Psychrotolerant Member of the Family Geobacteraceae, *Geopsychrobacter electrophilus* gen. nov., sp. nov., in Electricity Production by a Marine Sediment Fuel Cell. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 6023–6030. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.10.6023-6030.2004>
- Howarth, R., Unz, R.F., Seviour, E.M., Seviour, R.J., Blackall, L.L., Pickup, R.W., Jones, J.G., Yaguchi, J., Head, I.M., 1999. Phylogenetic relationships of filamentous sulfur bacteria (*Thiothrix* spp. and Eikelboom type 021N bacteria) isolated from wastewatertreatment plants and description of *Thiothrix eikelboomii* sp. nov., *Thiothrix unzii* sp. nov., *Thiothrix fructosivorans* sp. nov. and *Thiothrix defluvii* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 49, 1817–1827. <https://doi.org/10.1099/00207713-49-4-1817>
- Hubenova, Y., Mitov, M., 2015. Extracellular electron transfer in yeast-based biofuel cells: A review. *Bioelectrochemistry, Special Issue on “Biological fuel cells”* 106, 177–185. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2015.04.001>
- Iken, H., Etcheverry, L., Bergel, A., Basseguy, R., 2008. Local analysis of oxygen reduction catalysis by scanning vibrating electrode technique: A new approach to the study of biocorrosion. *Electrochimica Acta, Special Issue BIOCORROSION OF MATERIALS Selection of papers from the International Conference (BIOCORYS 2007) 14-17 June 2007, Paris, France* 54, 60–65. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2008.02.120>
- IRSTEA Bordeaux, 2017. Consommation énergétique du traitement intensif des eaux usées en France : état des lieux et facteurs de variation.
- Ishii, S., Watanabe, K., Yabuki, S., Logan, B.E., Sekiguchi, Y., 2008. Comparison of Electrode Reduction Activities of *Geobacter sulfurreducens* and an Enriched Consortium in an Air-Cathode Microbial Fuel Cell. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 7348–7355. <https://doi.org/10.1128/AEM.01639-08>
- Jiang, Y., Jianxiong Zeng, R., 2018. Expanding the product spectrum of value added chemicals in microbial electrosynthesis through integrated process design—A review. *Bioresource Technology* 269, 503–512. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.08.101>
- Jiang, Y., Zeng, R.J., 2019. Bidirectional extracellular electron transfers of electrode-biofilm: Mechanism and application. *Bioresource Technology* 271, 439–448. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.133>
- Joicy, A., Song, Y.-C., Li, J., Oh, S.-E., Jang, S.-H., Ahn, Y., 2020. Effect of Electrostatic Field Strength on Bioelectrochemical Nitrogen Removal from Nitrogen-Rich Wastewater. *Energies* 13, 3218. <https://doi.org/10.3390/en13123218>
- Joicy, A., Song, Y.-C., Yu, H., Chae, K.-J., 2019. Nitrite and nitrate as electron acceptors for bioelectrochemical ammonium oxidation under electrostatic field. *Journal of Environmental Management* 250, 109517. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109517>
- Kadier, A., Simayi, Y., Abdeshahian, P., Azman, N.F., Chandrasekhar, K., Kalil, M.S., 2016. A comprehensive review of microbial electrolysis cells (MEC) reactor designs and

- configurations for sustainable hydrogen gas production. *Alexandria Engineering Journal* 55, 427–443. <https://doi.org/10.1016/j.aej.2015.10.008>
- Kaewkannetra, P., Chiwes, W., Chiu, T.Y., 2011. Treatment of cassava mill wastewater and production of electricity through microbial fuel cell technology. *Fuel* 90, 2746–2750. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2011.03.031>
- Karra, U., Huang, G., Umaz, R., Tenaglier, C., Wang, L., Li, B., 2013. Stability characterization and modeling of robust distributed benthic microbial fuel cell (DBMFC) system. *Bioresource Technology* 144, 477–484. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.06.104>
- Karthikeyan, R., Singh, R., Bose, A., 2019. Microbial electron uptake in microbial electrosynthesis: a mini-review. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 46, 1419–1426. <https://doi.org/10.1007/s10295-019-02166-6>
- Ketep, S.F., Bergel, A., Bertrand, M., Achouak, W., Fourest, E., 2013. Sampling location of the inoculum is crucial in designing anodes for microbial fuel cells. *Biochemical Engineering Journal* 73, 12–16. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.01.001>
- Kim, B.-H., Kim, H.-J., Hyun, M.-S., Park, D.-H., 1999. Direct Electrode Reaction of Fe(III)-Reducing Bacterium, *Shewanella putrefaciens*. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 9, 127–131.
- Kim, H.J., Park, H.S., Hyun, M.S., Chang, I.S., Kim, M., Kim, B.H., 2002. A mediator-less microbial fuel cell using a metal reducing bacterium, *Shewanella putrefaciens*. *Enzyme and Microbial Technology* 30, 145–152. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(01\)00478-1](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(01)00478-1)
- Kim, J.R., Jung, S.H., Regan, J.M., Logan, B.E., 2007. Electricity generation and microbial community analysis of alcohol powered microbial fuel cells. *Bioresource Technology* 98, 2568–2577. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.09.036>
- Kim, K.-Y., Yang, W., Logan, B.E., 2015. Impact of electrode configurations on retention time and domestic wastewater treatment efficiency using microbial fuel cells. *Water Research* 80, 41–46. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.05.021>
- Kimura, Z., Okabe, S., 2013. *Hydrogenophaga electricum* sp. nov., isolated from anodic biofilms of an acetate-fed microbial fuel cell. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 59, 261–266. <https://doi.org/10.2323/jgam.59.261>
- Kiran, R., Patil, S.A., 2019. Microbial Electroactive Biofilms, in: Rathinam, N.K., Sani, R.K. (Eds.), ACS Symposium Series. American Chemical Society, Washington, DC, pp. 159–186. <https://doi.org/10.1021/bk-2019-1323.ch008>
- Knust, K.N., Hlushkou, D., Anand, R.K., Tallarek, U., Crooks, R.M., 2013. Electrochemically Mediated Seawater Desalination. *Angewandte Chemie* 125, 8265–8268. <https://doi.org/10.1002/ange.201302577>
- Koch, C., Harnisch, F., 2016. Is there a Specific Ecological Niche for Electroactive Microorganisms? *ChemElectroChem* 3, 1282–1295. <https://doi.org/10.1002/celec.201600079>
- Kotloski, N.J., Gralnick, J.A., 2013. Flavin Electron Shuttles Dominate Extracellular Electron Transfer by *Shewanella oneidensis*. *mBio* 4. <https://doi.org/10.1128/mBio.00553-12>
- kumar, G.G., Sarathi, V.G.S., Nahm, K.S., 2013. Recent advances and challenges in the anode architecture and their modifications for the applications of microbial fuel cells. *Biosensors and Bioelectronics* 43, 461–475. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.12.048>
- Kumar, R., Singh, L., Zularisam, A.W., 2016. Exoelectrogens: Recent advances in molecular drivers involved in extracellular electron transfer and strategies used to improve it for microbial fuel cell applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 56, 1322–1336. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.12.029>

- Lai, M.-F., Lou, C.-W., Lin, J.-H., 2018. Improve 3D electrode materials performance on electricity generation from livestock wastewater in microbial fuel cell. *International Journal of Hydrogen Energy, Alternative Energies for Sustainability* 43, 11520–11529. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.06.047>
- Lau, S.K.P., Teng, J.L.L., Chiu, T.H., Chan, E., Tsang, A.K.L., Panagiotou, G., Zhai, S.-L., Woo, P.C.Y., 2018. Differential Microbial Communities of Omnivorous and Herbivorous Cattle in Southern China. *Computational and Structural Biotechnology Journal* 16, 54–60. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2018.02.004>
- Lefebvre, O., Uzabiaga, A., Chang, I.S., Kim, B.-H., Ng, H.Y., 2011. Microbial fuel cells for energy self-sufficient domestic wastewater treatment—a review and discussion from energetic consideration. *Applied Microbiology and Biotechnology* 89, 259–270. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2881-z>
- Leininger, A., Yates, M.D., Ramirez, M., Kjellerup, B., 2021. Biofilm structure, dynamics, and ecology of an upscaled biocathode wastewater microbial fuel cell. *Biotechnology and Bioengineering* 118, 1305–1316. <https://doi.org/10.1002/bit.27653>
- Leung, D.H.L., Lim, Y.S., Uma, K., Pan, G.-T., Lin, J.-H., Chong, S., Yang, T.C.-K., 2020. Engineering *S. oneidensis* for Performance Improvement of Microbial Fuel Cell—a Mini Review. *Appl Biochem Biotechnol.* <https://doi.org/10.1007/s12010-020-03469-6>
- Li, B., Zhou, J., Zhou, X., Wang, X., Li, Baikun, Santoro, C., Grattieri, M., Babanova, S., Artyushkova, K., Atanassov, P., Schuler, A.J., 2014. Surface Modification of Microbial Fuel Cells Anodes: Approaches to Practical Design. *Electrochimica Acta* 134, 116–126. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2014.04.136>
- Li, C., He, W., Liang, D., Tian, Y., Yadav, R.S., Li, D., Liu, J., Feng, Y., 2021. The anaerobic and starving treatment eliminates filamentous bulking and recovers biocathode biocatalytic activity with residual organic loading in microbial electrochemical system. *Chemical Engineering Journal* 404, 127072. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.127072>
- Li, W., Sun, J., Hu, Y., Zhang, Y., Deng, F., Chen, J., 2014. Simultaneous pH self-neutralization and bioelectricity generation in a dual bioelectrode microbial fuel cell under periodic reversion of polarity. *Journal of Power Sources* 268, 287–293. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2014.06.047>
- Li, X., Lu, Y., Luo, H., Liu, G., Zhang, R., 2017. Microbial stratification structure within cathodic biofilm of the microbial fuel cell using the freezing microtome method. *Bioresource Technology* 241, 384–390. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.137>
- Li, X., Zhao, Q., Wang, X., Li, Y., Zhou, Q., 2018. Surfactants selectively reallocated the bacterial distribution in soil bioelectrochemical remediation of petroleum hydrocarbons. *Journal of Hazardous Materials* 344, 23–32. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.09.050>
- Liang, P., Duan, R., Jiang, Y., Zhang, X., Qiu, Y., Huang, X., 2018. One-year operation of 1000-L modularized microbial fuel cell for municipal wastewater treatment. *Water Research* 141, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.04.066>
- Lin, S., Mackey, H.R., Hao, T., Guo, G., van Loosdrecht, M.C.M., Chen, G., 2018. Biological sulfur oxidation in wastewater treatment: A review of emerging opportunities. *Water Research* 143, 399–415. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.06.051>
- Little, B., Ray, R., Wagner, P., Lewandowski, Z., Lee, W.C., Characklis, W.G., Mansfeld, F., 1991. Impact of biofouling on the electrochemical behaviour of 304 stainless steel in natural seawater. *Biofouling* 3, 45–59. <https://doi.org/10.1080/08927019109378161>
- Liu, H., Cheng, S., Logan, B.E., 2005. Power Generation in Fed-Batch Microbial Fuel Cells as a Function of Ionic Strength, Temperature, and Reactor Configuration. *Environ. Sci. Technol.* 39, 5488–5493. <https://doi.org/10.1021/es050316c>

- Liu, H., Lu, Q., Wang, Q., Liu, W., Wei, Q., Ren, H., Ming, C., Min, M., Chen, P., Ruan, R., 2017. Isolation of a bacterial strain, *Acinetobacter* sp. from centrate wastewater and study of its cooperation with algae in nutrients removal. *Bioresource Technology* 235, 59–69. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.03.111>
- Liu, H., Ramnarayanan, R., Logan, B.E., 2004. Production of Electricity during Wastewater Treatment Using a Single Chamber Microbial Fuel Cell. *Environmental Science & Technology* 38, 2281–2285. <https://doi.org/10.1021/es034923g>
- Liu, Z., Li, X., Jia, B., Zheng, Y., Fang, L., Yang, Q., Wang, D., Zeng, G., 2009. Production of electricity from surplus sludge using a single chamber floating-cathode microbial fuel cell. *Water Science and Technology* 60, 2399–2404. <https://doi.org/10.2166/wst.2009.313>
- Logan, B.E., Hamelers, B., Rozendal, R., Schröder, U., Keller, J., Freguia, S., Aelterman, P., Verstraete, W., Rabaey, K., 2006. *Microbial Fuel Cells: Methodology and Technology* 12.
- Logan, B.E., Rossi, R., Ragab, A., Saikaly, P.E., 2019. Electroactive microorganisms in bioelectrochemical systems. *Nature Reviews Microbiology* 17, 307–319. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0173-x>
- Longo, S., d'Antoni, B.M., Bongards, M., Chaparro, A., Cronrath, A., Fatone, F., Lema, J.M., Mauricio-Iglesias, M., Soares, A., Hospido, A., 2016. Monitoring and diagnosis of energy consumption in wastewater treatment plants. A state of the art and proposals for improvement. *Applied Energy* 179, 1251–1268. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2016.07.043>
- Lovley, D.R., 2017. Electrically conductive pili: Biological function and potential applications in electronics. *Current Opinion in Electrochemistry* 4, 190–198. <https://doi.org/10.1016/j.coelec.2017.08.015>
- Lovley, D.R., 2011. Live wires: direct extracellular electron exchange for bioenergy and the bioremediation of energy-related contamination. *Energy & Environmental Science* 4, 4896. <https://doi.org/10.1039/c1ee02229f>
- Lovley, D.R., 2006. Bug juice: harvesting electricity with microorganisms. *Nature Reviews Microbiology* 4, 497–508. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1442>
- Ma, P., Ma, H., Galia, A., Sabatino, S., Scialdone, O., 2018. Reduction of oxygen to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at carbon felt cathode in undivided cells. Effect of the ratio between the anode and the cathode surfaces and of other operative parameters. *Separation and Purification Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2018.04.062>
- Madigou, C., Lê Cao, K.-A., Bureau, C., Mazéas, L., Déjean, S., Chapleur, O., 2019. Ecological consequences of abrupt temperature changes in anaerobic digesters. *Chemical Engineering Journal* 361, 266–277. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.12.003>
- Magotra, V.K., Kumar, S., Kang, T.W., Inamdar, A.I., Aqueel, A.T., Im, H., Ghodake, G., Shinde, S., Waghmode, D.P., Jeon, H.C., 2020. Compost Soil Microbial Fuel Cell to Generate Power using Urea as Fuel. *Scientific Reports* 10, 4154. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61038-7>
- Mapelli, F., Scoma, A., Michoud, G., Aulenta, F., Boon, N., Borin, S., Kalogerakis, N., Daffonchio, D., 2017. Biotechnologies for Marine Oil Spill Cleanup: Indissoluble Ties with Microorganisms. *Trends in Biotechnology* 35, 860–870. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.04.003>
- Mathis, C., 2007. Extending a tuple-based XPath algebra to enhance evaluation flexibility. *Informatik Forsch. Entw.* 21, 147–164. <https://doi.org/10.1007/s00450-007-0023-3>

- Matturro, B., Cruz Viggi, C., Aulenta, F., Rossetti, S., 2017. Cable Bacteria and the Bioelectrochemical Snorkel: The Natural and Engineered Facets Playing a Role in Hydrocarbons Degradation in Marine Sediments. *Frontiers in Microbiology* 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00952>
- Mavrodi, D.V., Blankenfeldt, W., Thomashow, L.S., 2006. Phenazine Compounds in Fluorescent *Pseudomonas* Spp. Biosynthesis and Regulation. *Annual Review of Phytopathology* 44, 417–445. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.44.013106.145710>
- Milner, E.M., Popescu, D., Curtis, T., Head, I.M., Scott, K., Yu, E.H., 2016. Microbial fuel cells with highly active aerobic biocathodes. *Journal of Power Sources* 324, 8–16. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2016.05.055>
- Milner, E.M., Yu, E.H., 2018. The Effect of Oxygen Mass Transfer on Aerobic Biocathode Performance, Biofilm Growth and Distribution in Microbial Fuel Cells. *Fuel Cells* 18, 4–12. <https://doi.org/10.1002/fuce.201700172>
- Min, B., Logan, B.E., 2004. Continuous Electricity Generation from Domestic Wastewater and Organic Substrates in a Flat Plate Microbial Fuel Cell. *Environmental Science & Technology* 38, 5809–5814. <https://doi.org/10.1021/es0491026>
- Ministère de la Transition écologique, 2018a. Portail d'information sur l'assainissement communal [WWW Document]. URL <http://assainissement.developpement-durable.gouv.fr/> (accessed 8.12.20).
- Ministère de la Transition écologique, 2018b. Fiche de la station d'épuration de Castanet-Tolosan [WWW Document]. Portail d'information sur l'assainissement communal. URL <http://assainissement.developpement-durable.gouv.fr/fiche.php?code=0531113V001> (accessed 8.12.20).
- Mohanakrishna, G., Abu-Reesh, I.M., Al-Raoush, R.I., 2018. Biological anodic oxidation and cathodic reduction reactions for improved bioelectrochemical treatment of petroleum refinery wastewater. *Journal of Cleaner Production* 190, 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.04.141>
- Molinos-Senante, M., Sala-Garrido, R., Iftimi, A., 2018. Energy intensity modeling for wastewater treatment technologies. *Science of The Total Environment* 630, 1565–1572. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.02.327>
- Mugele, F., Baret, J.-C., 2005. Electrowetting: from basics to applications. *J. Phys.: Condens. Matter* 17, R705–R774. <https://doi.org/10.1088/0953-8984/17/28/R01>
- Office français pour la biodiversité, 2018. Observatoire national des services d'eau et d'assainissement [WWW Document]. URL <http://www.services.eaufrance.fr/> (accessed 8.12.20).
- Olesen, B.H., Avci, R., Lewandowski, Z., 2000. Manganese dioxide as a potential cathodic reactant in corrosion of stainless steels. *Corrosion Science* 42, 211–227. [https://doi.org/10.1016/S0010-938X\(99\)00071-2](https://doi.org/10.1016/S0010-938X(99)00071-2)
- Oliot, M., 2017. Bio-ingénierie pour les piles à combustible microbiennes. INPT, Toulouse.
- Oliot, M., Etcheverry, L., Mosdale, A., Basseguy, R., Délia, M.-L., Bergel, A., 2017. Separator electrode assembly (SEA) with 3-dimensional bioanode and removable air-cathode boosts microbial fuel cell performance. *Journal of Power Sources* 356, 389–399. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2017.03.016>
- Oliot, M., Galier, S., Roux de Balmann, H., Bergel, A., 2016. Ion transport in microbial fuel cells: Key roles, theory and critical review. *Applied Energy* 183, 1682–1704. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2016.09.043>

- Palanisamy, G., Jung, H.-Y., Sadhasivam, T., Kurkuri, M.D., Kim, S.C., Roh, S.-H., 2019. A comprehensive review on microbial fuel cell technologies: Processes, utilization, and advanced developments in electrodes and membranes. *Journal of Cleaner Production* 221, 598–621. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.02.172>
- Pandey, P., Shinde, V.N., Deopurkar, R.L., Kale, S.P., Patil, S.A., Pant, D., 2016. Recent advances in the use of different substrates in microbial fuel cells toward wastewater treatment and simultaneous energy recovery. *Applied Energy* 168, 706–723. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2016.01.056>
- Pant, D., Van Bogaert, G., Diels, L., Vanbroekhoven, K., 2010. A review of the substrates used in microbial fuel cells (MFCs) for sustainable energy production. *Bioresource Technology* 101, 1533–1543. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.10.017>
- Park, I.H., Christy, M., Kim, P., Nahm, K.S., 2014. Enhanced electrical contact of microbes using Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/CNT nanocomposite anode in mediator-less microbial fuel cell. *Biosensors and Bioelectronics* 58, 75–80. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.02.044>
- Pfeffer, C., Larsen, S., Song, J., Dong, M., Besenbacher, F., Meyer, R.L., Kjeldsen, K.U., Schreiber, L., Gorby, Y.A., El-Naggar, M.Y., Leung, K.M., Schramm, A., Risgaard-Petersen, N., Nielsen, L.P., 2012. Filamentous bacteria transport electrons over centimetre distances. *Nature* 491, 218–221. <https://doi.org/10.1038/nature11586>
- Pham, H.T., Vu, P.H., Nguyen, T.T.T., Bui, H.V.T., Tran, H.T.T., Tran, H.M., Kim, H.Q.N. and H.B., 2019. A Laboratory-Scale Study of the Applicability of a Halophilic Sediment Bioelectrochemical System for in situ Reclamation of Water and Sediment in Brackish Aquaculture Ponds: Effects of Operational Conditions on Performance 29, 1607–1623. <https://doi.org/10.4014/jmb.1906.06052>
- Pham, T.H., Boon, N., Aelterman, P., Clauwaert, P., De Schampelaire, L., Vanhaecke, L., De Maeyer, K., Höfte, M., Verstraete, W., Rabaey, K., 2008. Metabolites produced by *Pseudomonas* sp. enable a Gram-positive bacterium to achieve extracellular electron transfer. *Appl Microbiol Biotechnol* 77, 1119–1129. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1248-6>
- Pinck, S., Ostormujof, L.M., Teychené, S., Erable, B., 2020. Microfluidic Microbial Bioelectrochemical Systems: An Integrated Investigation Platform for a More Fundamental Understanding of Electroactive Bacterial Biofilms. *Microorganisms* 8, 1841. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111841>
- Pocaznoi, D., 2012. Optimisation d’anodes microbiennes à partir de lixiviat de sol pour la conception de piles à combustible microbiennes.
- Pocaznoi, D., Erable, B., Etcheverry, L., Delia, M.-L., Bergel, A., 2012. Forming microbial anodes under delayed polarisation modifies the electron transfer network and decreases the polarisation time required. *Bioresource Technology* 114, 334–341. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.03.042>
- Poirier, S., Desmond-Le Quéméner, E., Madigou, C., Bouchez, T., Chapleur, O., 2016. Anaerobic digestion of biowaste under extreme ammonia concentration: Identification of key microbial phylotypes. *Bioresource Technology* 207, 92–101. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.01.124>
- Poleunis, C., Compère, C., Bertrand, P., 2002. Time-of-flight secondary ion mass spectrometry: characterisation of stainless steel surfaces immersed in natural seawater. *Journal of Microbiological Methods, The Fourth International Symposium on the Interface between Analytical Chemistry and Microbiology* 48, 195–205. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(01\)00323-2](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(01)00323-2)
- Popat, S.C., Torres, C.I., 2016. Critical transport rates that limit the performance of microbial electrochemistry technologies. *Bioresource Technology, Waste Biorefinery* -

- Advocating Circular Economy 215, 265–273.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.04.136>
- Potter, M.C., 1911. Electrical Effects Accompanying the Decomposition of Organic Compounds. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 84, 260–276.  
<https://doi.org/10.1098/rspb.1911.0073>
- Prado, A., Berenguer, R., Esteve-Núñez, A., 2019. Electroactive biochar outperforms highly conductive carbon materials for biodegrading pollutants by enhancing microbial extracellular electron transfer. *Carbon*. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2019.02.038>
- PrévotEAU, A., Ronsse, F., Cid, I., Boeckx, P., Rabaey, K., 2016. The electron donating capacity of biochar is dramatically underestimated. *Scientific Reports* 6.  
<https://doi.org/10.1038/srep32870>
- Puig, S., Serra, M., Coma, M., Balaguer, M.D., Colprim, J., 2011. Simultaneous domestic wastewater treatment and renewable energy production using microbial fuel cells (MFCs). *Water Science and Technology* 64, 904–909.  
<https://doi.org/10.2166/wst.2011.401>
- Quéméner, E.D.-L., Flayac, J.-C., Trably, E., Bernet, N., 2018. A core-microbiome approach to identify key microbes and interactions in bioanode microbial communities 22.
- Rabaey, K., Read, S.T., Clauwaert, P., Freguia, S., Bond, P.L., Blackall, L.L., Keller, J., 2008. Cathodic oxygen reduction catalyzed by bacteria in microbial fuel cells. *The ISME Journal* 2, 519–527. <https://doi.org/10.1038/ismej.2008.1>
- Rabaey, K., Rozendal, R.A., 2010. Microbial electrosynthesis — revisiting the electrical route for microbial production. *Nature Reviews Microbiology* 8, 706–716.  
<https://doi.org/10.1038/nrmicro2422>
- Rago, L., Cristiani, P., Villa, F., Zecchin, S., Colombo, A., Cavalca, L., Schievano, A., 2017. Influences of dissolved oxygen concentration on biocathodic microbial communities in microbial fuel cells. *Bioelectrochemistry* 116, 39–51.  
<https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2017.04.001>
- Rago, L., Zecchin, S., Marzorati, S., Goglio, A., Cavalca, L., Cristiani, P., Schievano, A., 2018. A study of microbial communities on terracotta separator and on biocathode of air breathing microbial fuel cells. *Bioelectrochemistry* 120, 18–26.  
<https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2017.11.005>
- Ramírez-Vargas, Arias, C.A., Zhang, L., Brix, H., 2018a. Microbial Community Function in Electroactive Biofilm-based Constructed Wetlands. *Biogeosciences Discussions* 1–28.  
<https://doi.org/10.5194/bg-2018-428>
- Ramírez-Vargas, C.A., Arias, C.A., Carvalho, P., Zhang, L., Esteve-Núñez, A., Brix, H., 2019. Electroactive biofilm-based constructed wetland (EABB-CW): A mesocosm-scale test of an innovative setup for wastewater treatment. *Science of The Total Environment* 659, 796–806. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.12.432>
- Ramírez-Vargas, Prado, A., Arias, C., Carvalho, P., Esteve-Núñez, A., Brix, H., 2018b. Microbial Electrochemical Technologies for Wastewater Treatment: Principles and Evolution from Microbial Fuel Cells to Bioelectrochemical-Based Constructed Wetlands. *Water* 10, 1128. <https://doi.org/10.3390/w10091128>
- Reguera, G., Nevin, K.P., Nicoll, J.S., Covalla, S.F., Woodard, T.L., Lovley, D.R., 2006. Biofilm and Nanowire Production Leads to Increased Current in *Geobacter sulfurreducens* Fuel Cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 7345–7348.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.01444-06>
- Ren, G., Yan, Y., Nie, Y., Lu, A., Wu, X., Li, Y., Wang, C., Ding, H., 2019. Natural Extracellular Electron Transfer Between Semiconducting Minerals and Electroactive Bacterial

- Communities Occurred on the Rock Varnish. *Front. Microbiol.* 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00293>
- Ren, L., Ahn, Y., Logan, B.E., 2014. A Two-Stage Microbial Fuel Cell and Anaerobic Fluidized Bed Membrane Bioreactor (MFC-AFMBR) System for Effective Domestic Wastewater Treatment. *Environmental Science & Technology* 48, 4199–4206. <https://doi.org/10.1021/es500737m>
- Richter, H., McCarthy, K., Nevin, K.P., Johnson, J.P., Rotello, V.M., Lovley, D.R., 2008. Electricity Generation by *Geobacter sulfurreducens* Attached to Gold Electrodes. *Langmuir* 24, 4376–4379. <https://doi.org/10.1021/la703469y>
- Rimboud, M., Barakat, M., Bergel, A., Erable, B., 2017. Different methods used to form oxygen reducing biocathodes lead to different biomass quantities, bacterial communities, and electrochemical kinetics. *Bioelectrochemistry* 116, 24–32. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2017.03.001>
- Rimboud, M., Bergel, A., Erable, B., 2016. Multiple electron transfer systems in oxygen reducing biocathodes revealed by different conditions of aeration/agitation. *Bioelectrochemistry* 110, 46–51. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2016.03.002>
- Rimboud, M., Pocaznoi, D., Erable, B., Bergel, A., 2014. Electroanalysis of microbial anodes for bioelectrochemical systems: basics, progress and perspectives. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 16, 16349–16366. <https://doi.org/10.1039/C4CP01698J>
- Ringeisen, B.R., Henderson, E., Wu, P.K., Pietron, J., Ray, R., Little, B., Biffinger, J.C., Jones-Meehan, J.M., 2006. High Power Density from a Miniature Microbial Fuel Cell Using *Shewanella oneidensis* DSP10. *Environ. Sci. Technol.* 40, 2629–2634. <https://doi.org/10.1021/es052254w>
- Rodrigo, M.A., Cañizares, P., Lobato, J., Paz, R., Sáez, C., Linares, J.J., 2007. Production of electricity from the treatment of urban waste water using a microbial fuel cell. *Journal of Power Sources* 169, 198–204. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2007.01.054>
- Rohart, F., Gautier, B., Singh, A., Lê Cao, K.-A., 2017. mixOmics: An R package for ‘omics feature selection and multiple data integration. *PLOS Computational Biology* 13, e1005752. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005752>
- Roubaud, E., 2019. Technologie électro-microbienne pour le traitement des eaux usées couplé à la récupération d’hydrogène.pdf.
- Roubaud, E., Lacroix, R., Da Silva, S., Esvan, J., Etcheverry, L., Bergel, A., Basséguy, R., Erable, B., 2021. Industrially scalable surface treatments to enhance the current density output from graphite bioanodes fuelled by real domestic wastewater. *iScience* 102162. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102162>
- Roubaud, E., Lacroix, R., Da Silva, S., Etcheverry, L., Bergel, A., Basséguy, R., Erable, B., 2019. Benchmarking of Industrial Synthetic Graphite Grades, Carbon Felt, and Carbon Cloth as Cost-Efficient Bioanode Materials for Domestic Wastewater Fed Microbial Electrolysis Cells. *Frontiers in Energy Research* 7. <https://doi.org/10.3389/fenrg.2019.00106>
- Rousseau, R., Ketep, S.F., Etcheverry, L., Délia, M.-L., Bergel, A., 2020. Microbial electrolysis cell (MEC): A step ahead towards hydrogen-evolving cathode operated at high current density. *Bioresource Technology Reports* 9, 100399. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2020.100399>
- Rowe, A.R., Rajeev, P., Jain, A., Pirbadian, S., Okamoto, A., Gralnick, J.A., El-Naggar, M.Y., Nealson, K.H., 2018. Tracking Electron Uptake from a Cathode into *Shewanella* Cells: Implications for Energy Acquisition from Solid-Substrate Electron Donors. *mBio* 9. <https://doi.org/10.1128/mBio.02203-17>

- Rusli, S.F.N., Abu Bakar, M.H., Loh, K.S., Mastar, M.S., 2018. Review of high-performance biocathode using stainless steel and carbon-based materials in Microbial Fuel Cell for electricity and water treatment. *International Journal of Hydrogen Energy*. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.11.145>
- Salgot, M., Folch, M., 2018. Wastewater treatment and water reuse. *Current Opinion in Environmental Science & Health* 2, 64–74. <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2018.03.005>
- Santoro, C., Arbizzani, C., Erable, B., Ieropoulos, I., 2017a. Microbial fuel cells: From fundamentals to applications. A review. *Journal of Power Sources* 356, 225–244. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2017.03.109>
- Santoro, C., Kodali, M., Kabir, S., Soavi, F., Serov, A., Atanassov, P., 2017b. Three-dimensional graphene nanosheets as cathode catalysts in standard and supercapacitive microbial fuel cell. *Journal of Power Sources* 356, 371–380. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2017.03.135>
- Sathishkumar, K., AlSalhi, M.S., Sanganyado, E., Devanesan, S., Arulprakash, A., Rajasekar, A., 2019. Sequential electrochemical oxidation and bio-treatment of the azo dye congo red and textile effluent. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 200, 111655. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.111655>
- Saunders, A.M., Albertsen, M., Vollertsen, J., Nielsen, P.H., 2016. The activated sludge ecosystem contains a core community of abundant organisms. *The ISME Journal* 10, 11–20. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.117>
- Schröder, U., Harnisch, F., Angenent, L.T., 2015. Microbial electrochemistry and technology: terminology and classification. *Energy & Environmental Science* 8, 513–519. <https://doi.org/10.1039/C4EE03359K>
- Sciarria, T.P., Tenca, A., D'Epifanio, A., Mecheri, B., Merlino, G., Barbato, M., Borin, S., Licoccia, S., Garavaglia, V., Adani, F., 2013. Using olive mill wastewater to improve performance in producing electricity from domestic wastewater by using single-chamber microbial fuel cell. *Bioresource Technology* 147, 246–253. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.08.033>
- Scotto, V., Cintio, R.D., Marcenaro, G., 1985. The influence of marine aerobic microbial film on stainless steel corrosion behaviour. *Corrosion Science* 25, 185–194. [https://doi.org/10.1016/0010-938X\(85\)90094-0](https://doi.org/10.1016/0010-938X(85)90094-0)
- Sekar, N., Wu, C.-H., Adams, M.W.W., Ramasamy, R.P., 2017. Electricity generation by *Pyrococcus furiosus* in microbial fuel cells operated at 90°C. *Biotechnology and Bioengineering* 114, 1419–1427. <https://doi.org/10.1002/bit.26271>
- Sonawane, J.M., Yadav, A., Ghosh, P.C., Adeloju, S.B., 2017. Recent advances in the development and utilization of modern anode materials for high performance microbial fuel cells. *Biosensors and Bioelectronics* 90, 558–576. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.10.014>
- Song, Y.-C., Yoo, K.S., Lee, S.K., 2010. Surface floating, air cathode, microbial fuel cell with horizontal flow for continuous power production from wastewater. *Journal of Power Sources* 195, 6478–6482. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2010.04.041>
- Späth, R., Flemming, H.-C., Wuertz, S., 1998. Sorption properties of biofilms. *Water Science and Technology, Microorganisms in Activated Sludge and Biofilm Processes II* 37, 207–210. [https://doi.org/10.1016/S0273-1223\(98\)00107-3](https://doi.org/10.1016/S0273-1223(98)00107-3)
- Stokes, J.L., 1954. STUDIES ON THE FILAMENTOUS SHEATHED IRON BACTERIUM *SPHAEROTILUS NATANS*. *J Bacteriol* 67, 278–291.

- Strik, D.P.B.T.B., Hamelers, H.V.M., Buisman, C.J.N., 2010. Solar Energy Powered Microbial Fuel Cell with a Reversible Bioelectrode. *Environmental Science & Technology* 44, 532–537. <https://doi.org/10.1021/es902435v>
- Strycharz-Glaven, S.M., Snider, R.M., Guiseppi-Elie, A., Tender, L.M., 2011. On the electrical conductivity of microbial nanowires and biofilms. *Energy Environ. Sci.* 4, 4366–4379. <https://doi.org/10.1039/C1EE01753E>
- Su, C., Zhang, M., Lin, L., Yu, G., Zhong, H., Chong, Y., 2020. Reduction of iron oxides and microbial community composition in iron-rich soils with different organic carbon as electron donors. *International Biodeterioration & Biodegradation* 148, 104881. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2019.104881>
- SUEZ, 2017. Memento degremont® [WWW Document]. URL <https://www.suezwaterhandbook.fr/> (accessed 8.12.20).
- Sun, J., Hu, Y., Li, W., Zhang, Y., Chen, J., Deng, F., 2015. Sequential decolorization of azo dye and mineralization of decolorization liquid coupled with bioelectricity generation using a pH self-neutralized photobioelectrochemical system operated with polarity reversion. *Journal of Hazardous Materials* 289, 108–117. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.02.010>
- Sun, Y., Wei, J., Liang, P., Huang, X., 2012. Microbial community analysis in biocathode microbial fuel cells packed with different materials. *AMB Expr* 2, 21. <https://doi.org/10.1186/2191-0855-2-21>
- Sydow, A., Krieg, T., Mayer, F., Schrader, J., Holtmann, D., 2014. Electroactive bacteria—molecular mechanisms and genetic tools. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98, 8481–8495. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6005-z>
- Tang, R., Wu, D., Chen, W., Feng, C., Wei, C., 2017. Biocathode denitrification of coke wastewater effluent from an industrial aeration tank: Effect of long-term adaptation. *Biochemical Engineering Journal* 125, 151–160. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2017.05.022>
- Tatinclaux, M., Gregoire, K., Leininger, A., Biffinger, J.C., Tender, L., Ramirez, M., Torrents, A., Kjellerup, B.V., 2018. Electricity generation from wastewater using a floating air cathode microbial fuel cell. *Water-Energy Nexus* 1, 97–103. <https://doi.org/10.1016/j.wen.2018.09.001>
- Tender, L.M., Reimers, C.E., Stecher, H.A., Holmes, D.E., Bond, D.R., Lowy, D.A., Pilobello, K., Fertig, S.J., Lovley, D.R., 2002. Harnessing microbially generated power on the seafloor. *Nature Biotechnology* 20, 821–825. <https://doi.org/10.1038/nbt716>
- Teng, W., Liu, G., Luo, H., Zhang, R., Xiang, Y., 2016. Simultaneous sulfate and zinc removal from acid wastewater using an acidophilic and autotrophic biocathode. *Journal of Hazardous Materials* 304, 159–165. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.10.050>
- ter Heijne, A., Pereira, M.A., Pereira, J., Sleutels, T., 2021. Electron Storage in Electroactive Biofilms. *Trends in Biotechnology* 39, 34–42. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2020.06.006>
- ter Heijne, A., Schaetzle, O., Gimenez, S., Navarro, L., Hamelers, B., Fabregat-Santiago, F., 2015. Analysis of bio-anode performance through electrochemical impedance spectroscopy. *Bioelectrochemistry, Special Issue on “Biological fuel cells”* 106, 64–72. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2015.04.002>
- Torresi, E., Polesel, F., Bester, K., Christensson, M., Smets, B.F., Trapp, S., Andersen, H.R., Plósz, B.Gy., 2017. Diffusion and sorption of organic micropollutants in biofilms with varying thicknesses. *Water Research* 123, 388–400. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.06.027>

- Uria, N., Ferrera, I., Mas, J., 2017. Electrochemical performance and microbial community profiles in microbial fuel cells in relation to electron transfer mechanisms. *BMC Microbiology* 17, 208. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-1115-2>
- Wagner, M., Loy, A., 2002. Bacterial community composition and function in sewage treatment systems. *Current Opinion in Biotechnology* 13, 218–227. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(02\)00315-4](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(02)00315-4)
- Waite, D.W., Chuvochina, M., Pelikan, C., Parks, D.H., Yilmaz, P., Wagner, M., Loy, A., Naganuma, T., Nakai, R., Whitman, W.B., Hahn, M.W., Kuever, J., Hugenholtz, P., 2020. Proposal to reclassify the proteobacterial classes Deltaproteobacteria and Oligoflexia, and the phylum Thermodesulfobacteria into four phyla reflecting major functional capabilities. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 70, 5972–6016. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004213>
- Wang, A., Cheng, H., Ren, N., Cui, D., Lin, N., Wu, W., 2012. Sediment microbial fuel cell with floating biocathode for organic removal and energy recovery. *Front. Environ. Sci. Eng.* 6, 569–574. <https://doi.org/10.1007/s11783-011-0335-1>
- Wang, H., Ren, Z.J., 2013. A comprehensive review of microbial electrochemical systems as a platform technology. *Biotechnology Advances* 31, 1796–1807. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.10.001>
- Wang, J., 2005. Electrochemical Detection for Capillary Electrophoresis Microchips: A Review. *Electroanalysis* 17, 1133–1140. <https://doi.org/10.1002/elan.200403229>
- Wang, X., Hu, M., Xia, Y., Wen, X., Ding, K., 2012. Pyrosequencing Analysis of Bacterial Diversity in 14 Wastewater Treatment Systems in China. *Applied and Environmental Microbiology* 78, 7042–7047. <https://doi.org/10.1128/AEM.01617-12>
- Wang, Z., Mahadevan, G.D., Wu, Y., Zhao, F., 2017. Progress of air-breathing cathode in microbial fuel cells. *Journal of Power Sources* 356, 245–255. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2017.02.004>
- Wang, Z., Zheng, Y., Xiao, Y., Wu, S., Wu, Y., Yang, Z., Zhao, F., 2013. Analysis of oxygen reduction and microbial community of air-diffusion biocathode in microbial fuel cells. *Bioresource Technology* 144, 74–79. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.06.093>
- Warakulwit, C., Nguyen, T., Majimel, J., Delville, M.-H., Lapeyre, V., Garrigue, P., Ravaine, V., Limtrakul, J., Kuhn, A., 2008. Dissymmetric Carbon Nanotubes by Bipolar Electrochemistry. *Nano Lett.* 8, 500–504. <https://doi.org/10.1021/nl072652s>
- Wei, J., Liang, P., Huang, X., 2011. Recent progress in electrodes for microbial fuel cells. *Bioresource Technology* 102, 9335–9344. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.07.019>
- W. Marshall, C., D. May, H., 2009. Electrochemical evidence of direct electrode reduction by a thermophilic Gram-positive bacterium, *Thermincola ferriacetica*. *Energy & Environmental Science* 2, 699–705. <https://doi.org/10.1039/B823237G>
- Xia, X., Sun, Y., Liang, P., Huang, X., 2012. Long-term effect of set potential on biocathodes in microbial fuel cells: Electrochemical and phylogenetic characterization. *Bioresource Technology* 120, 26–33. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.06.017>
- Xia, Y., Wen, X., Zhang, B., Yang, Y., 2018. Diversity and assembly patterns of activated sludge microbial communities: A review. *Biotechnology Advances* 36, 1038–1047. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.03.005>
- Xiao, Y., Zheng, Y., Wu, S., Zhang, E.-H., Chen, Z., Liang, P., Huang, X., Yang, Z.-H., Ng, I.-S., Chen, B.-Y., Zhao, F., 2015. Pyrosequencing Reveals a Core Community of Anodic Bacterial Biofilms in Bioelectrochemical Systems from China. *Front. Microbiol.* 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01410>

- Xie, X., Criddle, C., Cui, Y., 2015. Design and fabrication of bioelectrodes for microbial bioelectrochemical systems. *Energy & Environmental Science* 8, 3418–3441. <https://doi.org/10.1039/C5EE01862E>
- Xing, D., Zuo, Y., Cheng, S., Regan, J.M., Logan, B.E., 2008. Electricity Generation by *Rhodospseudomonas palustris* DX-1. *Environmental Science & Technology* 42, 4146–4151. <https://doi.org/10.1021/es800312v>
- Xu, P., Xiao, E., Wu, J., He, F., Zhang, Y., Wu, Z., 2019. Enhanced nitrate reduction in water by a combined bio-electrochemical system of microbial fuel cells and submerged aquatic plant *Ceratophyllum demersum*. *Journal of Environmental Sciences* 78, 338–351. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2018.11.013>
- Xu, S., Zhang, Y., Duan, Y., Wang, C., Liu, H., 2021. Simultaneous removal of nitrate/nitrite and ammonia in a circular microbial electrolysis cell at low C/N ratios. *Journal of Water Process Engineering* 40, 101938. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2021.101938>
- Yalcin, S.E., Malvankar, N.S., 2020. The blind men and the filament: Understanding structures and functions of microbial nanowires. *Current Opinion in Chemical Biology, Mechanistic Biology • Energy* 59, 193–201. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2020.08.004>
- Yang, Q., Zhao, H., Liang, H., 2015. Denitrification of overlying water by microbial electrochemical snorkel. *Bioresource Technology* 197, 512–514. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.127>
- Yang, Y., Guo, J., Sun, G., Xu, M., 2013. Characterizing the snorkeling respiration and growth of *Shewanella decolorationis* S12. *Bioresource Technology* 128, 472–478. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.103>
- Yang, Z., Pei, H., Hou, Q., Jiang, L., Zhang, L., Nie, C., 2018. Algal biofilm-assisted microbial fuel cell to enhance domestic wastewater treatment: Nutrient, organics removal and bioenergy production. *Chemical Engineering Journal* 332, 277–285. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.09.096>
- Yi, H., Nevin, K.P., Kim, B.-C., Franks, A.E., Klimes, A., Tender, L.M., Lovley, D.R., 2009. Selection of a variant of *Geobacter sulfurreducens* with enhanced capacity for current production in microbial fuel cells. *Biosensors and Bioelectronics* 24, 3498–3503. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2009.05.004>
- You, S.-J., Ren, N.-Q., Zhao, Q.-L., Wang, J.-Y., Yang, F.-L., 2009. Power Generation and Electrochemical Analysis of Biocathode Microbial Fuel Cell Using Graphite Fibre Brush as Cathode Material. *Fuel Cells* 9, 588–596. <https://doi.org/10.1002/face.200900023>
- You, S.J., Zhao, Q.L., Jiang, J.Q., Zhang, J.N., 2006. Treatment of Domestic Wastewater with Simultaneous Electricity Generation in Microbial Fuel Cell under Continuous Operation. *Chem Biochem Eng Q* 407–12.
- Yu, J., Seon, J., Park, Y., Cho, S., Lee, T., 2012. Electricity generation and microbial community in a submerged-exchangeable microbial fuel cell system for low-strength domestic wastewater treatment. *Bioresource Technology* 117, 172–179. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.04.078>
- Yu, Y., Wu, Y., Cao, B., Gao, Y.-G., Yan, X., 2015. Adjustable bidirectional extracellular electron transfer between *Comamonas testosteroni* biofilms and electrode via distinct electron mediators. *Electrochemistry Communications* 59, 43–47. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2015.07.007>
- Yun, H., Liang, B., Kong, D., Wang, A., 2018. Improving biocathode community multifunctionality by polarity inversion for simultaneous bioelectroreduction processes in domestic wastewater. *Chemosphere* 194, 553–561. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.12.030>

- Zhang, F., Chen, G., Hickner, M.A., Logan, B.E., 2012. Novel anti-flooding poly(dimethylsiloxane) (PDMS) catalyst binder for microbial fuel cell cathodes. *Journal of Power Sources* 218, 100–105. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2012.06.088>
- Zhang, G., Zhao, Q., Jiao, Y., Wang, K., Lee, D.-J., Ren, N., 2012. Efficient electricity generation from sewage sludge using biocathode microbial fuel cell. *Water Research* 46, 43–52. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.10.036>
- Zhang, G., Zhao, Q., Jiao, Y., Zhang, J., Jiang, J., Ren, N., Kim, B.H., 2011. Improved performance of microbial fuel cell using combination biocathode of graphite fiber brush and graphite granules. *Journal of Power Sources* 196, 6036–6041. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2011.03.096>
- Zhang, Haichuan, Li, Y., Zhang, Hao, Li, G., Zhang, F., 2019. A Three-dimensional Floating Air Cathode with Dual Oxygen Supplies for Energy-efficient Production of Hydrogen Peroxide. *Scientific Reports* 9, 1817. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37919-3>
- Zhang, T., Shao, M.-F., Ye, L., 2012. 454 Pyrosequencing reveals bacterial diversity of activated sludge from 14 sewage treatment plants. *The ISME Journal* 6, 1137–1147. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.188>
- Zheng, M., Xu, C., Zhong, D., Han, Y., Zhang, Z., Zhu, H., Han, H., 2019. Synergistic degradation on aromatic cyclic organics of coal pyrolysis wastewater by lignite activated coke-active sludge process. *Chemical Engineering Journal* 364, 410–419. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.01.121>
- Zhou, W., Meng, X., Rajic, L., Xue, Y., Chen, S., Ding, Y., Kou, K., Wang, Y., Gao, J., Qin, Y., Alshawabkeh, A.N., 2018. “Floating” cathode for efficient H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> electrogeneration applied to degradation of ibuprofen as a model pollutant. *Electrochemistry Communications* 96, 37–41. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2018.09.007>
- Zuo, K., Chen, M., Liu, F., Xiao, K., Zuo, J., Cao, X., Zhang, X., Liang, P., Huang, X., 2018. Coupling microfiltration membrane with biocathode microbial desalination cell enhances advanced purification and long-term stability for treatment of domestic wastewater. *Journal of Membrane Science* 547, 34–42. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2017.10.034>
- Zuo, Y., Xing, D., Regan, J.M., Logan, B.E., 2008. Isolation of the Exoelectrogenic Bacterium *Ochrobactrum anthropi* YZ-1 by Using a U-Tube Microbial Fuel Cell. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 3130–3137. <https://doi.org/10.1128/AEM.02732-07>