



Étude des biofilms électroactifs issus des milieux humides de la Guyane Française : application aux piles à combustible microbiennes

Paule Salvin

► To cite this version:

Paule Salvin. Étude des biofilms électroactifs issus des milieux humides de la Guyane Française : application aux piles à combustible microbiennes. Chimie. Université des Antilles et de la Guyane (UAG), 2012. Français. [NNT : .](#) [tel-04824528](#)

HAL Id: tel-04824528

<https://theses.hal.science/tel-04824528v1>

Submitted on 7 Dec 2024

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

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



Distributed under a Creative Commons CC BY 4.0 - Attribution - International License



Université des Antilles et de la Guyane

Institut de l'Enseignement Supérieur de la Guyane

**École doctorale pluridisciplinaire :
Santé, Environnement et Sociétés dans les Amériques**

Thèse

présentée par : Paule SALVIN

pour obtenir le titre de : Docteur en Chimie

***Etude des biofilms électroactifs issus des milieux
humides de la Guyane Française***

Application aux piles à combustible microbiennes

Soutenue le 26 Novembre 2012 à Cayenne

N : [2012AGUY0560]

Jury :

Alain BERGEL, Directeur de recherche, LGC, CNRS, Université de Toulouse

Rapporteur

Michel VILASI, Professeur, CP2S, IJL, Université Henri Poincaré, Nancy

Rapporteur

Daniel GUIRAL, Directeur de recherche HDR, IMEP, IRD, Aix-Marseille Université

Examineur

Pierre ZAMMIT, Directeur Délégué CNES, chargé de la Mission Guyane

Invité

Florent ROBERT, Maître de conférences HDR, Université des Antilles et de la Guyane
thèse

Co-directeur de

Christophe ROOS, Maître de conférences HDR, Université des Antilles et de la Guyane
thèse

Directeur de

A Louane

Cette thèse a bénéficié du soutien du programme Bio-Energies de l'Agence Nationale de Recherche à travers le projet Agri-Elec n° ANR-08-BioE-001.

Elle a également été effectuée avec le soutien du CNES (centre national d'études spatiales) et de l'Europe grâce à un financement de type FSE et au projet PO-FEDER AMABIO (Fonds européen de développement régional, PRESAGE 30927).

Remerciements

Sans la participation de nombre d'entre vous, l'aboutissement de ce travail de thèse n'aurait pu être possible. Je tiens à travers ces quelques lignes à vous exprimer ma sincère gratitude.

Je tiens à remercier mes directeurs de thèse, Christophe Roos et Florent Robert, qui m'ont accordé leur confiance dès notre premier entretien et tout au long de ces années de recherche. Vous m'avez permis de travailler sur un sujet passionnant qui possède en plus une dimension humaine puisqu'il tend à contribuer à l'amélioration de notre société. Vous m'avez également permis de découvrir dans de bonnes conditions le métier de chercheur au travers de vos ambitions et de vos investissements pour développer le laboratoire des Matériaux et des Molécules. Je vous remercie également pour votre disponibilité et votre soutien lors de la réalisation de mes travaux : article, congrès et mémoire de thèse.

Je voudrais également remercier les membres du jury pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Je souhaite remercier l'Université des Antilles et de la Guyane, l'Ecole doctorale de l'Université des Antilles et de la Guyane ainsi que l'Institut d'Enseignement Supérieur de la Guyane qui m'ont donné les moyens matériels, administratif et financier pour accomplir ce doctorat. Je remercie également le Centre national d'études spatiales, le Fonds Social Européen et l'Agence Nationale de la Recherche pour leur soutien financier essentiel au bon fonctionnement de ces années.

Il est important que je remercie tous les partenaires rencontrés principalement mais pas seulement lors des réunions semestrielles du projet ANR AgriElec, coordonné par Alain Bergel. Il s'agit des collègues du Laboratoire de Génie Chimique à Toulouse ; du Centre Technique du Papier à Grenoble ; de la société PaxiTech à Grenoble ; du Laboratoire LEMIRE/CEA de Cadarache ; du CEA de Saclay ; du Laboratoire de Chimie Agro-industrielle de Toulouse. Toutes nos conversations et nos échanges de travail m'ont permis de progresser considérablement dans la compréhension sur les biofilms EA. De plus, la diversité de nos domaines de discipline ont été une grande richesse pour ce travail de thèse. Je félicite aussi la convivialité toujours présente lors de nos rencontres.

Je remercie l'aide et la disponibilité de toutes les équipes des laboratoires de Guyane qui ont contribué par des manipulations, des mises à disposition de matériel, des formations ou juste des entretiens à la réussite de ces travaux. Je cite les collègues des équipes 1, 2 et 3 de l'UMR Ecologie des forêts de Guyane ainsi que le laboratoire des Moyens Analytiques de l'IRD à Cayenne. La Mairie de Matoury a également contribué à la réussite de ce travail en permettant l'accès au site du port du Larivot et en restant disponible à nos demandes.

Je voudrais chaleureusement remercier tous mes collègues du Laboratoire des Matériaux et des Molécules que j'ai côtoyé tout au long de ces trois années. J'adresse une pensée spéciale aux doctorantes et doctorants qui forment une équipe solidaire au sein du laboratoire et qui constitue une grande source d'encouragement et de motivation : Milcard et Joseline, mes camarades de ces trois ans qui m'ont tant soutenu, encouragé et fait rire aussi, Raphaëlle et Jean-Michel les anciens, Fabienne et Lakhdar les p'tits nouveaux et tous les autres. Je remercie Alice Ambouille qui est une personne très importante de ce laboratoire qui est toujours prête à nous encourager et à nous aiguiller, notamment dans nos démarches et entreprises autour de la thèse. Je remercie tous les enseignants-chercheurs et chercheurs pour leur travail accompli toute l'année et pour leur intérêt à nos sujets de thèse, en particulier Alan Reguer, Mathieu de Ryvoire Mounim Lebrini, Nadine Amusan pour leurs contributions scientifiques et techniques. Bien entendu, je souhaite également remercier chaleureusement tous les étudiants qui ont effectué leurs stages sur thématique des biofilms EA et que j'ai eu le plaisir de former : Katiuscia, Marie-Lise, Tristan, Yannis et Jeanne.

Et puis, au-delà du monde professionnel et du laboratoire, il y a un autre univers sans qui jamais je n'aurais pu y arriver : celui de la famille et des amis. Je remercie tout spécialement Pascal, qui n'a jamais remis en question mes choix et qui a été d'un grand soutien. Je remercie mes parents qui ont toujours accompagné, aidé et compris mes inquiétudes et mes défis. Je remercie mes frères qui n'ont jamais cessé de croire en la réussite de mes projets et tous les autres membres de ma famille et de ma belle-famille sur qui je peux compter. Je remercie mes amis qui ont su m'apporter encouragements et divertissements pour que jamais la coupe ne soit trop pleine.

Résumé

Les biofilms électroactifs (EA) sont des consortia bactériens mono ou pluri-espèces, qui ont la faculté d'échanger des électrons provenant de leur métabolisme avec les surfaces solides conductrices des électrodes. Cette découverte est à l'origine d'un nouveau dispositif énergétique : la pile à combustible microbienne (PACM). Depuis les années 2000, la littérature scientifique sur les biofilms EA et sur les PACM explose, notamment grâce à la découverte de bactéries capables de transférer par voie directe – par des pili ou protéines transmembranaires – des électrons vers les électrodes. Plusieurs sources de bactéries EA ont été à ce jour découvertes, allant de cultures pures à des communautés bactériennes plus complexes. Ces dernières sont issues de milieux aqueux naturels (milieux marins ou d'eau douce), industriels ou urbains (effluents d'industrie, eaux usées domestiques). La plupart de ces sources bactériennes proviennent d'environnements de climat tempéré.

Dans ce travail de thèse, plusieurs sols de milieux humides de la Guyane ont été identifiés comme étant de sources de bactéries EA. Les expériences menées sous potentiel d'électrode imposé et constant ont permis d'étudier l'adhésion à la surface d'électrode des biofilms EA issus de la flore endogène des milieux sélectionnés. La formation de bioanodes et de biocathodes a été possible en présence respectivement d'acétate et d'oxygène dans les milieux. Une étude par voltammétrie cyclique a mis en évidence les pics d'oxydo-réduction en lien avec les échanges électroniques du biofilm EA et de l'électrode. En optimisant la procédure de formation des biofilms EA par chronoampérométrie (surface d'électrode plus importante, apport en continu et progressif du substrat), une densité de courant maximale de 12 A/m^2 et un rendement faradique de 24 % ont été obtenus.

Une autre méthode pour former des biofilms EA à partir d'un milieu choisi, la mangrove, a consisté à utiliser deux prototypes de PACM : une pile à compartiment unique et à cathode à air, et une pile benthique. Dans les deux cas, les biofilms EA ont pu être formés et étudiés, complétant certaines observations faites sous potentiel imposé. La PACM benthique s'est avérée être la plus proche d'une application à grande échelle puisqu'elle a été complètement autonome : anode et cathode utilisant uniquement le milieu pour fonctionner. Elle a pu être étudiée en laboratoire comme sur le terrain.

Abstract

Electroactive biofilms (EA) are mono or multi-species bacterial consortia, which have the ability to exchange electrons from their metabolism with solid surfaces of conductive electrodes. This discovery is the basis for a device of energy production: microbial fuel cell (MFC). Since the 2000s, the scientific literature on EA biofilms and MFC explodes, thanks to the discovery of bacteria that are able to transfer directly – by pili or trans-membrane proteins – electrons to electrodes. Several sources of EA bacteria were discovered to date, ranging from pure cultures to more complex bacterial communities. Those last are from natural (marine and freshwater), industrial or urban (industrial effluents, domestic wastewater) aqueous environments. However, the vast majority of these are from temperate environments.

In this thesis, several wetland soils of French Guiana have been identified as sources of EA bacteria. Experiments under poised and constant electrode potential were used to examine adherence to the electrode surface of EA biofilms from the endogenous flora of selected environments. Formation of bioanodes and biocathodes was possible in the presence respectively of acetate and oxygen in the media. A study by cyclic voltammetry showed the redox peaks related to electronic exchanges between EA biofilm and electrode. By optimizing the process of EA biofilm formation by chronoamperometry (larger electrode surface, providing continuous and progressive substrate), a maximum current density of 12 A/m² and a coulombic efficiency of 24% were obtained.

Another method to form EA biofilms from a chosen medium (mangrove) was to use two MFC prototypes: a single compartment and air cathode one, and a benthic one. In both cases, the EA biofilms have been trained and studied supplementing certain observations made under poised polarization. MFC benthic proved to be the closest to a wide application since it was completely autonomous, anode and cathode only using the medium to function. It has been studied in the laboratory and in the field.

Table des matières

Remerciements	i
Résumé	iii
Abstract	iv
Table des matières	v
Introduction Générale.....	1
Chapitre I. Synthèse bibliographique	7
I.1. Biofilm électroactif	9
I.1.1. Biofilm	9
I.1.2. Bactéries électroactives et biofilm électroactif	13
I.2. La Pile à Combustible Microbienne (PACM).....	20
I.2.1. Importantes avancées dans le temps	20
I.2.1. Principe de la PACM	22
I.2.1. Caractérisation électrochimique de la PACM.....	24
I.2.2. Constituants et design des PACMs actuelles	28
I.2.3. Une PACM en particulier : la PACM benthique ou à sédiments.....	35
I.3. Développement de biofilms EA performants.....	39
I.3.1. Méthodologies d'enrichissement du biofilm en bactéries EA	39
I.4. Milieu sédimentaire en Guyane : la mangrove.....	42
I.4.1. Origines amazoniennes de la mangrove guyanaise.....	42
I.4.2. Caractéristiques physico-chimiques du sol de mangrove	43
Chapitre II. Matériels et méthodes.....	45
II.1. Sources de bactéries EA et milieux d'étude.....	47
II.2. Formation des biofilms EA sous polarisation électrochimique	48
II.2.1. Dispositif expérimental	48

II.2.2. Formation du biofilm EA en conditions électrochimiques contrôlées	51
II.2.3. Caractérisation électrochimique des biofilms EA	52
II.3. Formation de biofilms EA en PACM.....	53
II.3.1. PACM à compartiment unique	53
II.3.2. PACM benthique	54
II.3.3. Caractérisation électrochimique des PACM.....	55
II.4. Techniques microscopiques	56
II.4.1. Microscopie à épifluorescence.....	56
II.4.2. Microscopie électronique à balayage.....	57
II.5. Techniques d'identification des espèces bactériennes	60
Chapitre III. Formation des biofilms électroactifs et recherche des inocula	63
III.1. Introduction	65
III.2. Définition du protocole de recherche des biofilms EA.....	66
III.2.1. Influences du potentiel, du substrat et des bactéries.....	66
III.2.2. Contribution comparée des bactéries du biofilm adhérent à l'électrode et des bactéries planctoniques (milieux enrichis en acétate)	72
III.2.3. Application aux environnements et optimisation du protocole.....	75
III.2.4. Caractérisation de l'interface biofilm-électrode par voltammétrie cyclique	96
III.3. Identification des espèces bactériennes des biofilms EA	101
III.4. Conclusion.....	105
Chapitre IV. Etude des biofilms EA en piles à combustible microbiennes à compartiment unique et cathode à air	107
IV.1. Introduction	109
IV.2. Descriptif des PACM utilisés au cours des essais	109
IV.3. Comportement des électrodes et influence du substrat pendant le fonctionnement	110
IV.4. Influence du type de la membrane : anionique ou cationique	111
IV.5. Evolution du biofilm sur l'électrode au cours du temps	114

IV.6. Bioanode de 2^{ème} génération	116
IV.1. Analyses MEB.....	118
IV.2. Conclusion	121
Chapitre V. Etude des biofilms EA en piles à combustible microbiennes benthiques	123
V.1. Introduction.....	125
V.2. Essais sur le terrain.....	126
V.3. Essais en laboratoire	128
V.3.1. Mise en place des PACM	128
V.3.2. Caractérisation des PACM	129
V.4. 4. Caractérisation des biofilms par microscopie électronique à balayage	133
V.5. Association de PACM en parallèle et en série	135
V.5.1. Association en parallèle.....	135
V.5.2. Association en série	137
V.5.1. Influence du transfert et du volume sur les PACM	138
V.5.2. Association en série de L1 et L2	140
V.5.3. Bilan.....	141
V.6. Conclusion et discussion	141
Conclusion Générale et Perspectives	145
Bibliographie.....	151
Table des figures.....	166
Liste des tableaux	171

Introduction Générale

Les sources d'énergies fossiles (pétrole, charbon, gaz naturel,...) sont actuellement consommées bien plus vite qu'elles ne mettent de temps à se former. Elles ne sont pas inépuisables et au rythme actuel, l'humanité aura épuisé en moins de 200 ans leurs réserves accumulées pendant plusieurs centaines de millions d'années. Par opposition, une énergie renouvelable est définie comme une énergie dont la source a une vitesse de formation plus grande que sa vitesse de consommation (par exemple les énergies solaire et éolienne). Une énergie propre doit produire peu ou pas de polluants, ceux-ci se dégradant rapidement.

Ces définitions sont au cœur d'une des grandes problématiques soulevées à la fin du siècle précédent et encore d'actualité aujourd'hui. En effet, au début des années 90, la certitude de devoir remplacer les énergies fossiles par des énergies renouvelables et propres fait la quasi-unanimité auprès des gouvernements des grands pays industrialisés. Les facteurs principaux initiateurs de cette réflexion sont les suivants :

- L'impact environnemental, notamment le réchauffement climatique dû aux émissions de gaz à effet de serre, causé par l'utilisation des combustibles fossiles. Dans ce sens, le GIEC qui a été créé en 1988 par l'ONU est chargé de constituer des rapports et des comptes-rendus sur la question du changement climatique d'origine humaine ;
- Les réserves des énergies fossiles sont de plus en plus limitées et les incertitudes liées à leur approvisionnement sont grandissantes du fait des tensions au Moyen-Orient. Ces raisons ont pour conséquence l'augmentation des coûts des combustibles fossiles créant ainsi une forte dépendance énergétique des pays industrialisés ;
- L'augmentation de la population mondiale et l'industrialisation des pays émergents augmentent la demande énergétique mondiale.

Dans ce contexte, les énergies renouvelables connaissent un essor depuis le début des années 1990, notamment à travers la production d'électricité à partir de l'éolien et du solaire. Les moteurs principaux sont pour le Nord le réchauffement climatique et pour le Sud une demande en énergie accélérée et dispersée. D'après l'Observatoire des Energies Renouvelables (ObservER), en 2009, la production d'électricité renouvelable atteignait 19,1% de la production d'électricité mondiale, soit une croissance annuelle moyenne de 3,1% depuis 1999. Cela correspond à 1000 tonnes watt-heure d'électricité renouvelable de plus en 10 ans.

C'est dans cette dynamique d'augmenter l'utilisation de ressources propres et renouvelables que s'inscrit la pile à combustible microbienne (PACM). L'intérêt croissant au sujet de cette nouvelle technologie dans le domaine de la recherche suit de près les évolutions sociétales citées précédemment. L'atout majeur de cette pile réside dans la catalyse des réactions électrochimiques par des biofilms bactériens dits électroactifs (EA). Actuellement, plusieurs sources de bactéries électroactives, capables d'échanger des électrons avec des matériaux conducteurs, ont déjà été découvertes. La grande majorité est issue de zones à climat tempéré. Ce travail de thèse, qui s'inscrit dans le cadre du programme BioEnergies de l'Agence National de la Recherche démarré en 2008 et plus précisément du projet Agri-Elec, a pour ambition de proposer de nouveaux milieux sources de bactéries EA ainsi que d'améliorer les connaissances sur les biofilms EA formés à partir de consortia bactériens naturels.

La région de la Guyane, située entre le Tropique Nord et l'Equateur, est reconnue pour sa grande biodiversité. Ce territoire, en particulier ses zones humides (mangroves, criques,...), constitue de ce fait un terrain d'investigation approprié pour rechercher et étudier de nouveaux biofilms EA. En effet, ces milieux humides possèdent les caractéristiques requises pour constituer des sources potentielles de bactéries EA : sols sédimentaires, pH neutre, température élevée (26 – 30°C), salinité élevée dans le cas des mangroves,...

L'étude des biofilms électroactifs issus des milieux humides de cet environnement s'est basée sur une approche pluridisciplinaire originale, établie notamment par les échanges menés entre les sept partenaires du projet Agri-Elec :

- Le Laboratoire des Matériaux et des Molécules en Milieu Amazonien (L3MA), UMR Ecologie des forêts tropicales (ECOFOG, Cayenne), où ont été réalisés nos travaux ;

- Le laboratoire de Génie Chimique (LGC), Centre National de la Recherche Scientifique (Toulouse), coordonnant le projet, pour ses compétences en électrochimie et en PACM ;

- Le Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives (CEA) pour ses compétences en matériau et en corrosion (Saclay) et pour ses compétences en biologie moléculaire (Cadarache) ;

- Le Laboratoire de Chimie Agroindustrielle (LCA, Toulouse), pour ses compétences en chimie des composés organiques et en ressources agricoles,

- Le Centre Technique du Papier (CTP, Grenoble), pour ses travaux sur les effluents de papeterie, sources de bactéries électroactives ;

- La société PaxiTech (Grenoble), pour ses compétences en piles à combustible et son savoir-faire dans la conception d'électrodes et de membranes.

Les objectifs principaux de la thèse ont été définis comme suit :

- Etablir un protocole de détection et de formation des biofilms EA alliant techniques électrochimiques, microscopiques et microbiologiques ;

- Etablir un catalogue de milieux sources de bactéries EA et un catalogue de bactéries EA ;

- Etudier le mécanisme de fonctionnement des biofilms EA en fonction des conditions opératoires.

Une autre partie de ce travail de thèse, complémentaire de la précédente démarche, prévoyait la conception de piles à combustibles microbiennes. Ce travail exploratoire avait pour objectif :

- De vérifier l'applicabilité des biofilms EA découverts dans un dispositif complet de pile ;

- D'établir un parallèle entre les performances des biofilms EA formés en cellule électrochimique et en pile ;

- De proposer un premier dispositif de pile à combustible microbienne performant à partir des milieux sélectionnés.

Afin de présenter les recherches effectuées et les résultats obtenus, ce document s'articule en 5 chapitres :

Le chapitre I est une synthèse bibliographique qui décrit, en premier lieu, le fonctionnement d'un biofilm EA et les différents mécanismes de transfert électronique. Le fonctionnement et les caractéristiques des PACM actuellement connues y sont également

présentés. Par la suite, trois points particuliers sont développés : les méthodes d'amélioration des biofilms EA, la PACM benthique et les milieux humides de Guyane.

Le chapitre II répertorie les différentes méthodes utilisées et le matériel employé pour réaliser les expériences lors des diverses études.

Le chapitre III décrit les travaux exploratoires menés pour définir et améliorer le protocole de recherche et d'identification des biofilms EA. Les résultats liés à la recherche de nouvelles sources de bactéries EA sont également présentés et discutés.

Les chapitres IV et V exposent les résultats obtenus lors de l'application des biofilms EA dans 2 dispositifs de PACM conçus au laboratoire.

Enfin une conclusion générale permet de faire un récapitulatif des principaux résultats, d'établir la discussion et de proposer des perspectives à cette contribution.

Chapitre I. Synthèse bibliographique

Ce chapitre se découpe en 4 parties. La première concerne les biofilms bactériens électroactifs (EA). Ceux-ci seront définis à travers la notion et les caractéristiques générales d'un biofilm bactérien puis en fonction de leur activité d'échange électronique avec des électrodes. La deuxième partie présente les différentes méthodologies d'étude et de formation des biofilms EA existantes. La troisième partie décrit la pile à combustible microbienne (PACM) et ses différentes architectures. Un état de l'art sur une pile en particulier sera effectué, la PACM benthique. La dernière partie donne des informations concernant les zones humides de la Guyane et notamment sur la mangrove.

I.1. Biofilm électroactif

I.1.1. Biofilm

A l'état naturel, les microorganismes peuvent vivre sous plusieurs modes : planctonique, benthique et sous forme de biofilms [1]. La forme planctonique qui est la plus connue et la plus étudiée est celle où les microorganismes sont libres dans le milieu, par exemple en suspension dans les colonnes d'eau des milieux aquatiques. La forme benthique est une forme liée aux environnements aquatiques et concerne les microorganismes qui vivent à la surface et dans les sédiments. Sous la forme biofilm encore appelée périphyton, les microorganismes sont attachés à des substrats vivants ou non-vivants, organiques ou inorganiques. Dans ce document, les microorganismes dont les propriétés électroactives sont étudiées, sont, dans leur milieu naturel sous les trois formes et, pendant les expériences essentiellement sous forme de biofilms adhérents à des surfaces solides conductrices. Il convient donc ici de préciser la structure et le mode de formation des biofilms ainsi que leur mode de développement.

I.1.1.1. Définition, structure et formation du biofilm

Un biofilm est un assemblage de microorganismes, contenu dans une matrice extracellulaire de type exopolymérique, qui est attaché par une adhésion irréversible à une surface solide ou associé à une interface solide/liquide ou encore air/liquide [1-4] .

Cet assemblage de microorganismes peut être composé uniquement par des bactéries mais dans le cas d'environnements aquatiques, il peut être initié par des diatomées et être composé de bactéries, d'algues, de protozoaires et de champignons. Dans tous les cas, les biofilms ont des structures très hétérogènes, composés essentiellement de cellules

bactériennes et de substances extra-polymériques (EPS). Cette substance représente 50 à 90 % du carbone organique total du biofilm et est composée majoritairement de polysaccharides et de protéines (soit 75 – 89 % de la composition en EPS du biofilm) [1,3,5].

La matrice extracellulaire permet au biofilm d'adopter une structure en trois dimensions contenant des micro-colonies de cellules bactériennes, d'espèce unique ou multi-espèces, qui sont séparées les unes des autres par des vides interstitiels encore appelés voies d'eau, canaux ou pores. Ces vides favorisent la circulation des nutriments par le flux de liquide provenant du milieu dans lequel s'est formé le biofilm mais également l'échange des produits métabolites avec le milieu extérieur.

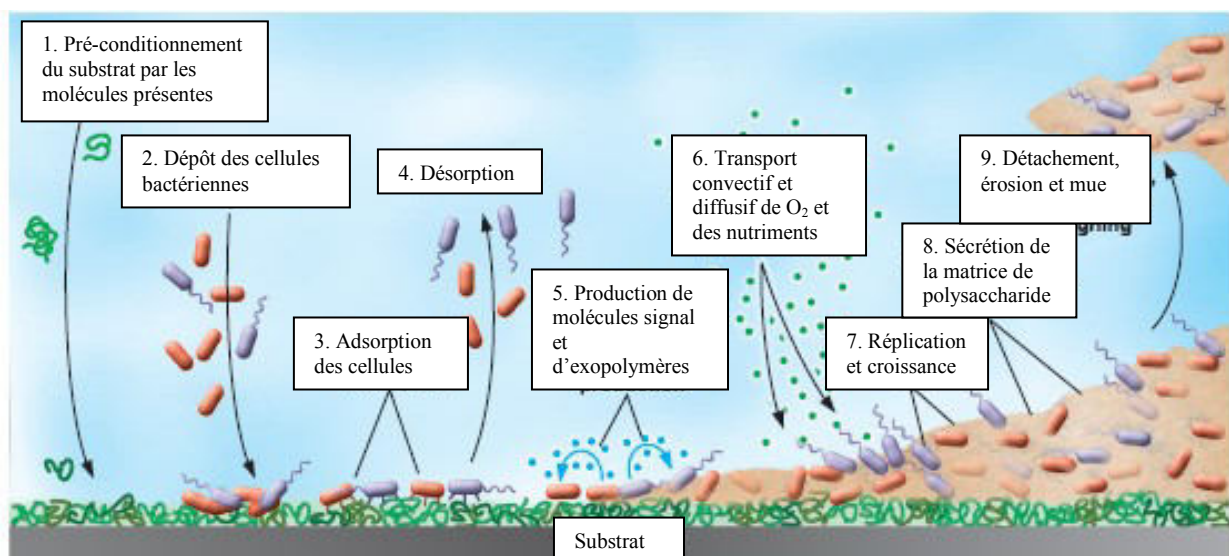


Figure I-1 : Processus d'adhésion irréversible du biofilm sur un substrat solide, adapté de Bryers et al. [6].

Les mécanismes de formation des biofilms sont actuellement bien connus et détaillés dans la figure I-1 [6]. Lors de la première étape, le matériau support est pré-conditionné c'est-à-dire qu'il est recouvert par les polymères du milieu aqueux. Ce recouvrement a pour effet de permettre l'adhésion des cellules planctoniques du milieu. Toutefois, cette première adhésion est réversible, on parle d'adhésion initiale. Lors de la seconde étape, la colonisation primaire induit une seconde adhésion qui cette fois est irréversible. Les cellules communiquent grâce à la production de molécules signal et la sécrétion d'exo-polymères se met en place. La biomasse microbienne augmente grâce aux processus de réplication. De plus, les phénomènes de diffusion et de convection permettent le transport des nutriments et du dioxygène dissous. Enfin lors de la troisième et dernière étape, le biofilm devient mature. La sécrétion des polysaccharides augmente, les divisions cellulaires continuent et de nouvelles communautés

bactériennes viennent s'ajouter au biofilm. Le biofilm est également soumis à des phénomènes d'érosion ou de dispersion des bactéries vieillissantes.

Tableau I-1 : Facteurs environnementaux et microbiologiques influençant l'attachement microbien et la structure du biofilm

Caractéristiques du milieu	Composition microbiologique	Caractéristiques de la surface ou de l'interface
-pH -Température -Intensité lumineuse -Concentration en nutriments -Concentration en polymères -Hydrodynamique	-Appendices extracellulaires (flagelles ou fimbriae) -Surface cellulaire (protéines, lipopolysaccharides, exopolysaccharides,...) -Hydrophobicité de la surface cellulaire -Historique de colonisation primaire	-Rugosité de la surface -Hydrophobicité de la surface

La structure du biofilm dépend toutefois de nombreux facteurs environnementaux et microbiologiques [2,3,5]. Ainsi, l'intensité lumineuse, la vitesse d'écoulement de l'eau (hydrodynamique), l'historique de la colonisation primaire, l'âge du biofilm, les conditions de croissance, les propriétés de surface et d'interface, la disponibilité des nutriments, la composition microbiologique du biofilm, la présence ou non d'appendices extracellulaires (flagelles, fimbriae,...), l'hydrophobicité de la surface cellulaire, le pH et la température du milieu sont autant de facteurs pouvant affecter la structure du biofilm. Par exemple, le biofilm sera plus épais sur une surface solide rugueuse et plus hydrophobe. Tous ces paramètres vont donc plus ou moins favoriser l'attachement, l'adhésion et la croissance de microorganismes pour évoluer en biofilm (Tableau I-1).

I.1.1.2. Intérêts et avantages du biofilm pour les microorganismes

Les communautés microbiennes associées sous la forme de biofilm bénéficient sans conteste de la protection contre plusieurs stress environnementaux grâce à leur enveloppement par la matrice extracellulaire. Cette matrice qui constitue en fait un gel polymérique autour des cellules bactériennes est une barrière physique et fournit une protection contre, par exemple, les radiations UV, les modifications de pH, les chocs osmotiques et la dessiccation [2]. Elle a le pouvoir aussi de séquestrer des métaux, des cations ou des toxines qui pourraient être nuisibles pour les cellules bactériennes. De plus, elle peut retarder ou empêcher l'accès de

molécules antimicrobiennes issues du milieu en régulant les transports par diffusion ou en interagissant chimiquement avec ces molécules [5].

Les nutriments, les composés organiques ou encore le O₂ sont absorbés par la matrice du biofilm et peuvent ainsi se concentrer dans le biofilm augmentant leur disponibilité pour les microorganismes [2,5]. Le flux liquide qui circule dans les vides interstitiels du biofilm permet également d'augmenter l'échange des nutriments et des produits issus des processus métaboliques des microorganismes avec le milieu extérieur et ce dans toutes les couches du biofilm.

Le biofilm est composé de micro-colonies, en général contenant plusieurs espèces bactériennes. La multiplicité des espèces et leur proximité dans le biofilm sont autant de facteurs qui favorisent la communication intercellulaire et donc la coopération métabolique [2]. Cette coopération est essentielle pour le bon développement du biofilm. En effet, la plupart des processus métaboliques comme par exemple la dégradation de la matière organique nécessitent l'action combinée de plusieurs espèces bactériennes.

Un des processus clé de cette communication intercellulaire est le quorum sensing. Il permet par une modulation de l'expression génétique des bactéries d'obtenir des changements phénotypiques permettant un meilleur ajustement aux conditions environnementales pendant la croissance du biofilm. Cette régulation de paramètres est possible par la sécrétion de molécules dites signal encore appelées auto-inducteurs. Le quorum sensing permet aux bactéries du biofilm de réguler leur densité de population. Par exemple, lors du détachement des bactéries, une sécrétion d'auto-inducteurs peut permettre le ralentissement de la formation de la matrice pour libérer les bactéries. Le quorum sensing intervient dans de nombreux processus métaboliques comme la biosynthèse d'enzymes extracellulaires, le développement et la croissance du biofilm, le développement de nouvelles compétences génétiques, la symbiose [5,7].

La proximité des microorganismes dans les biofilms permet le transfert de gènes entre les espèces bactériennes. Ce transfert permet d'assurer une meilleure stabilité du consortium bactérien qu'est le biofilm par des améliorations génétiques telles que la résistance aux antibiotiques ou aux métaux. Il participe également à l'évolution et à la diversité des espèces génétiques des familles bactériennes existantes par l'acquisition des bactéries de nouveaux

gènes. Le mécanisme de transfert le plus important est celui de la conjugaison des plasmides [1,2].

I.1.2. Bactéries électroactives et biofilm électroactif

Certains biofilms ont la capacité d'être électroactifs (EA) c'est-à-dire de pouvoir échanger des électrons avec des surfaces solides et conductrices [8] telles que les électrodes de piles à combustibles microbiennes (PACM), dispositif dont le principe est détaillé dans la deuxième partie de cette synthèse bibliographique. Cet échange électronique est possible grâce à des mécanismes directs ou indirects, faisant intervenir une ou plusieurs familles bactériennes à travers leurs procédés cataboliques, c'est-à-dire de dégradation moléculaire, la fermentation et la respiration cellulaire. Les bactéries EA, capables de transférer directement leurs électrons aux surfaces solides conductrices sont qualifiées d'électrigènes, électrodophiles ou encore anodophiles [9-12].

I.1.2.1. Mécanismes de transfert des électrons aux électrodes

I.1.2.1.1. Fermentation ou respiration cellulaire

Le transfert d'électrons, qu'il soit direct ou indirect, intervient en début ou en bout de chaîne d'une cascade de réactions d'oxydoréductions, qui sont les réactions clés de processus cataboliques nécessaires à la survie des espèces bactériennes. Ces processus sont les mécanismes naturels de fermentation et de respiration cellulaire, qui sont utilisés par les bactéries pour dégrader des composés organiques et en extraire de l'énergie, la fermentation ayant préférentiellement lieu en milieu anaérobie et la respiration cellulaire pouvant avoir lieu avec ou sans la présence de dioxygène. Dans tous les cas, la bactérie extrait de l'énergie des composés organiques qu'elle dégrade, et stocke cette énergie sous forme d'adénosine triphosphate (ATP) qui est considérée comme la source d'énergie biochimique universelle. Pour former les molécules d'ATP, les mécanismes de fermentation et de respiration sont différents. La fermentation en effet utilise un composé organique comme donneur d'électrons et l'accepteur final d'électrons est souvent le produit de la réaction de dégradation. Dans le cas de la respiration cellulaire, aérobie ou non, le donneur d'électrons est un composé organique ou inorganique et l'accepteur final d'électrons est un composé inorganique tel que le dioxygène (milieu aérobie) ou le nitrate (milieu anaérobie) ou encore, comme dans le cas de nombreuses bactéries électroactives, des substrats solides (oxydes de Fe III ou de Mn IV par exemple), présents naturellement dans les milieux sédimentaires.

Il existe plusieurs formes de fermentation : alcoolique, lactique... en fonction du produit formé. D'une façon générale, la fermentation est une source d'énergie moins importante pour la bactérie que la respiration ; en effet, pour une molécule de glucose par exemple, la fermentation permet de produire deux molécules d'ATP alors que la respiration en produit 36.

La différence de potentiel entre le couple impliqué dans l'oxydation du composé organique, donneur des électrons, et celui mis en jeu lors du dernier transfert électronique par la bactérie vers l'accepteur d'électrons, détermine le gain énergétique pour les bactéries. Lorsqu'une électrode se substitue soit à l'accepteur d' e^- (anode) ou au donneur d' e^- (cathode), son potentiel va favoriser une voie métabolique plutôt qu'une autre [13].

Un modèle comportemental est décrit dans la littérature lorsque l'électrode est une anode c'est-à-dire l'accepteur d'électrons [13] :

- Plus le potentiel de l'électrode est élevé et plus les bactéries peuvent obtenir de l'énergie. Dans ce cas, c'est la respiration cellulaire qui est principalement mise en jeu ;
- Si le potentiel de l'électrode est très bas, les bactéries choisissent la fermentation comme processus de dégradation et le plus souvent les mécanismes de transfert sont indirects entre la bactérie et l'électrode.

1.1.2.1.2. Transferts électroniques directs ou indirects

Dans la littérature, les mécanismes de transfert des électrons vers l'électrode (cas de l'anode) sont plus étudiés et mieux développés que la situation inverse où l'électrode est le donneur d'électron (cas de la cathode). Le transfert électronique vers l'électrode s'effectue selon plusieurs voies en fonction des espèces bactériennes présentes mais également de la composition du milieu.

Compte tenu du manque d'information actuellement sur les transferts électroniques de l'électrode vers les microorganismes (cas de la biocathode) [14], les mécanismes décrits ici le sont essentiellement pour les échanges électroniques des microorganismes vers l'électrode (bioanode). Ces modes de transfert, indirects ou directs [8], sont décrits selon 4 processus principaux : l'utilisation de protéines trans-membranaires, la présence de pili sur les cellules bactériennes, l'utilisation de médiateurs endogènes ou exogènes et l'oxydation abiotique de produits de la fermentation [8,10,15].

Certains produits métaboliques, issus de la fermentation microbienne par des bactéries fermentatives, sont oxydés abiotiquement à la surface de l'anode et permettent ainsi un transfert indirect des électrons (figure I-2) [10]. Les produits oxydés peuvent être le dihydrogène, des alcools, de l'ammoniac ou encore le sulfure d'hydrogène [8].

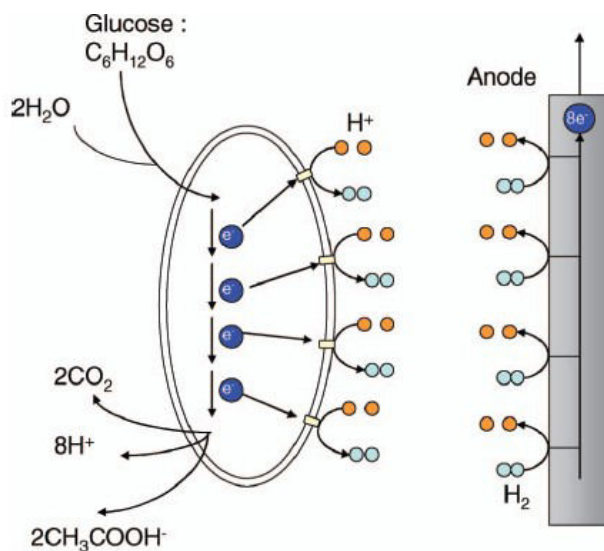


Figure I-2 : Mécanisme de transfert électronique par l'oxydation abiotique de sous-produit de la fermentation bactérienne. Cette image est extraite de l'article de Erable et al. [8].

Des molécules, appelées médiateurs ou navettes électroniques sont parfois utilisées par les bactéries pour assurer le transfert électronique vers l'électrode. Ces navettes sont soit sécrétées par les bactéries elles-mêmes, soit artificielles et ajoutées au milieu électrolytique [8,10,16]. En effet, la plupart des bactéries ne sont pas elles-mêmes électroactives car les acteurs du transport d'électrons (protéines) sont contenus à l'intérieur des membranes cellulaires [16]. Ces médiateurs sont des molécules capables d'agir comme des catalyseurs s'oxydant et se réduisant de façon cyclique (figure I-3A). Leur forme réduite s'avère être plus active électrochimiquement que les produits de fermentation. De plus, ces molécules sont capables de traverser la membrane cellulaire de la bactérie, d'accepter les électrons issus des processus métaboliques, de sortir de la cellule sous leur forme réduite et alors de s'oxyder à la surface de l'anode, effectuant le transfert de l'électron [10].

Des exemples de médiateurs artificiels sont la thionine, le rouge neutre ou encore des chélates de fer. Ces médiateurs sont aujourd'hui très peu utilisés car ils présentent quelques inconvénients : ils sont toxiques pour l'homme, coûteux et complexes d'utilisation (précautions d'emploi, recyclage dans les PACMs à recirculation qui augmentent les coûts, nécessité de récupérer les déchets de la PACM contenant les médiateurs,...). *Escherichia coli*,

les espèces de *Pseudomonas*, de *Proteus* et de *Bacillus* sont des bactéries connues pour utiliser ce type de médiateurs [10].

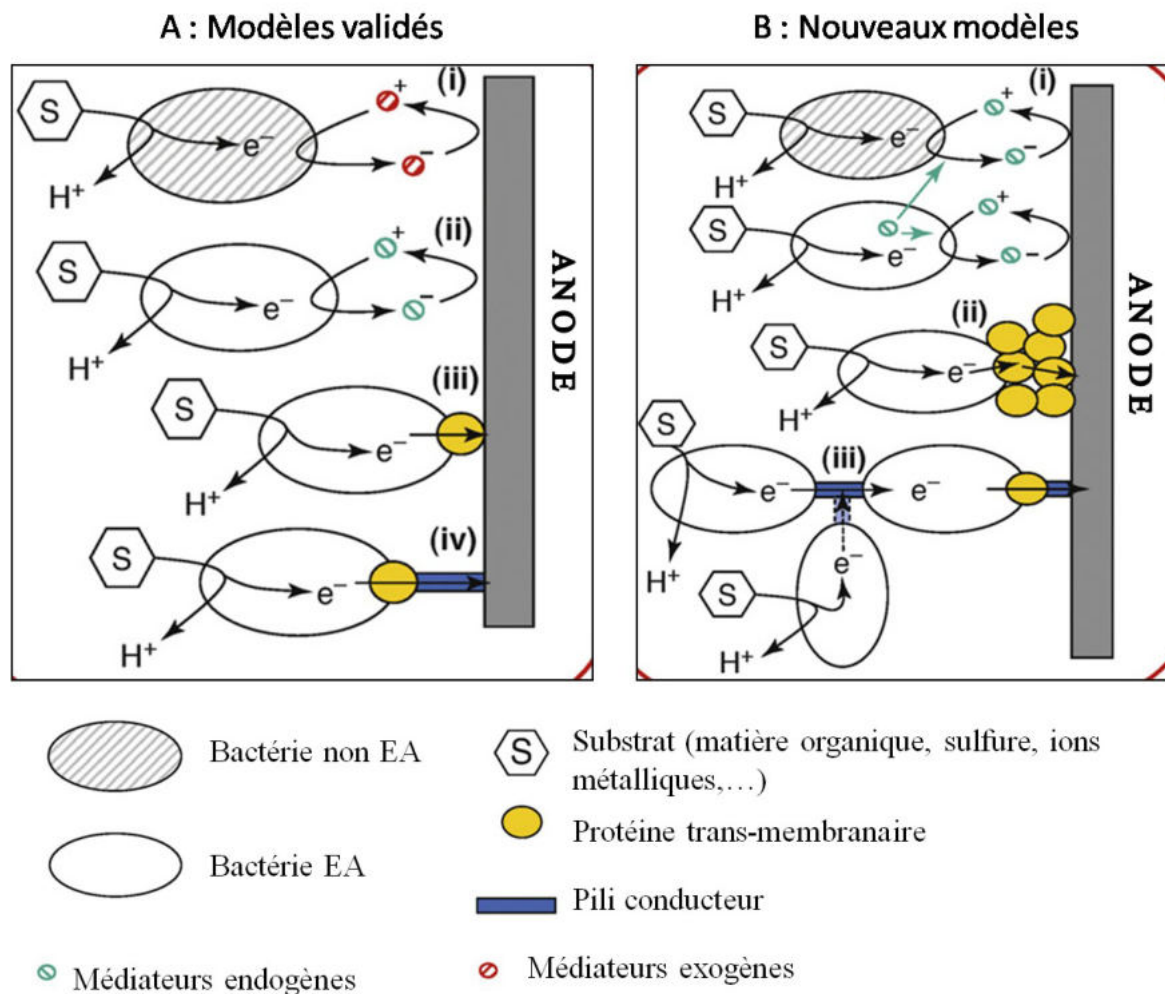


Figure I-3 : Mécanismes de transfert électronique mis en jeu par les bactéries des biofilms EA, schéma adapté de la revue de Pham et al. [15]. Les modèles A décrivent : (i) le transfert indirect par des médiateurs externes ajoutés, (ii) le transfert indirect par les médiateurs produits par les bactéries, (iii) le transfert électronique direct par un cytochrome de la membrane externe, (iv) le transfert direct par l'action d'un pili. Les modèles B décrivent des hypothèses de mécanismes : (i) le transfert indirect d'espèces non EA par des médiateurs produits par des bactéries EA, (ii) le transfert direct par une couche composée de plusieurs cytochromes, (iii) le transfert de cellule à cellule par les pili.

Les bactéries connues pour sécréter leurs propres navettes d'électrons sont *Shewanella oneidensis*, *Geothrix fermentans*, les espèces de *Pseudomonas*. La biosynthèse de ces médiateurs est un processus énergétiquement coûteux pour la bactérie, ce mécanisme est donc moins compétitif lorsque le milieu est ouvert ou en recirculation car les navettes sont éliminées de l'électrolyte et le coût énergétique ne peut être compensé par la bactérie [10]. Toutefois lorsque le milieu s'y prête, ces médiateurs présentent certains avantages qui sont de pouvoir être utilisés par des microorganismes autres que leur producteur et de pouvoir réagir

sur plusieurs sites réactionnels de la cellule bactérienne (à l'intérieur du périplasme, sur la membrane cytoplasmique et à l'intérieur du cytoplasme) [17]. Les médiateurs endogènes connus sont les sulfures, les ions ferriques ou encore les phénazines et les flavines.

L'utilisation par les bactéries de pili conducteurs, situés à la surface des cellules bactériennes, ou des protéines transmembranaires comme les c-cytochromes, est associée aux mécanismes de transfert électronique direct (figure I-3A). La famille bactérienne la plus importante connue à ce jour pour utiliser le transfert direct d'électrons est celle des *Geobacteraceae*. Les microorganismes de cette famille sont connus pour leur faculté à transférer des électrons à des oxydes solides de fer ou de manganèse.

De récentes découvertes ont permis d'établir des modèles un peu plus complexes de transfert électronique permettant la combinaison de plusieurs de ces mécanismes [15]. En effet, des bactéries EA capables de transfert direct peuvent sécréter des médiateurs électroniques, comme *Shewanella oneidensis* [18-20]. Des bactéries non EA, mises en contact avec des bactéries EA du genre *Pseudomonas*, peuvent utiliser les médiateurs sécrétés par les bactéries EA et transférer elles-aussi des électrons [21]. Des communications électroniques de cellules à cellules seraient également possible [18,22]. Ces nouveaux modèles de transfert électronique prévoient (figure I-3B) :

- Des médiateurs utilisés par des bactéries EA et non EA ;
- Des couches multiples de protéines trans-membranaires ;
- Des associations de pili et de protéines trans-membranaires ;
- Des transferts électroniques inter-bactéries jusqu'à une bactérie finale directement connectée à l'électrode [23].

Le nombre d'articles scientifiques traitant des mécanismes de transfert électronique entre les microorganismes et les cathodes est faible, comparaison faite avec celles sur les bioanodes. Toutefois, certains auteurs ont tenté d'apporter quelques éléments de réflexion à ce sujet comme Rosenbaum et al. en 2011 qui, à travers une revue sur les biocathodes, proposent plusieurs voies mécanistiques [17]. Comme pour les bioanodes, les mécanismes de transfert sont directs ou indirects [14]. Dans le cas des transferts directs, l'action des protéines membranaires tels que les cytochromes de type *c* ainsi que la participation des hydrogénases sont envisagées. En effet, la majorité des microorganismes intervenant sur les biocathodes citées dans la littérature possèdent le matériel biologique pour produire du dihydrogène,

notamment les hydrogénases. En ce qui concerne les transferts indirects, l'utilisation de médiateurs artificiels comme le méthylviologène reste encore le meilleur outil de compréhension des mécanismes, grâce à la bonne connaissance des propriétés chimiques et redox de ces médiateurs.

Les tableaux I-2 à I-4 recensent les espèces bactériennes EA les plus couramment étudiées en PACM ou en cellule électrochimique. S'il est connu, leur mécanisme de transfert électronique est indiqué.

Tableau I-2 : Bactéries EA capables de catalyser une oxydation sur une bioanode. MEnd = médiateur endogène ; MEx : médiateur exogène.

Bactérie	Electrode ou réaction redox catalysée	Mécanismes de transfert électronique	Références
<i>Rhodoferrax ferrireducens</i>	Bioanode	Direct	[24]
<i>Desulfuromonas acetoxidans</i>	Bioanode	Direct	[25] [26]
<i>Geothrix fermentans</i>	Bioanode	MEnd	[27]
<i>Aeromonas hydrophilia</i>	Bioanode	Direct	[28]
<i>Desulfobulbus propionicus</i>	Bioanode	Direct	[29]
<i>Clostridium butyricum</i>	Bioanode	Direct	[30]
<i>Klebsiella pneumoniae L17</i>	Bioanode	Direct	[31]
<i>Thermincola ferriacetica Z-0001</i>	Bioanode	Direct	[32]
<i>Corynebacterium sp. MFC03</i>	Bioanode	MEnd	[33]
<i>Brevibacillus sp. PTH1</i>	Bioanode	MEx : phénazines produits par <i>P. aeruginosa</i>	[34] [21]
<i>Desulfitobacterium hefniense</i>	Bioanode	MEx : acides humiques	[35]
<i>Rhodopseudomonas palustres</i>	Bioanode	Direct	[36]
<i>Ochrobactrum anthropi YZ-1</i>	Bioanode		[37]
<i>Acidiphilum sp. 3.2Sup5</i>	Bioanode	Direct	[38]

Tableau I-3 : Bactéries EA capables de catalyser une réduction à la cathode. MEnd = médiateur endogène ; MEx = médiateur exogène.

Bactérie	Electrode ou réaction redox catalysée	Mécanismes de transfert électronique	Références
<i>Geobacter lovleyi</i>	Biocathode		[39]
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Réduction O ₂		[40]
<i>Desulfuvibrio vulgaris</i>	Réduction de H ⁺ en H ₂	MEx artificiel: Methyl viologen	[41]
<i>Brevundimonas diminuta</i>	Réduction O ₂		[40]
<i>Bhurkolderia cepacia</i>	Réduction O ₂		[40]
<i>Branhamella catarrhalis</i>	Réduction O ₂		[40]
<i>Enterobacter cloacae</i>	Réduction O ₂		[40]
<i>Shigella flexneri</i>	Réduction O ₂		[40]
<i>Acinetobacter sp.</i>	Réduction O ₂		[40]
<i>Kingella Kingae</i>	Réduction O ₂		[40]
<i>Kingella denitrificans</i>	Réduction O ₂		[40]
<i>Micrococcus luteus</i>	Réduction O ₂		[40]
<i>Staphylococcus carnosus</i>	Réduction O ₂		[40]
<i>Methanobacterium palustre</i>	Réduction de CO ₂ en CH ₄		[42]
<i>Actinobacillus succinogène</i>	Réduction du fumarate en succinate	MEx artificiel : Rouge neutre	[43]
<i>Dechloromonas agitata</i>	Réduction du ClO ₄ ⁻ en Cl ⁻	MEnd. : AQDS/AQDSH ₂	[44]
<i>Azospira suillum</i>	Réduction du ClO ₄ ⁻ en Cl ⁻	MEnd. : AQDS/AQDSH ₂	[44]
<i>Acetobacter johsonii</i>	Réduction O ₂		[45]
<i>Winogradkyella poriferum</i>	Réduction O ₂		[45]
<i>Sphingobacterium sp.</i>	Réduction O ₂		[46]
<i>Acetobacter sp.</i>	Réduction O ₂		[46]
<i>Acetobacter lcoaceticus</i>	Réduction O ₂	MEnd : PQQ	[47]

Tableau I-4 : Bactéries EA capables de catalyser soit une oxydation soit une réduction sur les électrodes. MEnd = médiateur endogène.

Bactérie	Electrode ou réaction redox catalysée	Mécanismes de transfert électronique	Références
<i>Geobacter sulfurreducens</i>	- Bioanode - Réduction du fumarate en succinate - Réduction de l'uranium (VI) en U(IV)	- Direct : pili - Direct : cytochrome	[26] [26,48] [49]
<i>Geobacter metallireducens</i>	- Bioanode - Réduction du NO_3^- en NO_2^-	- Direct	[26,50] [26]
<i>Escherichia coli</i>	- Bioanode - Réduction O_2	- MEnd : quinone	[51] [52] [40]
<i>Shewanella putrefaciens (oneidensis)</i>	- Bioanode - Réduction du O_2	- MEnd : riboflavines - Direct : cytochromes pili	[19] [53] [54] [18] [47]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	- Bioanode - Réduction O_2	- MEnd : pyocianine, phénazine	[55] [40]
<i>Bacillus subtilis</i>	- Bioanode - Réduction O_2	- MEnd	[56] [40]

I.2. La Pile à Combustible Microbienne (PACM)

I.2.1. Importantes avancées dans le temps

Les principales découvertes qui sont à l'origine des designs de PACM actuelles trouvent leurs origines entre 1911 et 2002 (figure I-4). Il y a un siècle tout juste que le professeur en botanique M.C. Potter découvrait que de l'énergie électrique pouvait être obtenue à partir de la dégradation de composés organiques par des bactéries [57]. L'espèce bactérienne utilisée alors était la *Bacillus coli communis* aujourd'hui connue sous le nom d'*Escherichia coli*. Potter et al. utilisent un dispositif qui comprend 2 électrodes en platine plongées dans une cellule à deux compartiments dont l'un a été inoculé par une culture de *B. coli communis* (figure I-5). Après cette importante découverte, il faut attendre les années 60 pour que les premiers prototypes de PACM soient commercialisés en tant qu'équipement maritime. La crise pétrolière des années 70-80 et la prise de conscience des conséquences du réchauffement climatique au début des années 90 vont véritablement lancer les recherches sur ce dispositif qui apparaît alors comme une source prometteuse d'énergie renouvelable.

En 1999, Kim et al. mettent à profit la découverte récente de familles de microorganismes capables de transférer les électrons de leur métabolisme directement à des

substrats solides tels que le Fer (III) [58]. En inoculant leur prototype de PACM par une culture de *Shewanella putrefaciens*, ils démontrent qu'il est possible de ne pas utiliser de médiateurs électrochimiques pour le transfert électronique entre les bactéries et les électrodes. Les précédents dispositifs avaient en effet besoin de ces molécules chimiques coûteuses et dans leur grande majorité toxiques pour fonctionner. Cette avancée permet d'envisager la diminution des coûts de la PACM et donc sa commercialisation.

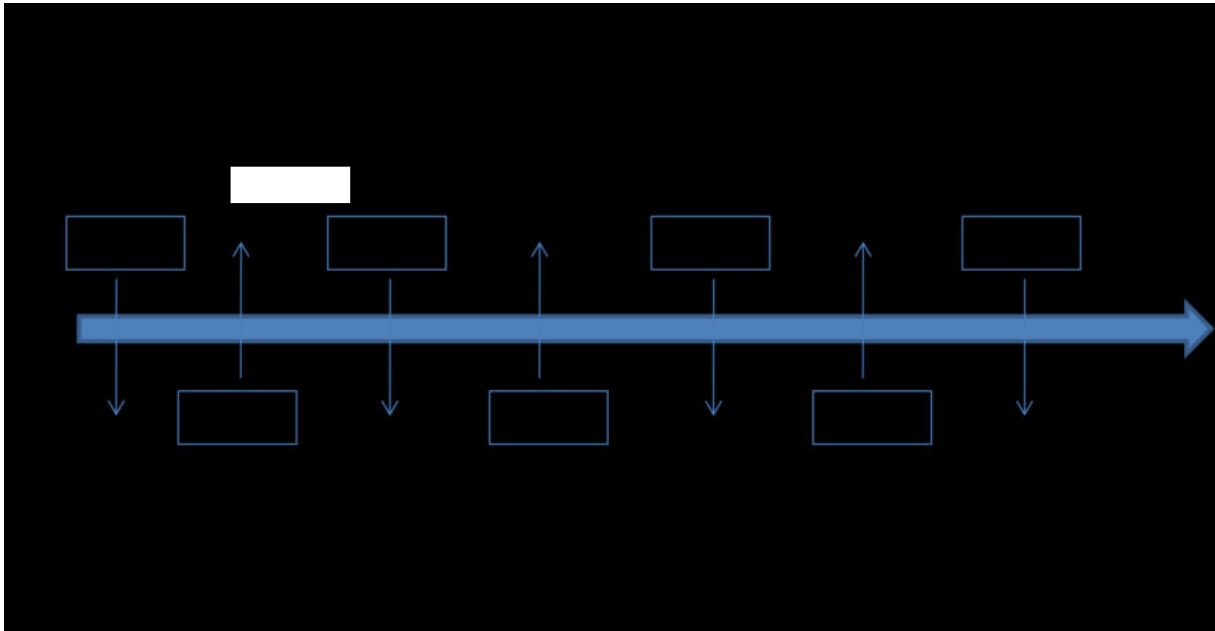


Figure I-4 : Frise chronologique de la pile à combustible microbienne. Les références correspondant aux numéros sur la figure sont les suivantes : (1) [57] ; (2) ; (3) ; (4) [59] ; (5) [58]; (6) [60]; (7) [25] ; (8) [61].

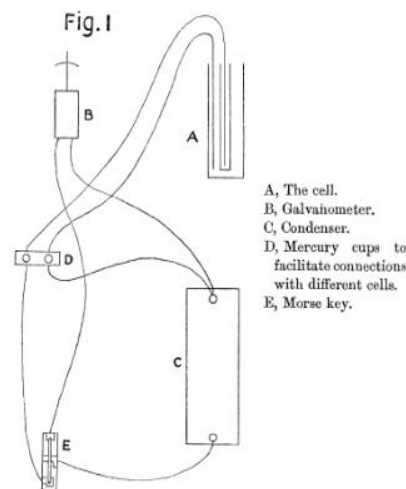


Figure I-5 : 1^{er} dispositif permettant d'établir le lien entre bactérie et électricité par M.C. Potter et al. en 1911 [57].

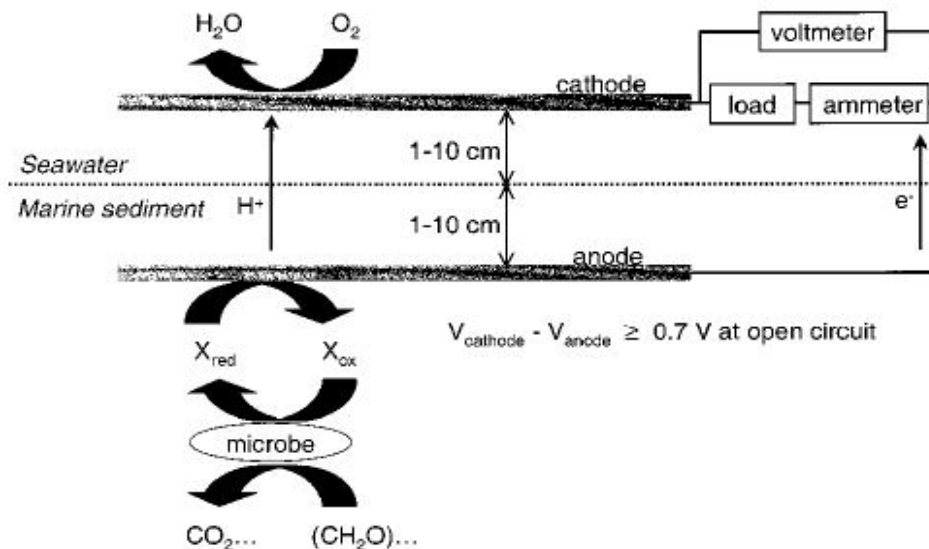


Figure I-6 : première PACM benthique de Reimers et al., 2001 [60]

En 2001, Reimers et al. démontrent qu'il est possible d'extraire de l'énergie électrique directement en exploitant les processus biologiques des fonds marins [60]. En plaçant deux électrodes de graphite au fond d'un océan dont une est enfouie dans les sédiments et l'autre dans l'eau de mer surnageante (figure I-6)), ils enregistrent une puissance de l'ordre de 10 mW/m² de surface d'électrode. Ce sont les recherches de Tender et al. et Bond et al. en 2002 qui montrent que cet environnement marin s'avère être riche en microorganismes dits électroactifs car capables de transférer directement leurs électrons à la surface conductrice de l'anode [25,61]. Ces dernières recherches vont définitivement accélérer les études scientifiques sur le dispositif PACM (figure I-7) et les prototypes actuels en sont fortement inspirés. Il est intéressant de noter que seulement 2% des écrits scientifiques sur cette technologie proviennent de travaux réalisés en France (Scopus – Mai 2012).

Des inocula aux combustibles en passant par l'architecture et la nature des électrodes, les PACM actuelles présentent des caractéristiques très diverses, d'où provient parfois une difficulté pour comparer leurs performances.

I.2.1. Principe de la PACM

Une PACM est un dispositif électrochimique qui utilise l'activité métabolique de microorganismes pour transformer directement de l'énergie chimique provenant de composés organiques en énergie électrique [58,62]. Son architecture et son principe s'inspirent de ceux de la pile à combustible classique (PAC), qui peut fonctionner de manière continue grâce à la

possibilité de renouveler le combustible (en continu ou par intermittence) contrairement au système batterie [13,63]. Toutefois, des différences de fonctionnement significatives séparent la PACM des PAC [10]. De plus, les performances obtenues avec les PAC sont toujours nettement supérieures à ceux de la PACM.

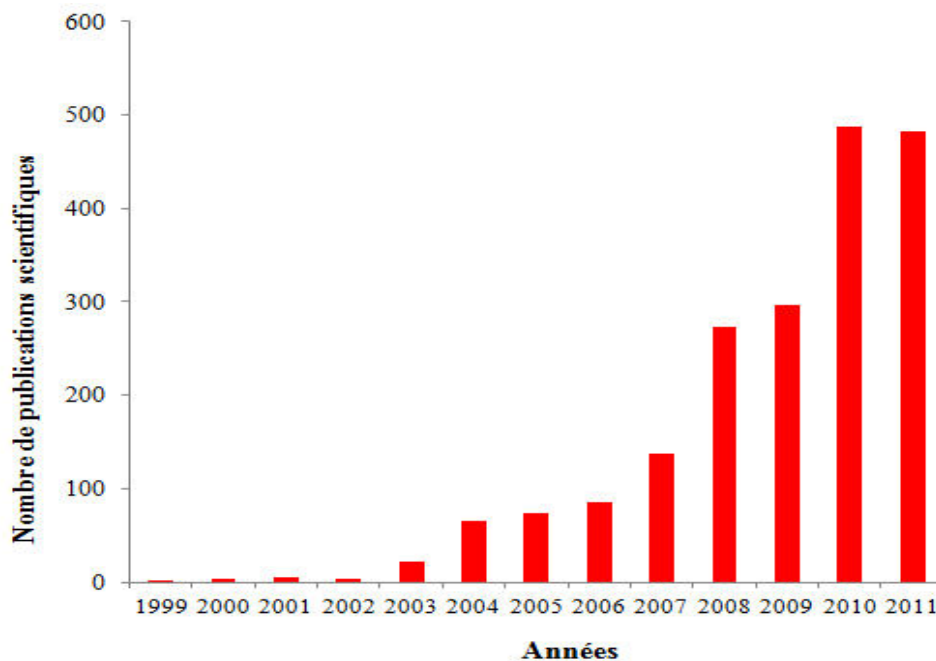


Figure I-7 : Histogramme présentant le nombre de publications scientifiques avec le mot-clé PACM. entre 1999 et 2011 (Source des résultats : base de données Scopus – Mai 2012).

Cependant, les catalyseurs utilisés par les PAC sont faits avec des matériaux onéreux comme le platine par exemple alors que les microorganismes dits électroactifs utilisés comme catalyseurs dans les PACM proviennent de nombreuses sources naturelles. La température de fonctionnement des PAC est élevée, entre 60 et 1000°C, alors que celle des PACM est mésophile, entre 5 et 65°C. Autre point, les combustibles utilisés par les PAC sont le plus souvent toxiques et très explosifs, ou présentent des conditions d'utilisation complexes alors que ceux disponibles pour les PACM ont de nombreuses sources et sont le plus souvent de faible valeur marchande car étant considérés comme des déchets.

L'association d'une électrode anode ou cathode et d'un biofilm microbien EA se nomme une bioanode ou une biocathode ou encore anode ou cathode microbienne. La majorité des PACM présentées dans littérature sont constituées d'une bioanode et d'une cathode abiotique, les publications de travaux de recherche sur la biocathode étant encore nettement moins nombreuses que celles sur les bioanodes [13].

Dans le cas le plus classique de PACM, c'est-à-dire avec une bioanode et une cathode à air abiotique, le métabolisme des microorganismes présents dans le compartiment anodique, notamment les processus de fermentation et de respiration, permettent la dégradation de la matière organique présente par oxydation et la libération d'électrons et de protons (figure I-8). Les électrons sont transférés par les microorganismes dits électroactifs à l'anode et peuvent alors migrer vers la cathode dans le circuit électrique extérieur mis en place entre les deux électrodes [13]. Ce circuit électrique possède au moins un composant de type résistif (une résistance en général). Les protons migrent eux dans le milieu liquide et passent du compartiment anodique vers le compartiment cathodique. A la cathode, les électrons et les protons participent à la réduction de l'oxygène de l'air, qui est sous forme dissoute dans une solution conductrice.

I.2.1. Caractérisation électrochimique de la PACM

Le potentiel anodique classique est compris entre -0,20 V et -0,28 V par rapport à l'électrode de référence standard à hydrogène (ESH) et le potentiel cathodique entre 0,1V et 0,3 V/ESH, lorsque le pH des électrolytes est de 7. Ils dépendent du matériau de l'électrode utilisée, du pH du milieu et de la concentration en réactifs [13,64,65].

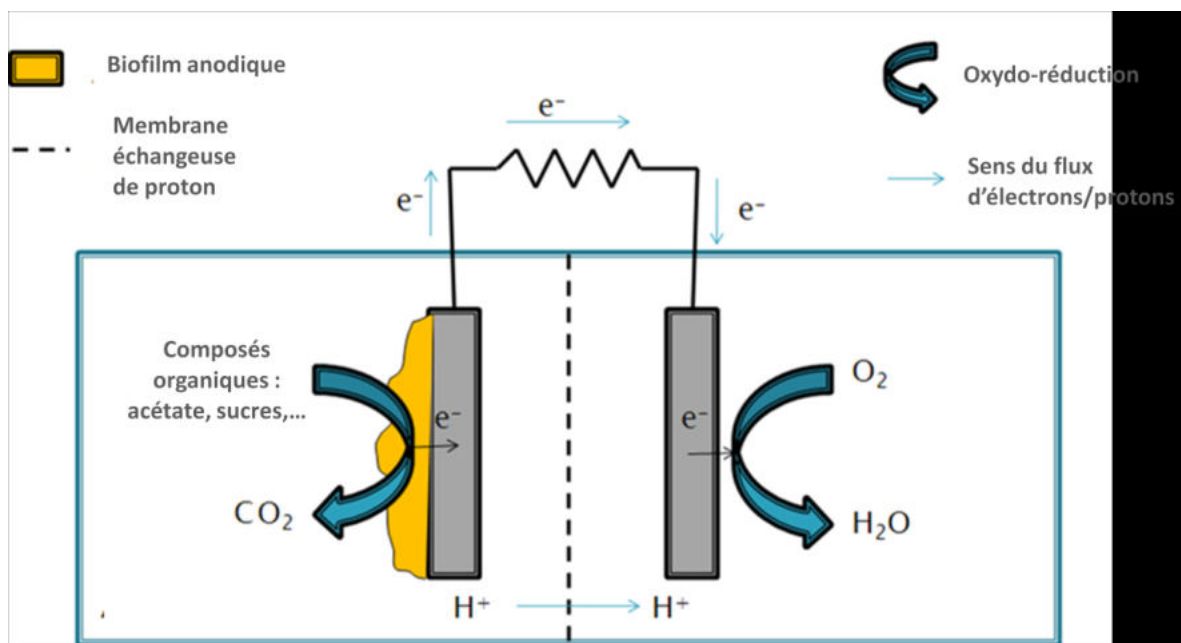
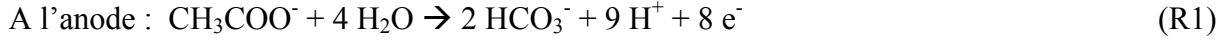


Figure I-8: Schéma conventionnel de la pile à combustible microbienne. Il s'agit d'une pile à deux compartiments avec l'association d'une bioanode et d'une cathode abiotique.

En prenant l'exemple le plus courant, c'est-à-dire une PACM dont la bioanode est alimentée par de l'acétate et dont la cathode abiotique participe à la réduction du dioxygène, les équations des réactions mises en jeu seraient :



Les potentiels théoriques anodique E_{ath} et cathodique E_{cth} à pH 7 sont déterminés selon les équations suivantes. Les interactions entre les espèces en solution sont négligées et le dioxygène est considéré comme ayant le comportement d'un gaz parfait.

$$E_{\text{ath}} = E_a^0 - \frac{RT}{nF} \ln \left(\frac{[\text{CH}_3\text{COO}^-]}{[\text{HCO}_3^-]^2 [\text{H}^+]^9} \right) = -1.292 \text{ V} \quad (\text{E1})$$

$$E_{\text{cth}} = E_c^0 - \frac{RT}{nF} \ln \left(\frac{1}{p\text{O}_2 [\text{H}^+]^4} \right) = 1.805 \text{ V} \quad (\text{E2})$$

avec E_a^0 et E_c^0 , les potentiels standard respectivement de l'oxydation de l'acétate à l'anode (0,187 V/ESH) et de la réduction du dioxygène à la cathode (1,229 V/ESH), R la constante universelle des gaz parfaits, T la température en degré Kelvin, n le nombre d'électrons libérés lors de la réaction électrochimique, F la constante de Faraday. La concentration de l'acétate considérée est de 1 g/L et la pression partielle de l'oxygène $p(\text{O}_2)$ est de 0,2 bar.

Dans la majorité des études de la bibliographie, les potentiels anodiques et cathodiques sont exprimés par rapport à une électrode de référence secondaire : l'électrode au calomel saturée (ECS), qui a un potentiel de +0,241 V/ESH. E_{ath} équivaut dans ce cas à -0,533 V/ECS et E_{cth} équivaut à +0,564 V/ECS.

La force électromotrice E_{fem} de la cellule électrochimique, soit la tension théorique que pourrait délivrer la PACM, peut être calculée selon :

$$E_{\text{fem}} = E_{\text{cth}} - E_{\text{ath}} \quad (\text{E3})$$

La PACM acétate/dioxygène a donc une tension théorique de 1,097 V à pH 7.

Dans la réalité, la tension délivrée par la PACM en circuit ouvert n'atteint jamais la valeur théorique puisque de nombreuses pertes dues à des irréversibilités interviennent. Ces réactions sont générées par l'adsorption des espèces en solution à la surface des électrodes. Lors du fonctionnement de la pile, d'autres types de surtensions interviennent : pertes d'activation, pertes ohmiques et pertes de concentration. Il est possible d'observer ces surtensions sur la courbe de polarisation de la PACM. La courbe de polarisation est la courbe caractéristique d'une PAC appelée aussi courbe tension-courant ou encore courbe $U(I)$ car elle représente les performances électriques d'une pile dans le plan tension-courant. Il est possible d'obtenir la courbe de polarisation de l'anode, de la cathode ou de l'ensemble de la pile. Elle s'obtient généralement en imposant une gamme de tensions et en mesurant le courant qui en résulte pour chaque tension imposée. Une autre méthode consiste à faire varier la résistance externe de la PACM et de relever la tension une fois un palier atteint pour chaque valeur de résistance. L'intensité correspondante est alors calculée en appliquant la loi d'Ohm :

$$U = R \cdot I \quad (E4)$$

avec U en volt, R en ohm et I en ampère.

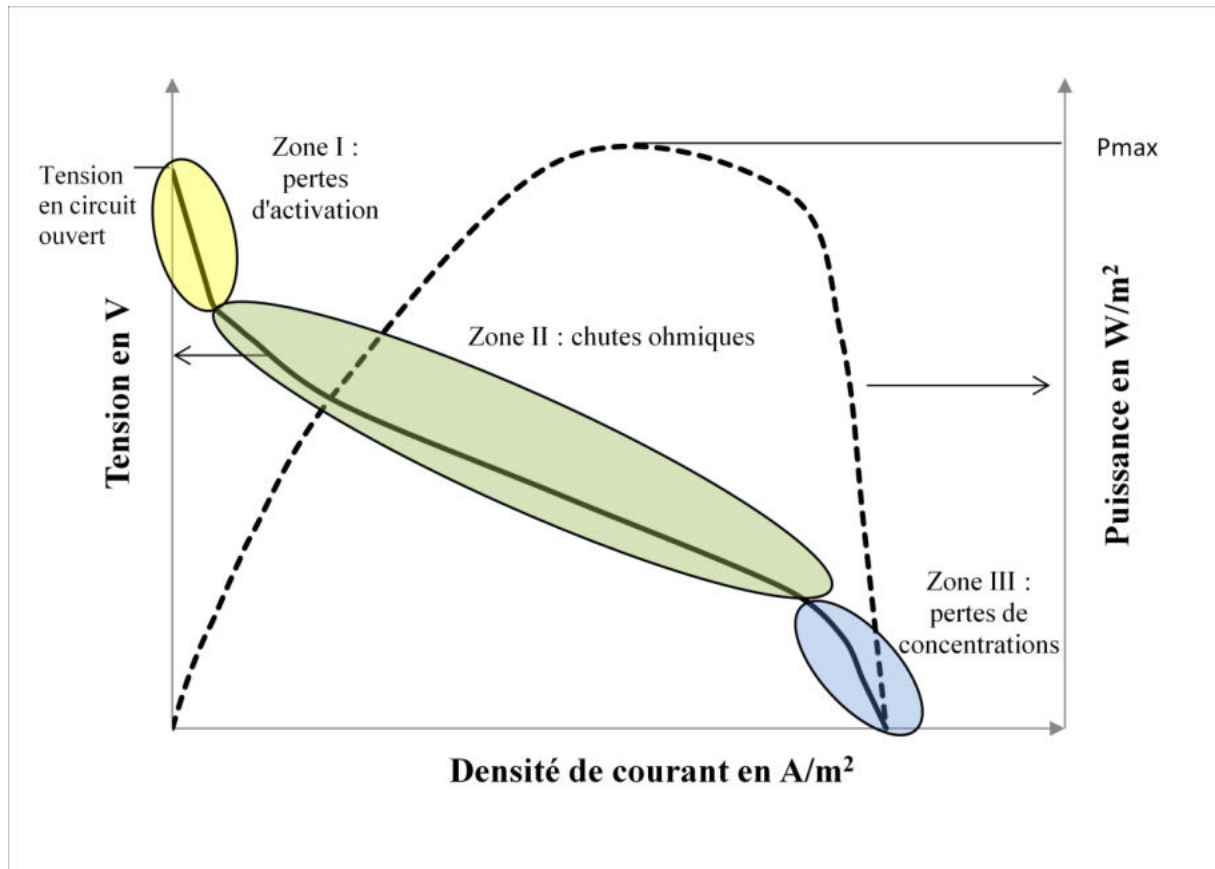


Figure I-9 : Courbes de polarisation et de puissance théoriques d'une PACM.

La courbe de polarisation est divisée en trois zones (figure I-9).

En partant de la tension en circuit ouvert, dans la région des courants très faibles, la tension chute de façon abrupte. Cette chute est essentiellement liée aux pertes d'activation qui résultent de la perte énergétique lors de l'initiation des réactions d'oxydation ou de réduction et lors du transfert électronique entre la cellule bactérienne et la surface anodique. Ces pertes peuvent être réduites en améliorant l'efficacité des catalyseurs utilisés à la cathode ou en améliorant la cinétique des réactions électrochimiques.

Dans la deuxième zone, la tension chute plus lentement et la courbe est linéaire. Dans cette zone, ce sont les pertes ohmiques qui prédominent. Elles sont la conséquence des résistances internes de la pile : circulation des électrons dans le circuit externe et dans les électrodes, circulation des ions dans l'électrolyte et à travers la membrane échangeuse d'ions. Elles peuvent être abaissées en rapprochant les électrodes l'une de l'autre, en augmentant la conductivité de l'électrolyte, en augmentant la conductivité des matériaux d'électrode [66,67].

Dans la troisième zone, au niveau des courants forts, la tension chute de nouveau abruptement jusqu'à la tension de court-circuit. Cette perturbation est liée aux pertes de concentration qui surviennent lorsque le phénomène de diffusion des réactifs électrochimiques est important. Le transport des réactifs vers les électrodes limite alors la production d'électricité. Ces pertes peuvent être limitées par le mélange des flux ou l'installation d'un flux continu dans les compartiments de la PACM.

Le potentiel E_{pile} mesuré de la PACM, équivaut à l'équation suivante qui prend en compte les pertes d'activation et de concentration et $I.R_{\Omega}$, la composante correspondant aux pertes ohmiques du système:

$$E_{pile} = E_{fem} - |\eta_c| - \eta_a - I.R_{\Omega} \quad (E5)$$

avec η_c et η_a étant respectivement la surtension cathodique et la surtension anodique et calculées selon :

$$\eta_{c \text{ ou } a} = E_{c \text{ ou } a}(\text{tension mesurée}) - E_{c \text{ ou } a}(\text{tension en circuit ouvert}) \quad (E6)$$

Une autre courbe caractéristique de la PACM est la courbe de puissance $P = f(I)$, déduite de la courbe de la polarisation par la relation $P = U.I$. Cette courbe permet d'obtenir la puissance maximale P_{max} débitée par la PACM en se plaçant au sommet de la courbe.

L'estimation de la résistance interne R_{int} de la PACM s'obtient de deux façons :

- en calculant la pente dans la région linéaire de la courbe de polarisation,
- en calculant la résistance correspondant à P_{max} à partir de la courbe de puissance, selon : $R_{int} = P/I^2$.

I.2.2. Constituants et design des PACMs actuelles

Actuellement, de nombreux design de PACM existent mettant en jeu à l'anode et à la cathode plusieurs processus électrochimiques en fonction de la nature des électrodes, de la source des bactéries EA, du combustible fourni, de la résistance externe ou encore de la membrane échangeuse d'ions. Dans cette partie, quelques-uns de ces points d'architecture de la PACM seront développés afin d'établir un panorama des piles actuelles : l'inoculum ou source de bactéries, les combustibles utilisés à l'anode comme source de carbone, le matériau des électrodes, la membrane échangeuse d'ions et la géométrie de la PACM.

I.2.2.1. Inocula et combustibles

Les sources de microorganismes destinées à être inoculées dans les PACM sont très diverses. Il peut s'agir de cultures pures ou mixtes de bactéries cultivées en laboratoire comme *Shewanella putrefaciens* ou encore *Geobacter sulfurreducens* [68-72]. De nombreux environnements naturels ou de milieux issus des rejets industriels ou domestiques sont également étudiés pour être des sources de biofilms EA. Ce sont alors des consortia bactériens qui composent les biofilms EA et les mécanismes mis en jeu dépendent de la source. Le plus souvent, les biofilms EA issus de ces milieux ou des cultures bactériennes mixtes permettent d'obtenir des puissances plus importantes que celles obtenues avec les cultures bactériennes pures [73]. En effet, la diversité microbienne permet une variété de mécanismes de transfert électronique, une plus grande adaptabilité aux combustibles et une plus grande stabilité des piles. Parmi ces inocula complexes, les milieux marins et sédimentaires (océan, rivière, lac, marais salant,...) sont les plus anciennement étudiés et sont à l'origine de la découverte des bactéries dissimilatrices du fer III, aujourd'hui connues pour être EA telle que les espèces du genre *Geobacter* [60,74-79]. Les eaux et boues de rejet domestiques et industrielles sont également des inocula particulièrement étudiés avec pour objectif cumulé à la génération de courant, la décontamination d'environnements pollués et le traitement des déchets. Ainsi des biofilms EA ont été formés à partir de microorganismes naturellement présents dans des eaux

usées de station d'épuration ou d'effluents de l'industrie agroalimentaire tels que ceux de brasserie, crèmerie, industrie du sucre, etc...[80-85].

Les combustibles utilisés pour alimenter les PACM en énergie sont eux aussi très variés [86]. En général, les substrats sont choisis selon deux critères :

- Des molécules simples, faciles à dégrader comme l'acétate et permettant la production de densités de puissance importantes ;
- Des molécules plus complexes voire des substrats solides comme la cellulose, les eaux usées dont l'utilisation engendrent des rendements faradiques et des puissances inférieures mais qui permettent d'établir une communauté microbienne EA plus riche et variée.

Les paragraphes suivants listent les combustibles les plus utilisés dans les PACM actuelles, selon les données mises à jour de la revue de Pant et al. de 2010 [86].

L'acétate est le combustible le plus courant dans les études sur les PACM parce que c'est tout d'abord une molécule simple, connue pour être une source de carbone facile à dégrader par les bactéries EA. Une autre raison réside dans le fait que l'acétate est un produit final de dégradation qui n'est pas soumis aux processus de fermentation microbienne et de méthanogénèse à température ambiante. L'inconvénient lié à ce substrat est qu'il ne permet pas de générer des biofilms ayant une communauté microbienne très variée (sélectivité) empêchant ainsi l'utilisation d'une grande variété de substrats.

Les autres acides gras volatils comme le propionate, le butyrate, par exemple sont également fréquemment utilisés. Freguia et al en 2010 démontrent que les acides gras volatils contenus dans des hydrolysats de boue sont dégradables par l'utilisation d'une PACM [87]. Toutefois, ils mettent en évidence des différences de consommation par les microorganismes en fonction des combustibles. Cette découverte est confortée par Catal et al en 2011 qui identifie l'action de ces acides gras issus de la dégradation de monosaccharides comme importante dans la génération du courant [88].

Le glucose, lui aussi, est largement utilisé. Il s'agit d'une molécule dégradée par les processus métaboliques de fermentation et de méthanogénèse, ce qui explique les rendements faradiques et l'efficacité de conversion énergétique faibles, calculés pour les PACM utilisant ce combustible. Toutefois, il permet une diversification des microorganismes constituant les

biofilms anodiques, certainement liée à la variété de sous-produits de fermentation issue de la dégradation du glucose.

La biomasse ligno-cellulosique, qui constitue un combustible très complexe notamment par la nécessité de l'hydrolyser pour qu'il puisse être utilisable par la PACM. Catal et al. en 2008 puis en 2011 démontrent que les monosaccharides généralement obtenus par l'hydrolyse acide de la matière ligno-cellulosique tels que l'acide glucuronique, le glucose ou le xylose sont de très bons candidats pour la génération d'électricité par les PACM [88,89]. En les utilisant purs ou en consortium, il ressort que ces combustibles sont facilement dégradables par des microorganismes adaptés à la consommation d'acétate ou de glucose. Les valeurs de DCO éliminées sont quasi-totales (70 à 95%) alors que les efficacités coulombiques sont faibles (de 10 à 40%). Catal et al. expliquent cette différence par le fait que les acides gras volatiles, produits intermédiaires de la dégradation des monosaccharides participent majoritairement à la génération du courant. Ils font le constat que plus la diversité des molécules apportées au départ est grande, plus la croissance de bactéries non électrigènes est augmentée, entraînant ainsi une forte compétition avec les processus de fermentation et de méthanogénèse.

Les combustibles complexes issus d'environnements naturels ou d'effluents. Par exemple, les eaux usées synthétiques sont intéressantes notamment parce que le pH et la conductivité sont contrôlables (les eaux de rejet issues de brasseries, d'usines d'amidon, d'usines de fabrication de colorants ou encore de décharges) [85,90,91]. Leur sélection s'effectue le plus souvent à partir de leur concentration en matière organique élevée (3000-5000 mg DCO/L) [80,82,92].

Les substrats solides comme la cellulose et la chitine, sont des combustibles encore peu utilisés car ils nécessitent la présence de microorganismes capables de les hydrolyser [93-97].

I.2.2.1. Matériau des électrodes

Le matériau qui constitue l'électrode dans une PACM doit respecter plusieurs critères [8,98] car de son interaction avec le biofilm EA dépend la cinétique du transfert électronique et par conséquent de la performance de l'anode et/ou de la cathode [99]. Le matériau idéal est un bon conducteur électrique, biocompatible, stable chimiquement et résistant à la corrosion. Il possède une faible résistance électrique et une grande surface spécifique. Enfin, il est peu coûteux, facile à produire et à mettre en place. Actuellement, le matériau le plus prometteur et

le plus utilisé dans la conception de bioanodes est le carbone car il réunit toutes ces conditions.

Tableau I-5 : Récapitulatif des géométries d'anodes en carbone ou en graphite utilisées dans les PACM (liste non exhaustive), inspiré et complété à partir de Zhou et al. [98]. N/A indique qu'aucune information n'a été trouvée.

Matériau	Forme	Avantages	Inconvénients	Sources
Carbone /graphite	barre cylindrique de graphite	bonnes conductivité électrique et stabilité chimique, peu cher, facile à utiliser	augmentation de la surface difficile, faible porosité	[99,103,104]
	brosse en fibre de graphite	grande surface spécifique, facile à fabriquer, faible résistance interne	encrassement	[83,105]
	tissu de carbone	porosité relative élevée, 3D	cher	[98]
	Tissu de carbone associé à du graphène	augmentation de la croissance bactérienne, puissance plus importante qu'avec le tissu seul	N/A	[106]
	Granule de graphite	remplissage du compartiment, grande surface spécifique,	N/A	[107]
	papier carbone	facile à connecter	manque de durabilité, fragile	[108,109]
	Feutre de graphite	puissance électrique plus élevée qu'avec le feutre de carbone		[110] [24,104,111]
	feutre de carbone	large ouverture,	forte résistance électrique	[71]
	carbone vitreux réticulé	bonnes conductivité électrique et plasticité	forte résistance électrique, fragile	[112]
	grille de carbone	moins cher que le tissu de carbone, meilleure performance	N/A	[98]
	composite de papier carbone et de feutre de carbone	résistance interne plus faible	N/A	[98]
	nanotubes de carbone (CNT)	grande surface spécifique, rigide, ductile, conductivité et stabilité excellentes	encrassement, fabrication complexe et coûteuse, encore peu commercialisés	[98]
	Nanotubes de carbone/polyaniline	augmentation de la surface spécifique et de la capacité de transfert électronique par les nanotubes, protection des bactéries et augmentation de l'électroactivité catalytique par la polyaniline		[113]
	papier carbone et Sn-Pt/ multi-murs de Nanotubes	les groupes carboxyles à la surface des murs augmentent la réactivité chimique des nanoparticules de métaux		[114]
	papier carbone modifié par composite polypyrrole/nanotubes	meilleures propriétés électrochimiques		[115]
	tissu de carbone/nanotubes	N/A		[116]
	Electrode en carbone poreux avec flux hélicoïdal	la voie de forme hélicoïdale prévue pour le flux dans le matériau permet d'améliorer les puissances électriques	N/A	[101]
	Mousse de carbone/graphite	surface spécifique plus importante	N/A	[24]
	Carbone réticulé vitreux poreux	stabilité et robustesse du biofilm	N/A	[117]

Plusieurs géométries d'anode ont été proposées allant des formes planes aux formes en 3 dimensions. Ces dernières, comme le carbone réticulé vitreux ou les carbones poreux de type mousse, permettent d'obtenir des puissances plus élevées que les géométries 2D ou planes. Avec les derniers progrès dans le domaine des matériaux, l'utilisation des nanomatériaux s'est fortement développée dans les PACM, à travers l'utilisation des nanotubes de carbone (CNT) notamment [100]. En effet, ils favorisent une amélioration du transfert électronique entre biocatalyseurs et surface d'électrode grâce à une conductivité et une surface des électrodes plus importantes. L'architecture des électrodes peut également rendre le transport de matière plus aisé dans le biofilm EA [101]. Les matériaux d'anode ainsi que leur géométrie utilisée dans le cadre des PACM ont été référencés dans le tableau I-5. D'autres matériaux ont été envisagés tels que l'acier inoxydable, le titane, l'or ou encore le platine [102]. Cependant, le coût de ces matériaux et de leur usinage ainsi que leurs faibles performances en tant qu'anode n'ont pas permis un réel développement.

Tableau I-6 : Liste des catalyseurs autres que le platine utilisés pour les cathodes abiotiques dans les PACM, inspiré et complété à partir de Zhou et al. [98]

Catalyseurs	Matériau support	Puissance max. débitée (mW/m ²)	références
CoTMPP	Tissu de carbone	369	[119]
	Feuille de graphite	-	[120]
PbO ₂	Plaque de titane	78	[121]
FePc (phtalocyanine de fer)	Feuille de graphite	-	[120]
β-MnO ₂	Tissu de carbone	-	[122]
Co-OMS-2	Tissu de carbone	180	[123]
MnO _x	Tissu de carbone	161	[124]
Co/Fe/N/C CNT	Tissu de carbone	751	[125]
MnO ₂ -graphène (nano-feuillets)	Acier inoxydable	2083	[126]
Fe-N-G (graphène fonctionnalisé avec du fer et de l'azote)	Papier carbone	1150	[127]
NCNF	Acier inoxydable	190	[128]
(nano-fibres de carbone dopé à MnO ₂ /CNT	Acier inoxydable	2676	[129]
Co (0,1 mg/cm ²)	Tissu de carbone	-	[130]
FeTsPc (tetrasulfophtalocyanine de fer)	Papier carbone	523	[131]

FeTsPc-graphène	Papier carbone	817	[131]
-----------------	----------------	-----	-------

Les biocathodes beaucoup moins étudiées dans la cadre des PACM que les bioanodes voient le nombre de matériaux utilisés à cet usage plus réduit. Le matériau cathodique le plus utilisé est encore le carbone avec les formes suivantes : papier carbone, brosse de feutre de graphite, feutre de graphite, carbone vitreux, graphite en plaque, graphite en granule. On trouve également des biocathodes en acier inoxydable et en nickel [8]. Dans le cas des cathodes abiotiques, d'autres catalyseurs sont utilisés. Le platine, le plus classique, permet de diminuer l'énergie d'activation de la réaction cathodique, le plus souvent la réduction de l'oxygène [118]. Dans les cathodes à air, par exemple, la réduction du dioxygène est directement réalisée par contact avec l'air, grâce à la présence de platine. D'autres cathodes, également grâce à un chargement en platine, accélèrent la cinétique de la réduction du dioxygène dissous dans une solution conductrice.

Afin de réduire le coût de la cathode, élevé à cause de la présence de platine, son chargement tend à diminuer et varie de 2 à 0,1 mg/cm² d'électrode [119]. D'autres stratégies consistent à remplacer le platine par des catalyseurs moins onéreux comme le dioxyde de plomb ou encore des oxydes de manganèse [121,124]. Le tableau I-6 établit la liste des catalyseurs autres que le platine déjà étudiés dans les PACM.

I.2.2.2. Architecture et limitations de la PACM

L'architecture des PACM actuelles se basent sur 4 grands types.

Les piles en forme de H : 2 flacons, servant de compartiments pour les électrodes et les électrolytes, sont reliés par un tube cylindrique dans lequel se trouve un pont salin ou une membrane échangeuse d'ions. C'est le design le plus anciennement utilisé. Dans ce type de PACM, la section dédiée au passage des ions s'avère être limitée.

Les piles à double compartiment : la séparation entre l'anolyte et le catholyte est effectuée par une membrane échangeuse d'ions. Ce type de design est utilisé si la réaction cathodique est abiotique et met en jeu un composé soluble comme le peroxyde d'hydrogène ou le ferricyanure, ou si la réaction cathodique utilise des biocatalyseurs (biocathode). Contrairement aux PACM en H, la séparation entre les 2 compartiments est souvent aussi large que la largeur de la PACM elle-même permettant un transfert ionique plus important.

Toutefois les membranes polymériques échangeuses d'ions entraînent souvent une résistance interne très importante, ce qui limite les performances de la pile.

Les piles à compartiment unique : la cathode est une cathode à air, située à une extrémité de la pile avec une face tournée vers l'air et une face vers l'électrolyte aqueux. L'anode est placée dans l'électrolyte du compartiment ou à l'autre extrémité de la pile. Dans ce type de pile, l'utilisation d'une membrane échangeuse d'ions peut être évitée grâce à l'utilisation de cathode à diffusion gazeuse recouverte de polytetrafluoroéthylène (PTFE) pour limiter la diffusion de l'air dans le compartiment anodique. La membrane échangeuse d'ions peut être remplacée par de simples séparateurs isolants comme des membranes de cellulose, de nylon ou encore des séparateurs en fibre de verre.

Les piles benthiques : l'anode est enfouie dans des sédiments et la cathode est placée dans l'eau surnageante d'un milieu aquatique. Ce type de PACM est souvent très facile à concevoir et a une bonne longévité du fait de l'apport constant en réactif naturellement présent dans le milieu. Ce type de pile fait l'objet d'un paragraphe plus approfondi dans ce chapitre.

Actuellement, de nombreux modèles de PACM ont été développés et il serait fastidieux de tous les recenser. Toutefois, certaines améliorations ont permis de grandes avancées dans les performances des PACM :

Le remplacement de la membrane échangeuse d'ions ou même son retrait complet a permis d'améliorer considérablement les puissances débitées, en réduisant la résistance interne du système. Toutefois, l'utilisation de séparateurs reste privilégiée au retrait complet car le séparateur permet la réduction de la diffusion de l'oxygène dans le compartiment anodique.

La diminution de la distance inter-électrode a également permis de diminuer la résistance interne et donc d'augmenter la puissance débitée par la pile. Pour réduire cette distance, des assemblages de type séparateur-électrode (AES) ou membrane-électrode (AEM) sont utilisés. Une presse permet d'enserrer la membrane ou le séparateur entre l'anode et la cathode. Zhang et al. en 2011 ont pu obtenir jusqu'à $1,55 \text{ kW/m}^3$ en associant l'utilisation d'un matériau d'anode en 3D (brosse en fibre de graphite) avec une faible distance inter-électrode ($< 1 \text{ cm}$) et l'utilisation d'un séparateur en fibres de verre [132] .

L'association de plusieurs entités de PACM en série, en parallèle ou en mixte série-parallèle a permis l'augmentation des tensions et du courant mais également du volume traité. Ainsi, un système de 40 piles tubulaires en série a permis d'obtenir une PACM d'un volume de 10 litres. La tension obtenue était de 23 V et la puissance de 4 W/m³ [133]. Une autre équipe a pu obtenir un volume total de 20 litres et une densité de puissance de 144 W/m³ [134].

I.2.3. Une PACM en particulier : la PACM benthique ou à sédiments

Une PACM en particulier semble plus proche que les autres d'une version commercialisable, il s'agit de la PACM benthique [10]. Son nom lui vient de l'environnement benthique qui est composé par l'interface sédiments/eau du fond des océans, des lacs ou de tout autre environnement aquatique. Toutefois, dans la littérature, d'autres appellations qui mettent en évidence l'inoculum ou le type d'environnement aquatique choisi, telles que les PACM à sédiments, utilisées notamment en laboratoire, ou les PACM marines placées en milieu marin [135,136].

Le principe de la PACM benthique est basé sur celui d'une PACM à 2 compartiments dans laquelle l'interface eau-sédiments se substitue à la membrane échangeuse de protons. En effet, les microorganismes présents dans les sédiments respirent le dioxygène dissous et limitent fortement sa diffusion dans les couches plus profondes. Ils agissent alors comme un véritable filtre à oxygène permettant ainsi l'obtention d'un milieu anaérobie constitué par les sédiments et d'un milieu aérobie, l'eau surnageante [137].

Une anode non corrosive de type graphite [60] est ensevelie dans les sédiments (1 à 5 cm de profondeur, [137]) et est connectée par un circuit électrique à une cathode également non corrosive (type graphite) positionnée dans l'eau surnageante. Les microorganismes benthiques viennent adhérer à la surface de l'anode et commencent à respirer l'électrode. L'accumulation de molécules réduites autour de l'anode provoque alors la diminution du potentiel électrique de l'anode qui se situe généralement entre -0,1V et -0,4V/ESH. La cathode est, elle, située dans un environnement riche en oxygène. Celui-ci confère à la cathode un potentiel électrique plus élevé de l'ordre de 0,4V à 0,8V/ESH. Le dispositif utilise alors la différence de potentiel entre les 2 électrodes qui s'établit naturellement pour extraire de l'énergie électrique. Compte tenu des potentiels extrêmes des électrodes, la tension de

cellule à circuit ouvert théorique maximale est donc de 1,2 V [138], mais dans la pratique, la différence de potentiel entre l'anode et la cathode avoisine les 750 mV [139] en circuit ouvert.

De Schamphelaire et al. en 2008 résument bien les différents mécanismes interactionnels entre les microorganismes benthiques des milieux aquatiques et les électrodes [140]. Comme dans la majorité des PACMs basées sur l'utilisation de milieux naturels et complexes, les mécanismes permettant la génération du courant sont nombreux et combinent réactions abiotiques et microbiennes, transferts électroniques directs et indirects.

La réaction globale est l'oxydation de la matière organique par l'oxygène dissous catalysée par les microorganismes anaérobies des sédiments et à travers l'action des oxydants intermédiaires réduits dans la chaîne respiratoire anaérobie [141].

La puissance durable moyenne disponible est de l'ordre de 10 à 20 mW/m² de surface d'anode avec des maximums de l'ordre de 28 mW/m² et de 104 mA/m² annoncés par Tender et al. en 2002 et Ryckelynck et al. en 2005 [61,136]. Ces résultats ont été obtenus essentiellement en milieux marins où les concentrations en sels sont élevées induisant une forte conductivité ionique.

Plusieurs facteurs sont à l'origine des faibles valeurs de puissance obtenues lors de l'utilisation de ce type de PACMs. Les plus significatifs sont résumés dans le tableau I-7.

Tableau I-7 : facteurs limitants de la PACM benthique et solutions envisagées.

Facteurs limitants	Solutions apportées	P_{max} (mW/m²)	Références
Cinétique lente des réactions anodiques	*ajout de médiateurs autour et dans l'anode (AQDS)	98	[139]
	*ajout de Mn ²⁺ et Ni ²⁺ dans l'anode	105	[139]
	*modification de la température	-	
Transfert des réactifs vers l'anode	*surface spécifique de l'anode plus grande (éponge de carbone)	55	[141]
	*ajout de réactifs dans l'anode (chitine)	75-80	[96]
	*choix d'un environnement riche en réactifs (fonds marins riches en soufre)	1100	[142]
	*conception de chambre benthique autour de l'anode	233-380	[75,138,143,144]

Transfert des réactifs vers la cathode	*cathode rotative	49	[145]
Cinétique des réactions cathodiques	*utilisation d'acier inoxydable connu pour favoriser la réduction de l'O ₂ par les bactéries	23 (car limitation anodique)	[135]

I.2.3.1. Les bactéries EA mises en jeu

La plupart des PACM benthiques en milieu marin ont montré la présence d'au moins 2 types de microorganismes sédimentaires sur l'anode [10,137]:

La famille des *Geobacteraceae* (avec le plus commun *Desulfuromonas acetoxidans*) connue pour proliférer sur la surface de l'anode, oxyder l'acétate et transférer directement les électrons à l'anode [142]. L'acétate pour sa part provient de la fermentation bactérienne de la matière organique de type sucre et cellulose par d'autres microorganismes anaérobiques présents dans les sédiments (par exemple *Clostridium*). Typiquement, les *Geobacteraceae* comptent pour plus de la moitié des microorganismes sur les anodes, alors qu'ils représentent moins de 5 % des communautés identifiées sur les électrodes de contrôle non connectées à une cathode. La deuxième famille est celle des *Desulfobulbus* ou *Desulfucapsa genera* qui oxyde l'élément soufre en ion sulfate, le soufre provenant lui-même de l'oxydation chimique (et donc abiotique) de l'ion sulfure.

Dans les environnements aquatiques à eau douce, on retrouve également des *Geobacteraceae* mais cette fois ce sont les espèces de *Geobacter* qui prédominent [10].

I.2.3.2. Applications de la PACM benthique

L'accumulation de composés organiques dans les sols immergés peut avoir des conséquences négatives sur certains environnements notamment l'asphyxie de la faune et de la flore du milieu, l'augmentation des gaz à effet de serre comme le méthane, le barrage de voies d'eau ou encore la contamination par formation d'hydrocarbures. Les PACM benthiques apparaissent dans ce contexte comme pouvant être un outil de bioremédiation utile, appliqué pour éliminer les composés organiques contaminants ou en trop grand nombre. Ryckelynck et al. en 2005 constatent que les concentrations en ions sulfate diminuent significativement à l'approche de l'anode [136]. Un peu plus récemment encore, Song et al.

en 2010, démontrent que 28% de la matière organique contenue dans les sédiments étudiés ont été dégradés après seulement deux mois d'exploitation [146].

La PACM benthique peut être un outil d'identification des populations microbiennes d'un milieu naturel. En effet, Martins et Peixoto en 2009 l'ont utilisé pour évaluer l'électroactivité de la communauté microbienne des sédiments d'un lac. Par la même occasion, ils ont pu explorer une partie de la diversité microbienne du fond de ce lac [147]. Les techniques utilisées pour y arriver ont été la voltammétrie cyclique et la DGGE (outil de comparaison de populations bactériennes basé sur la séparation sur gel de séquences d'ADN).

En se basant sur le cycle du carbone en milieu marin, Girguis, Nielsen et Figueroa (2010) proposent une estimation de la quantité énergétique annuelle qu'il serait possible de récupérer à partir de 1 % de l'environnement côtier. Ils précisent toutefois que ce modèle ne tient compte ni des limitations liées à l'environnement naturel ni au design actuel des piles benthiques [148]. Cependant cette estimation confirme l'idée que l'application la plus prometteuse et proche d'être commercialisée pour les piles benthiques est celle qui consiste à fournir de la puissance à des dispositifs électroniques tels que les équipements de monitoring positionnés au fond des océans et dans d'autres environnements aquatiques [10].

La mise en œuvre de cette application rencontre encore 2 obstacles majeurs [137,149]:

- La longévité de la production en énergie de ce type de dispositif ;
- Les tensions de sortie encore insuffisantes pour alimenter la plupart des appareils électroniques.

En ce qui concerne la durabilité, pour l'instant, seules des installations en fonds marins se sont avérées pouvoir fournir de la puissance, encore faible, dans le temps. Ainsi la pile benthique de Tender et al. en 2002 a fourni 28 mW/m² pendant plus d'un an et demi [61].

Deux équipes, depuis 2008, se sont attelées à contourner le problème limitant qu'est la tension de sortie de la pile. Donovan et al. ont adapté ce qu'ils ont appelé un « système de gestion de puissance » (Power Management System : PMS) à la sortie de leur pile benthique tandis que Tender et al. ont conçu un « conditionneur de tension » [137,149,150] . Dans les deux cas, un condensateur associé à un comparateur et un convertisseur de tension placés à la sortie de la PACM benthique emmagasine la puissance microbienne fournie par la pile et

alimente un appareil électronique après avoir amplifié la tension de sortie de sorte qu'elle soit suffisante.

I.3. Développement de biofilms EA performants

I.3.1. Méthodologies d'enrichissement du biofilm en bactéries EA

Un autre facteur de performance clé de la PACM, au-delà de son architecture, est le biofilm EA. Plusieurs méthodes d'enrichissement des biofilms en bactéries EA ont été mises au point afin d'obtenir des bioanodes (ou biocathodes) de plus en plus efficaces mais également afin de diminuer les temps de mise en fonctionnement des PACM.

La PACM est un dispositif qui permet non seulement de générer du courant mais aussi de modifier des électrodes par adhésion et enrichissement de biofilms bactériens en espèces EA [151]. Fort de ce constat, des PACM sont construites à partir d'inocula issus de bioanodes de précédentes PACM [108,152]. Les biofilms sont ainsi récupérés sur la surface d'anodes en graphite, puis sont, soit réintroduits sous forme de resuspension liquide dans le réacteur stérile d'une autre PACM, soit étalés directement sur la surface de l'anode propre de la nouvelle PACM. La succession des transferts de biofilms EA anodiques de PACM en PACM permet d'obtenir une conversion de la source de carbone en électricité plus importante et des puissances maximales augmentées.

Depuis 2007, d'autres équipes de chercheurs mettent en avant l'utilisation de la chronoampérométrie à potentiel constant (CPC) pour former des biofilms EA, évaluer leurs performances et pouvoir les comparer rapidement. Cette technique permet à l'aide d'un potentiostat d'imposer un potentiel constant à une électrode. Le choix de ce potentiel ainsi que les réactifs en présence dans le milieu déterminent le comportement électrochimique des bactéries EA.

Dans le cas d'une électrode plongée dans un réacteur électrochimique contenant des bactéries EA capables de dégrader l'acétate pour leur métabolisme, plusieurs cas de figures sont envisagés et repris dans la figure I-10 :

Si du dioxygène est présent dans le milieu, la réaction de transfert électronique vers l'électrode est défavorable (zone bleue, figure I-10). En effet, l'échange électronique entre les bactéries et le dioxygène est énergétiquement plus favorable car la différence de potentiel est dans ce cas la plus élevée.

S'il n'y a pas de O_2 et que le potentiel d'électrode est situé au-dessus du potentiel d'oxydation de l'acétate, la réaction de transfert électronique vers l'électrode est favorable, à condition que d'autres accepteurs d' e^- (par exemple le fumarate dans le cas de la bactérie *Geobacter sulfurreducens*) n'aient pas un potentiel de réduction supérieur à celui de l'électrode (zone rouge, figure I-10).

Si le potentiel de l'électrode est situé en dessous de celui de l'oxydation de l'acétate, le transfert électronique n'est pas possible (zone orange, figure I-10).

Pour que l'électrode soit un donneur d' e^- , il faut au contraire que son potentiel soit au-dessous du potentiel de réduction de l'espèce chimique qui est réduit par les bactéries EA et également que la présence d'autres donneurs d' e^- soit limitée.

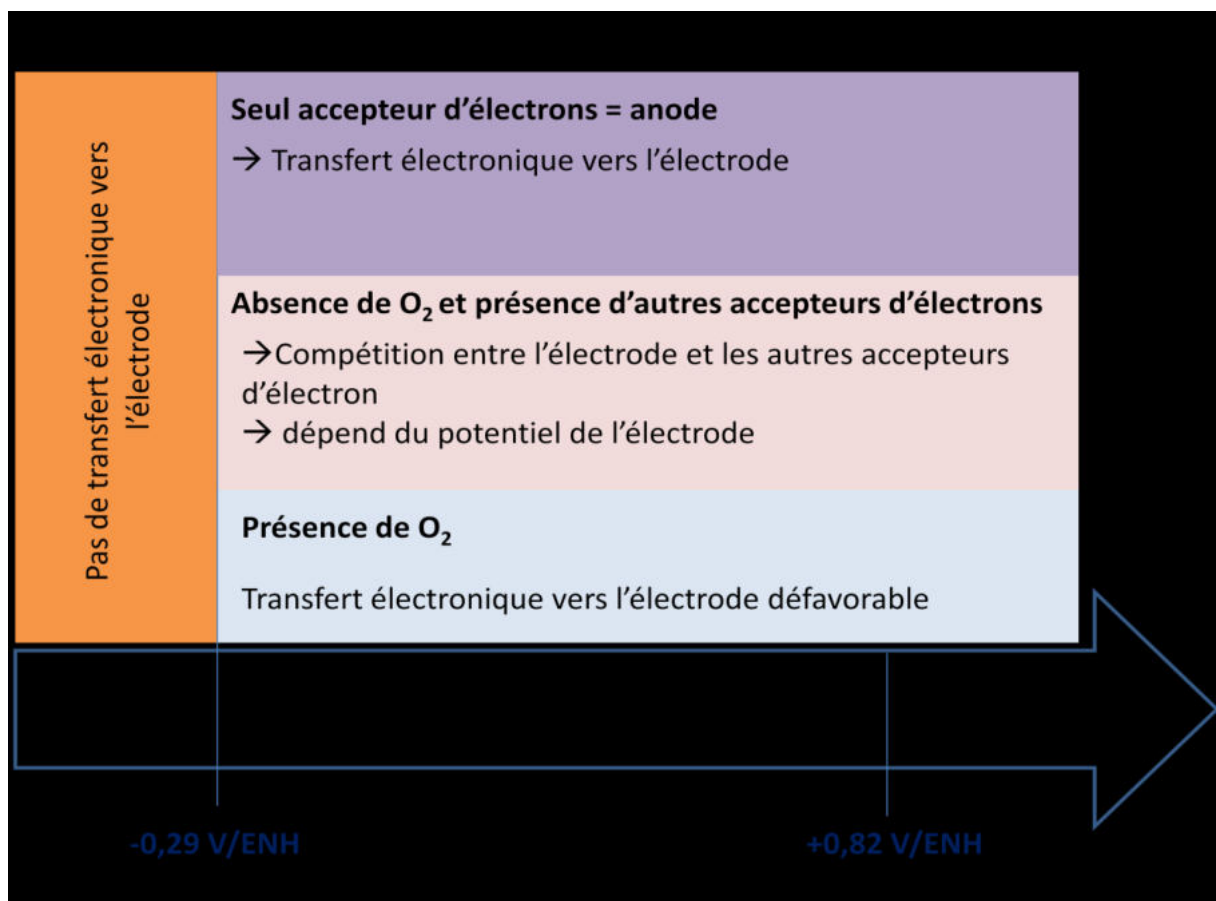


Figure I-10 : Echanges électroniques mis en place par une bactérie EA capable de récupérer des électrons issus de l'oxydation de l'acétate (CH_3COO^-) et une électrode accepteur d'électrons, en fonction du potentiel de cette électrode et des autres accepteurs d'électrons présents dans le réacteur.

Ainsi le projet européen EA-Biofilms 508866 (NEST), par exemple, a permis la publication de plusieurs études scientifiques sur des biofilms EA obtenus par cette méthode

[48,99,153-159]. L'équipe du laboratoire de Génie Chimique à Toulouse notamment, utilise la CPC comme un outil de prospection de nouvelles sources de microorganismes EA. Ils ont mis en évidence la présence de microorganismes EA dans du compost [153,154], dans de l'eau potable [153] ou encore dans des biofilms naturels prélevés sur un ponton [156]. Ils ont également mené des essais à partir d'une culture pure de *Geobacter sulfurreducens* et caractérisé électrochimiquement les biofilms obtenus sur des électrodes polarisées en acier inoxydable ou en graphite [48]. Vandecandelaere et al. de l'université Gent de Belgique, dans le cadre du même projet européen, ont obtenu des biofilms EA à partir d'électrodes d'acier inoxydable polarisées à -0.2 V/Ag/AgCl dans de l'eau de mer naturelle [159].

En 2008, Liu et al améliorent la technique d'enrichissement des électrodes en biofilms EA en proposant une méthode simple et plus rapide [103]. Cette dernière est basée sur un processus de sélections électrochimiques successives par CPC. Un biofilm primaire est formé sur une électrode en graphite polarisée au potentiel de $0,2\text{V/Ag/AgCl}$. L'inoculum est de l'eau usée domestique et le substrat de l'acétate. Une fois le biofilm formé, l'électrode de graphite modifiée (présence du biofilm) est alors introduite dans un réacteur stérile contenant la même solution nutritive à base d'acétate et est connectée en parallèle à une autre électrode en graphite propre. Cette deuxième électrode est elle aussi polarisée à $0,2\text{V/Ag/AgCl}$. Le biofilm secondaire se met en place plus rapidement et permet la génération d'une densité de courant plus importante que le biofilm primaire. En 2010, cette même équipe compare l'activité bio-électrocatalytique de plusieurs biofilms secondaires obtenus sur des supports carbone différents [99]. Les biofilms sont obtenus par polarisation des électrodes à $0,4\text{V/SHE}$. Ils montrent la dépendance qui existe entre la génération du courant et le matériau de l'anode. Ainsi le papier carbone et le voile en fibre de carbone sont de meilleurs supports pour la croissance du biofilm que la barre de graphite et la barre de carbone polycristallin. Une augmentation de 40% de l'activité catalytique est observée dans ce cas.

En 2011, Lefebvre et al. proposent une nouvelle méthodologie pour obtenir un biofilm EA plus efficace à partir d'une PACM [160]. Ils démontrent que diminuer la résistance externe permet d'influer directement sur la résistance interne en l'abaissant. Cette baisse permet de faciliter les échanges électroniques et donc de favoriser le développement d'un biofilm électrochimiquement actif sur l'anode. Ils suggèrent de démarrer les piles dans des conditions de courant maximum, c'est-à-dire avec une résistance externe faible, pendant la période d'enrichissement du biofilm même si les puissances enregistrées sont faibles.

I.4. Milieu sédimentaire en Guyane : la mangrove

L'objet principal de notre étude est l'exploitation des populations bactériennes des boues de milieux humides de la Guyane Française. Un environnement en particulier a retenu notre attention par ses caractéristiques biologiques et physico-chimiques : la mangrove.

La région Guyane est située en Amérique du Sud et partage des frontières avec le Brésil au sud et à l'est et le Surinam à l'Ouest. Elle a une superficie d'environ 90000 km² et est recouverte à plus de 90% par la forêt primaire (forêt tropicale humide). Elle possède également un littoral en bordure de l'océan Atlantique. Plusieurs environnements différents cohabitent en Guyane, la forêt tropicale humide sur plus de la moitié du territoire et dans les terres, les forêts de mangrove dans les estuaires et sur le littoral, les plages, les savanes,...

I.4.1. Origines amazoniennes de la mangrove guyanaise

La mangrove est une forêt tropicale capable de se développer en milieu salé ou saumâtre, sur les bancs de vase du littoral et les rives des fleuves sous l'influence des marées. Cette forêt littorale et amphibie se développe dans la zone de balancement des marées de la ceinture intertropicale.

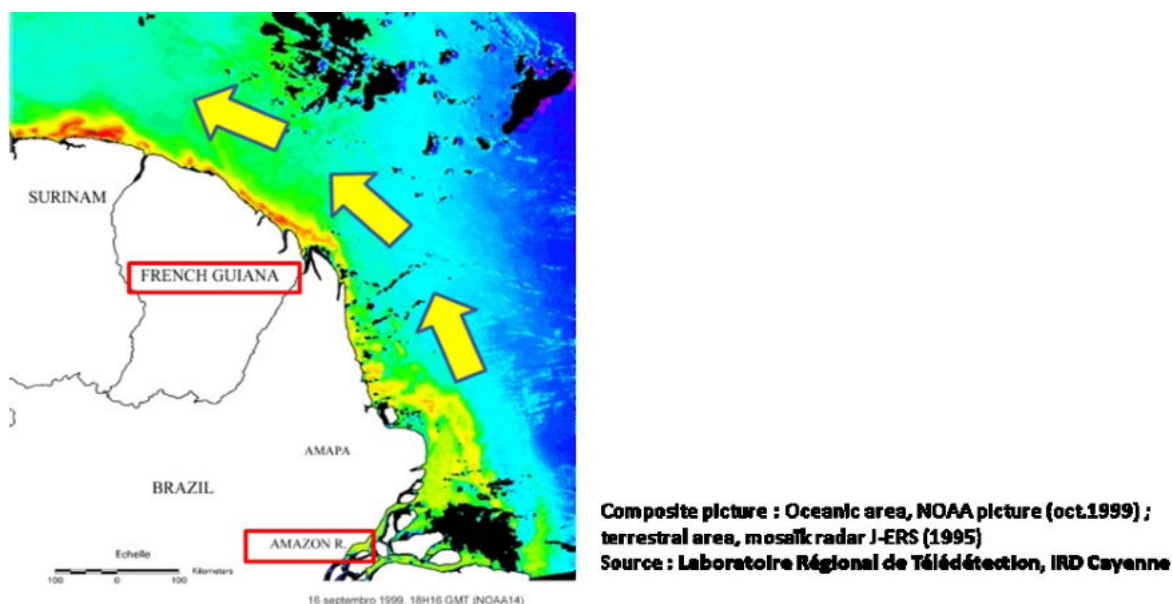


Figure I-11 : image composée à partir de clichés du satellite NOAA et du radar J-ERS présentant le phénomène de dispersion des sédiments amazonien le long des côtes du plateau des trois Guyanes par le courant sud équatorial. Les flèches représentent le sens du courant sud équatorial et des flux de sédiments. Les zones jaunes et rouges illustrent celles riches en sédiments.

Avec 6400 km de long, l'Amazone a un bassin versant qui atteint près de 7 millions de km² et a un débit proche de 200 000 m³ par seconde, soit le cinquième des eaux douces rejetées dans le monde. L'Amazone déverse chaque année 0,6 km³ de sédiments et son panache s'étend jusqu'à 300 km au large et très au nord après son embouchure (figure I-10). En effet, des courants marins, notamment le courant sud équatorial, liés aux alizés font remonter les eaux boueuses déversées par l'Amazone, notamment aux abords des côtes guyanaises situées 400 km plus au nord. Cet épanchement de sédiments a pour conséquence la formation perpétuelle de bancs de vase sur le littoral. Ces zones de vase vont alors devenir le lieu idéal de développement de forêts de mangrove. La présence de la mangrove en Guyane dépend fortement de l'influence du fleuve Amazone au Brésil [161,162].

Dans le monde, les mangroves représentent 200 000 km², soit 5% des terres émergées, environ 0,5% des forêts mondiales et 1% des forêts tropicales. En Guyane, la mangrove couvre la quasi-totalité des quelques 350 km de côte, soit une superficie de 70 000 ha (700 km²) représentant 80% du littoral. Elles occupent donc pratiquement toute la bande côtière ainsi que la partie basse des estuaires. Sa présence est intimement liée au déplacement des bancs de vase, déplacements qui s'expliquent par les apports sédimentaires du fleuve Amazone le long des côtes guyanaises sous l'influence des courants marins et des alizés (300 millions de m³ de sédiments) (figure I-11). Sa répartition n'est donc pas uniforme.

I.4.2. Caractéristiques physico-chimiques du sol de mangrove

La mangrove croît sur un sol vaseux d'apport marin à texture très fine, essentiellement argileux (60 à 70 % d'argile).

La côte guyanaise est marquée par l'un des plus importants phénomènes d'envasement et d'érosion au monde, provoqué par les importants rejets sédimentaires de l'Amazone et la dynamique des courants marins dans cette région. Les sédiments s'accumulent en partie sur le littoral sous forme de bancs de vase mobiles. Ces bancs de vase migrent d'Est en Ouest, entraînés par le courant côtier, si bien que le trait de côte du plateau des Guyanes évolue en permanence [163]. Le déplacement de ces bancs de vase se fait à une vitesse moyenne de 1,4 km/an [164].

Les bancs de vase (le sol de la mangrove) sont périodiquement inondés du fait de la marée. Les sols se retrouvent donc imbibés d'eaux saumâtres et les sédiments de surface ont des salinités variant entre 2 et 50.

Ce sol, a priori impropre à la vie végétale, possède pourtant une flore unique composée essentiellement des arbres palétuviers. Les conditions de concentration en oxygène dans les sédiments de la mangrove en Guyane sont soit suboxiques soit anoxiques. Elles sont suboxiques grâce aux systèmes racinaires des palétuviers *Avicennia germinans* composant les jeunes mangroves, capables de diffuser l'oxygène dans les sédiments. Mais également, dans les mangroves plus âgées, jusqu'à 20 cm de profondeur en saison sèche où la surface superficielle des sédiments est desséchée. En saison des pluies, la présence de l'eau en surface, rend les conditions complètement anaérobies et en profondeur les microorganismes consomment rapidement l'oxygène dissous lors de la dégradation de la matière organique [162].

La mangrove guyanaise, encore peu exploitée aujourd'hui présente une biodiversité importante car elle constitue un refuge face à la pression de chasse sur le littoral, elle a aussi une valeur nourricière, elle est aussi un lieu de vie pour de nombreux crabes dont les terriers jouent un rôle important dans l'aération du sol et l'assimilation de la matière organique [165].

En Guyane, la matière organique sédimentaire des mangroves est un mélange de détritiques provenant de l'Amazonie et de débris végétaux provenant de la mangrove elle-même. Les teneurs en COT mesurés dans les sédiments de subsurface ont indiqué des valeurs comprises entre moins de 3% et 30% environ en fonction de l'âge de la mangrove (de la plus jeune à la plus mature). Il a été montré que la matière organique est décomposée de façon intense dans les mangroves de Guyane grâce à l'activité bactérienne entre autres [162]. Les principaux accepteurs terminaux d'électrons utilisés par les communautés bactériennes présentes dans ces sédiments sont l'oxygène (lorsque les conditions sont suboxiques), ou les oxy-hydroxydes de fer et de manganèse puis les sulfates dans les conditions anoxiques.

Chapitre II. Matériels et méthodes

II.1. Sources de bactéries EA et milieux d'étude

Cinq sites de l'environnement guyanais ont fourni les milieux des études : 2 mangroves d'estuaire, 1 mangrove de littoral, 1 arrière-plage et une crique (figure II-1). Les mangroves d'estuaire étaient celles du Kourou (Kourou) et du Larivot (Cayenne). L'arrière-plage était celle de l'embouchure du Mahury (Cayenne). La mangrove du littoral était celle du lieu-dit Guatemala (Macouria). Le dernier environnement était la crique Gabriel (Roura).

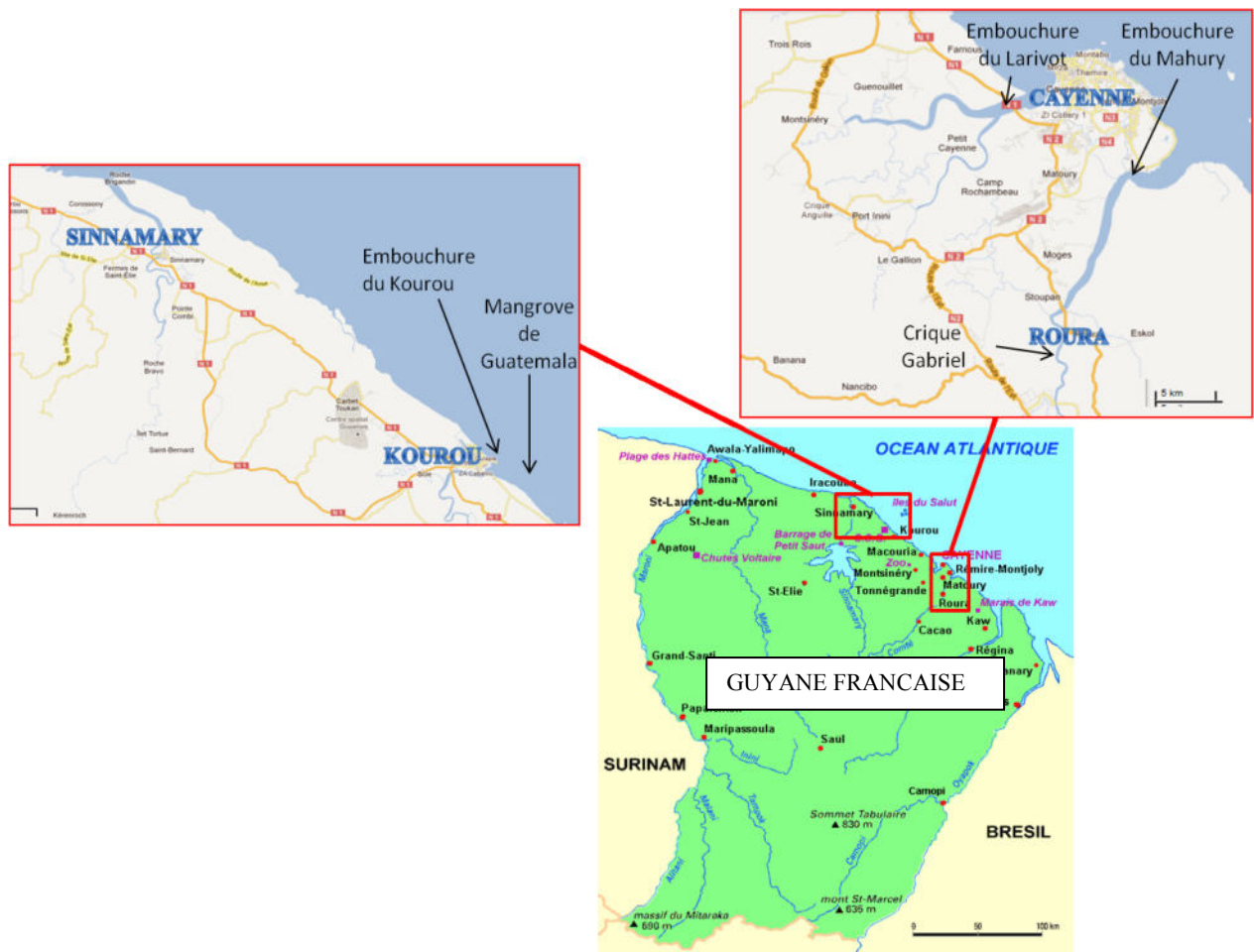


Figure II-1 : Cartographie de la Guyane Française et localisation géographique des sites de prélèvement. Données sources : données cartographiques © 2012 Google – agrandissements des zones.

La boue et parfois l'eau ont été récupérées sur ces différents sites. La boue a été prélevée à l'aide d'une truelle jusqu'à 20 cm de profondeur et immédiatement placée dans des seaux étanches pour être conservée au laboratoire, à 25°C et à l'abri de la lumière, pendant au maximum 2 mois.

Pour être utilisé lors des expériences, un volume de boue est mélangé à de l'eau distillée afin de former un mélange de proportion volumique 1/5 de boue et 4/5 d'eau. Ce

mélange sera, dans la suite du document, appelé le milieu d'étude et le lieu de prélèvement sera également indiqué par son nom. Par exemple, le milieu Guatemala désigne le mélange d'eau distillée et de boue, cette dernière issue de la mangrove Guatemala. Si le milieu a été constitué différemment, par exemple à partir d'eau directement prélevée sur un site, l'information sera apportée dans le texte décrivant l'expérience.

En fonction des expériences, le milieu d'étude a été utilisé tel quel, stérilisé ou filtré. La stérilisation a été effectuée par 2 passages successifs en autoclave de 30 minutes à 121°C et 2 bars. La filtration a été effectuée sur papier absorbant ou sur tissu pour en récupérer le filtrat liquide. Elle a été effectuée une ou plusieurs fois en fonction des manipulations envisagées.

Le pH et la conductivité des milieux ont été mesurés au début et à la fin des études avec un analyseur multi-paramètres portable (HI 9811-5, Hanna Instruments). Pour des conductivités supérieures à 10 mS/cm, un conductimètre de paillasse a été utilisé (EC215, Hanna Instruments).

II.2. Formation des biofilms EA sous polarisation électrochimique

II.2.1. Dispositif expérimental

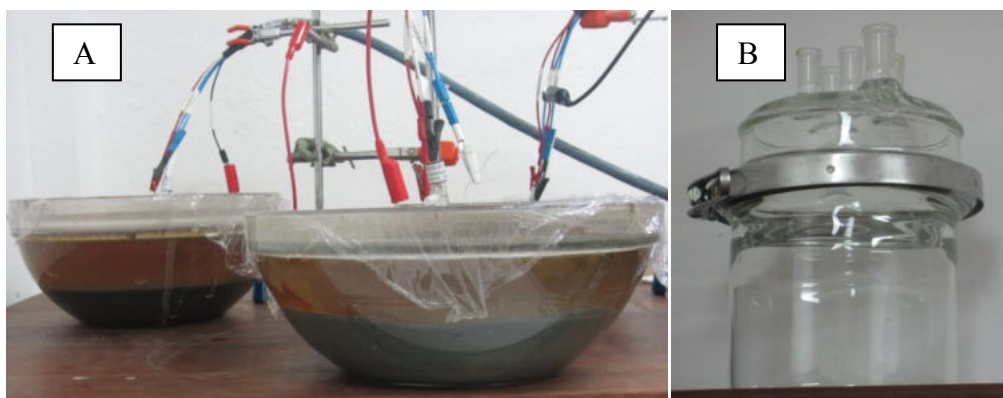


Figure II-2 : Cellules électrochimiques en verre de forme demi-sphérique (A) ou cylindrique (B).

La formation des biofilms EA à partir des milieux d'étude est réalisée dans des cellules électrochimiques, appelées aussi réacteurs. Deux types de cellule sont utilisées : en forme de demi-sphère ou cylindrique (figure II-2). La majorité des études est réalisée dans le premier type de cellule et les formes cylindriques sont réservées pour des expériences avec les milieux

stériles ou utilisant des bullages. Un volume de 2,5 litres de milieu d'étude est utilisé pour remplir les cellules électrochimiques.

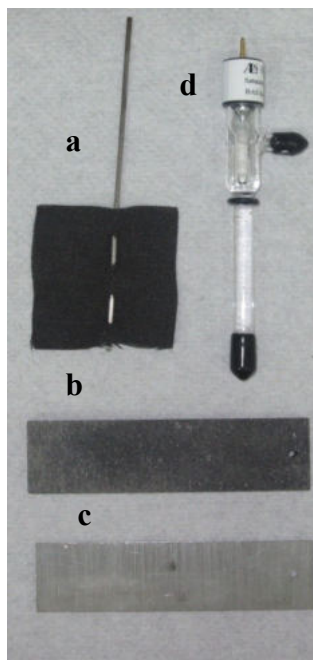
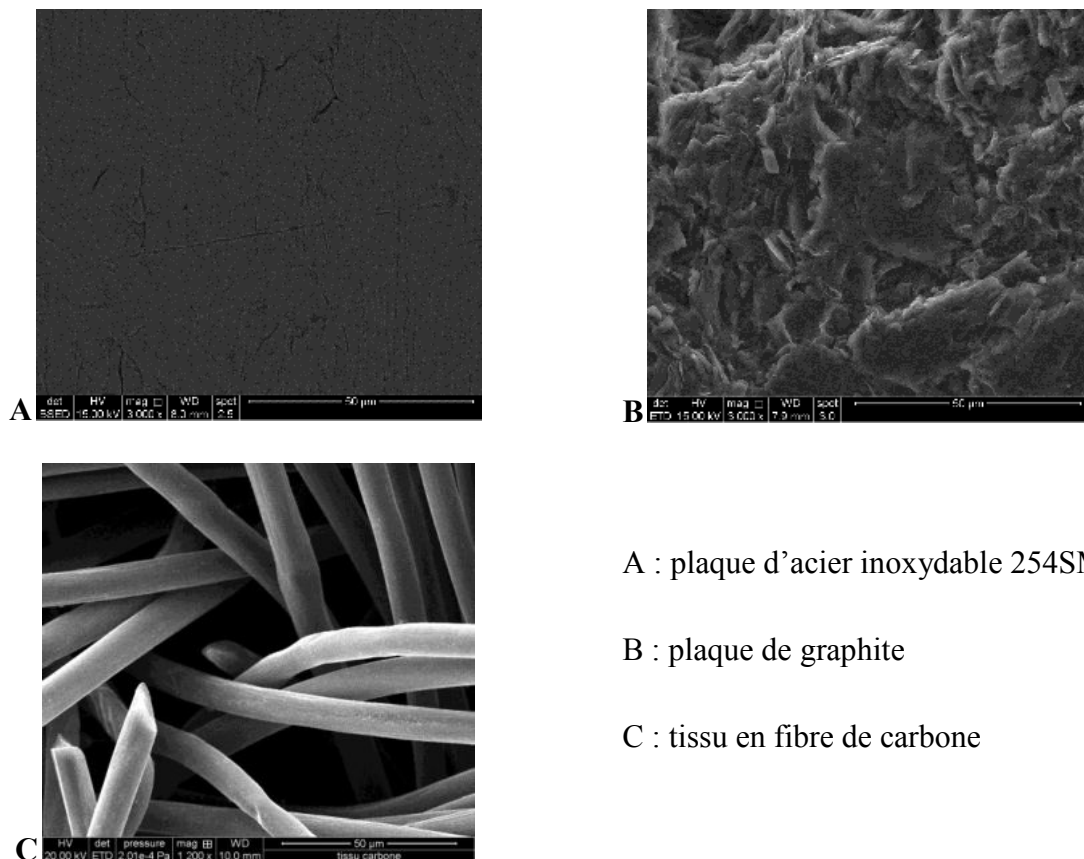


Figure II-3 : Electrodes utilisées dans le système à trois électrodes. Electrodes de travail en tissu de carbone avec tige de connexion en titane (a), en graphite (b) ou en acier inoxydable (c). Electrode de référence au calomel saturé (d).

Des systèmes à trois électrodes, immergées dans les cellules, sont connectés à un potentiostat multivoies (VMP3, Bio-Logic Science Instruments). Ces systèmes permettent l'application de plusieurs techniques électrochimiques via l'utilisation du logiciel EC-Lab (v.10.20, Biologic).

Les électrodes de travail sont des plaques de graphite (80 x 20 x 5 mm, GoodFellow), des lames d'acier inoxydable 254 SMO (80 x 20 x 2 mm³, CEAEA-Saclay) et des échantillons de tissu de carbone (40 x 40 mm², PaxiTech SAS) (figure II-3). Le diamètre des fibres du tissu de carbone est estimé à $9 \mu\text{m} \pm 1 \mu\text{m}$ (mesuré à partir des images MEB). Ces trois matériaux se distinguent par leur nature mais également par leur surface spécifique. En effet, celle du tissu de carbone est beaucoup plus importante que celles des deux autres électrodes (figure II-4).

Les contre-électrodes sont des grilles de platine pré-découpées (Bio-Logic) ou découpées au laboratoire (grille de platine et fil en Pt/Ir 90/10, Heraeus SA), des barres cylindriques de graphite (GoodFellow). Les électrodes de référence sont des électrodes au calomel saturées (RE-2B, Bio-Logic) (figure II-3).



A : plaque d'acier inoxydable 254SMO

B : plaque de graphite

C : tissu en fibre de carbone

Figure II-4 : Photographies MEB des trois matériaux d'électrode utilisés pour former des biofilms EA.

Le protocole de stérilisation du milieu d'étude, utilisé pour obtenir des expériences témoin, est le suivant. Le volume de milieu d'étude est placé dans un ou plusieurs flacons autoclavables (Nalgène). Ces derniers sont placés dans un autoclave et sont chauffés à 121°C et à 2 bars pendant 30 minutes. En parallèle, un réacteur cylindrique en verre est nettoyé avec une solution d'éthanol à 70 % et placé sous atmosphère stérile. Il est fermé par un joint en silicone et un couvercle en verre dans lequel 5 orifices à rodage ont été prévus. Les orifices sont fermés par des bouchons à jupe en silicone, qui permettent le passage hermétique des tiges de connexion des électrodes. Pendant la fermeture, l'électrode de travail et la contre-électrode sont déjà mises en place dans le réacteur. L'électrode de référence est placée dans un bécher contenant une solution éthanolique à 70% afin d'être stérilisée elle-aussi. Le milieu d'étude, une fois autoclavé, est transféré, sous condition stérile, dans le réacteur à l'aide d'un entonnoir introduit dans un des orifices. L'ensemble réacteur/milieu/électrodes est autoclavé pendant 30 min à 121°C et 2 bars. Après refroidissement du milieu, l'électrode de référence qui s'adapte au rodage des orifices, est mise en place, sous atmosphère stérile. Une solution stérile d'acétate de sodium est ajoutée dans le milieu afin d'obtenir la concentration de 10 mM

à l'aide d'une seringue stérile piquée dans un des bouchons en silicone. Le réacteur fermé est prêt à être transféré dans la salle des manipulations électrochimiques.

II.2.2. Formation du biofilm EA en conditions électrochimiques contrôlées

La colonisation de la surface de l'électrode de travail par un biofilm EA est stimulée par l'application d'un potentiel à cette électrode grâce au potentiostat, à travers l'utilisation d'une technique électrochimique : la chronoampérométrie à potentiel constant (CPC). Cette technique, encore appelée coulométrie, permet d'enregistrer la variation du courant qui circule entre une électrode de travail et une électrode auxiliaire lorsqu'un potentiel est appliqué à l'électrode de travail (figure II-5). Par convention, la variation d'un courant positif indique qu'une espèce électroactive subit une oxydation alors que celle d'un courant négatif indique la réduction d'une espèce électroactive. L'aire sous la courbe $I = f(t)$ représente la quantité totale d'électricité (Q) passant à travers l'interface électrode-électrolyte. Cette charge, exprimée en coulomb, est reliée à la quantité d'espèces consommées au cours de l'électrolyse.

Une fois le biofilm EA adhérent à la surface de l'électrode de travail, les électrodes de travail sont appelées électrodes modifiées ou bioélectrodes. L'apparition d'une variation du courant signale le début des échanges électroniques entre le biofilm et l'électrode. Le signe du courant enregistré dépend de la nature des échanges électroniques qu'effectuent le biofilm avec l'électrode. Un courant positif indique que le biofilm fournit des électrons à l'électrode de travail (cas d'une bioanode) alors qu'un courant négatif indique que l'électrode donne des électrons au biofilm (cas d'une biocathode). La variation positive ou négative du courant permet d'évaluer l'intensité des échanges. Les résultats de la chronoampérométrie sont exprimés en densité de courant en fonction du temps. L'intensité du courant mesuré est divisée par la surface projetée de l'électrode de travail c'est-à-dire dans tous les cas divisée par $0,016 \text{ m}^2$. La densité de courant J est ainsi exprimée en A/m^2 .

En fonction des expériences, des substrats sont ajoutés dans les réacteurs. L'acétate est apporté sous forme d'une solution d'acétate de sodium de 1 M pour obtenir des concentrations finales dans le milieu de 10 mM, 20 mM, 30 mM ou 40 mM. L'oxygène est apporté à travers le bullage d'air dans les réacteurs.

Les objectifs du projet ANR Agri-Elec définissaient qu'un biofilm EA efficace ou performant devait être capable de générer plus de 1 A/m^2 dans le cas d'échanges de type

anodique et de plus de $0,5 \text{ A/m}^2$ dans le cas de biofilm d'échanges de type cathodique, en valeur absolue des densités de courant.

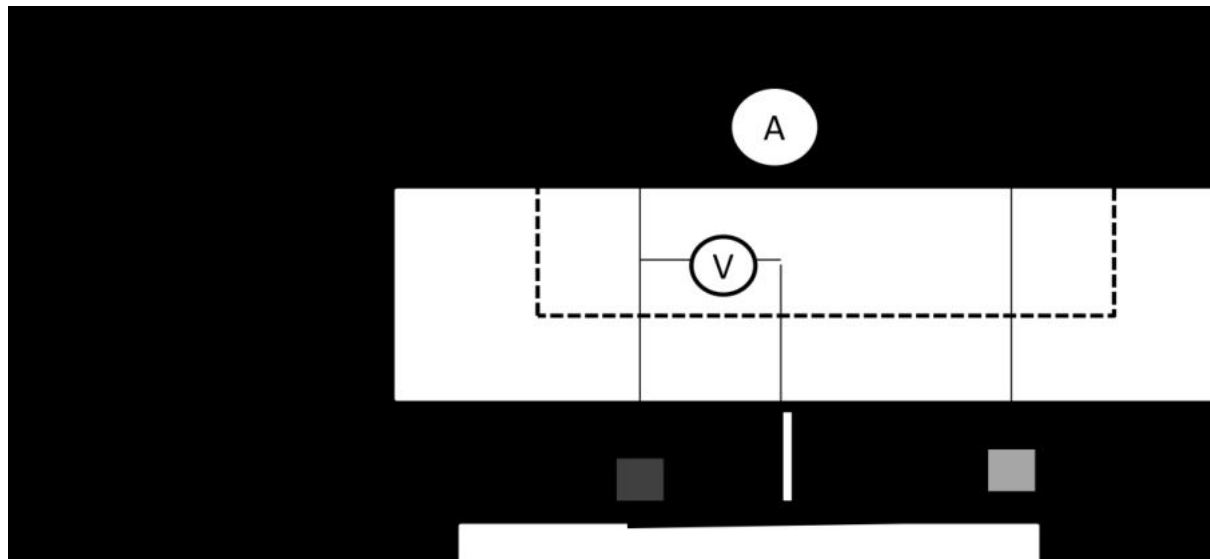


Figure II-5 : Schéma simplifié de la chronoampérométrie à potentiel constant (CPC) appliqué par un potentiostat à un système à trois électrodes. La différence de potentiel est mesurée entre l'électrode de travail et l'électrode de référence et modulée par le potentiostat grâce à un jeu d'amplificateurs opérationnels pour correspondre à la valeur souhaitée. Le courant-réponse est enregistré entre l'électrode de travail et l'électrode auxiliaire.

II.2.3. Caractérisation électrochimique des biofilms EA

La voltammétrie cyclique permet de situer qualitativement les différents processus électrochimiques qui peuvent se produire dans une zone de potentiel. La méthode consiste à imposer à l'électrode de travail, un balayage en potentiel en fonction du temps et à mesurer simultanément l'intensité du courant. La courbe présentant la variation de l'intensité en fonction du potentiel appliqué est appelée voltammogramme. L'allure des voltammogrammes diffèrent en fonction de la nature chimique de l'électrode, la composition de l'électrolyte et le domaine de potentiels explorés. La forme des voltammogrammes donne une vue d'ensemble des processus électrochimiques qui se produisent à l'électrode.

Cette technique est utilisée pour obtenir des signatures électrochimiques des biofilms. Les voltammétries cycliques (VC) sont réalisées à différents instants de la chronoampérométrie, qui est alors arrêtée. Trois cycles de balayage successifs sont appliqués entre les potentiels -1 V et $+1 \text{ V/ECS}$ pour la plus grande gamme ou entre $-0,6$ et $+0,6 \text{ V/ECS}$. Dans quelques cas, le balayage est effectué selon la zone de potentiel encadrant les pics

anodique et cathodique d'une espèce EA. Les vitesses de balayage sont de 100 mV/s, 50 mV/s, 10 mV/s et 3 mV/s.

II.3. Formation de biofilms EA en PACM

Deux dispositifs de PACM sont utilisés au cours de la thèse : une PACM à compartiment unique et une PACM benthique.

II.3.1. PACM à compartiment unique

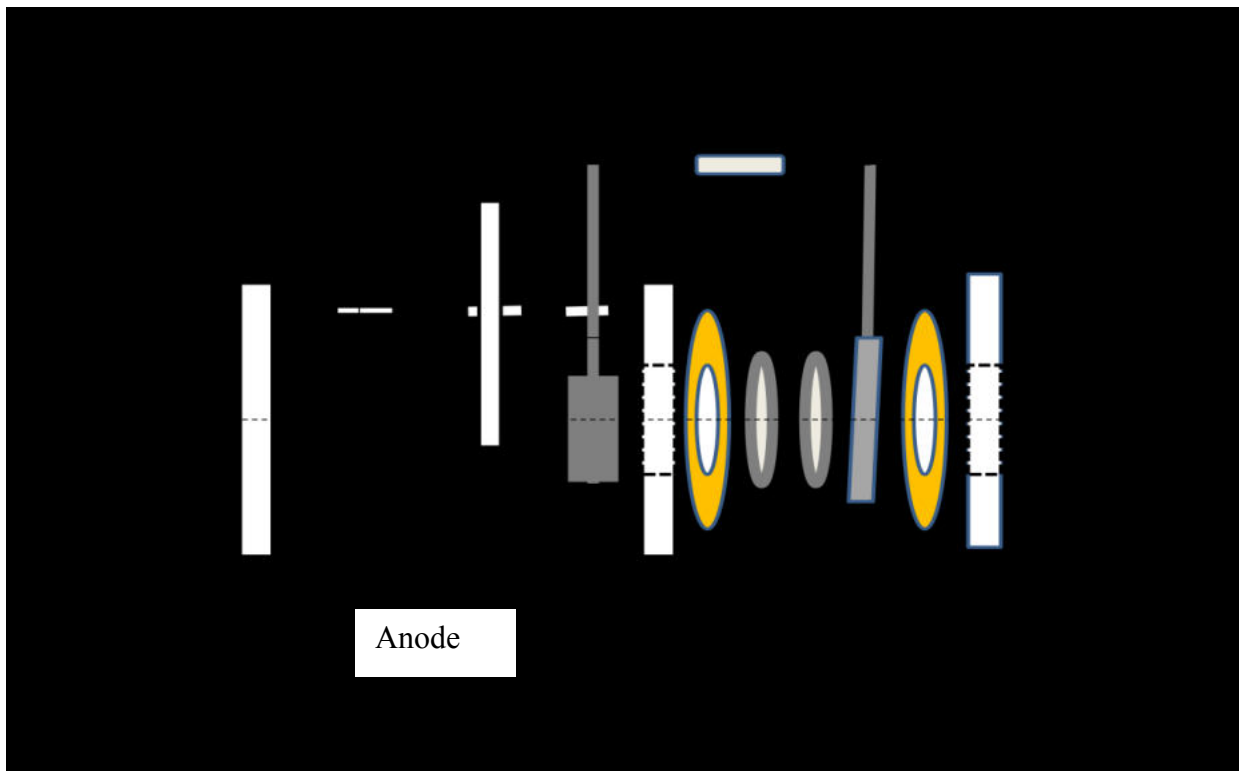


Figure II-6 : Schéma de la PACM à compartiment unique.

Ce dispositif est composé d'un corps cylindrique en verre, fermé et maintenu à l'horizontal (figure II-6 et figure II-7). Le corps est rempli par 350 mL de milieu d'étude et fermé d'un côté par une plaque de plexiglas pleine. L'anode est placée dans le compartiment, à 2 cm de la section opposée qui est fermée par un assemblage de 2 plaques de plexiglas, la membrane et la cathode à air. Les 2 plaques maintiennent en contact la membrane et la cathode à air. Elles sont percées avec un cercle de diamètre 3,2 cm pour permettre le contact entre la membrane et le milieu d'un côté, la cathode et l'air de l'autre. Les joints anti-fuites sont réalisés en silicone.

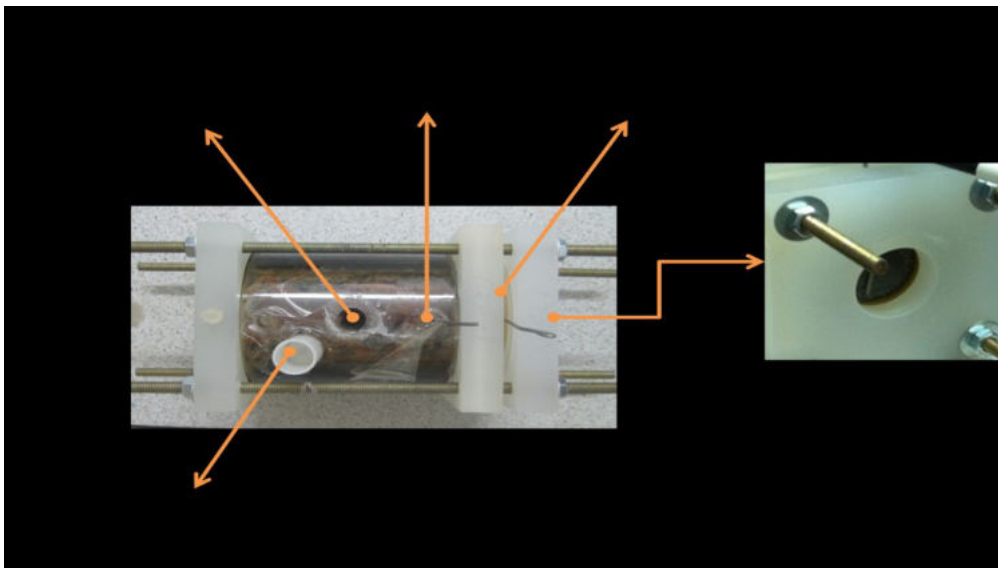


Figure II-7 : Photographie et légende de la PACM à compartiment unique.

Plusieurs essais de PACM sont réalisés avec comme milieu d'étude, celui de la mangrove Guatemala nourri avec de l'acétate. Les anodes sont en tissu de carbone avec une surface de 16 cm^2 (PaxiTech SAS) et la tige de connexion est en titane (GoodFellow). Une électrode de référence au calomel saturée (RE-2B, Biologic SA) est placée dans le compartiment anodique afin de suivre le potentiel anodique au cours du temps. Les membranes sont cationiques en Nafion 117 ou anioniques (membrane PaxiTech SAS).

Les cathodes à air sont en feutre de carbone sur lequel a été chargé un liant à base de Nafion ou de PTFE et une couche catalytique contenant du platine (fabrication par PaxiTech SAS). Les cathodes à air simples ou associées à une membrane échangeuse de protons ont été choisies grâce aux réflexions menées avec la société PaxiTech, notre partenaire dans le projet ANR AgriElec. Son expérience dans les systèmes de PAC et ses connaissances sur les cathodes à air nous ont permis de sélectionner rapidement des cathodes avec des chargements en platine (catalyseur) et en liant, adaptées pour nos études. Le collecteur de courant pour la cathode est une tige de titane ou une grille de titane. Toutes les piles sont connectées électriquement avec une résistance externe de 1000Ω .

II.3.2. PACM benthique

Pour des raisons de compréhension, la description de ce prototype est effectuée lors de la présentation des résultats dans le chapitre V.

II.3.3. Caractérisation électrochimique des PACM

La tension délivrée par la pile U_{pile} est mesurée toutes les 600 secondes avec un potentiostat (VMP-3, Biologic) pour les expériences réalisées en laboratoire ou un multimètre dans le cas des expériences sur le terrain. Si c'est le potentiostat, l'électrode de travail est la cathode et l'anode constitue à la fois l'électrode auxiliaire et l'électrode de référence. Le potentiostat permet également de mesurer le potentiel anodique E_a ou cathodique E_c en connectant l'électrode de travail à l'anode ou la cathode, la référence à l'électrode au calomel saturée et la contre-électrode à l'autre électrode ou à une grille de platine placée dans le compartiment respectif. Le potentiel non mesuré de l'autre électrode est calculé par rapport à l'équation : $U_{pile} = E_c - E_a$.

A différents instants du fonctionnement de la pile, des courbes de polarisation sont réalisées en faisant varier la tension entre les électrodes à l'aide du potentiostat qui mesure la densité du courant généré en réponse par la pile : $J_{pile} = I_{pile} / S_A$, avec I_{pile} le courant en Ampère et S_A étant la surface de l'anode en mètre carré. Le balayage en tension se fait de U_{CO} qui correspond à la tension en circuit ouvert, à U_{CC} la tension de court-circuit. La vitesse de balayage est de 0,05 mV/s. La mesure de E_a ou E_c en parallèle, effectuée par le potentiostat, permet d'obtenir les courbes de polarisation anodique et cathodique des électrodes. A partir de la courbe de polarisation, une courbe de puissance est obtenue en calculant la densité de puissance P en W/m² selon : $P = U_{pile} \times J_{pile}$. La courbe de puissance permet de trouver la puissance maximale P_{max} débitée par la pile à l'instant t de son fonctionnement. La résistance interne de la pile R_{int} est estimée selon deux méthodes.

Dans la première méthode, on considère que la résistance externe R_{ext} correspondant à la puissance maximale P_{max} de la pile équivaut à la résistance interne R_{int} :

$R_{ext} = U_{pile}^2 / P_{max} = R_{int}$, avec U_{pile} et P_{max} qui sont relevés au sommet de la courbe de puissance.

Dans la deuxième méthode, on calcule la pente de la région linéaire de la courbe de polarisation : $R_{int} = \Delta U_{pile} / \Delta I_{pile}$.

II.4. Techniques microscopiques

II.4.1. Microscopie à épifluorescence

La microscopie à épifluorescence est une technique idéale pour observer la colonisation de la surface d'une électrode par un biofilm.

Les biofilms développés sur les électrodes ont été colorés pendant 10 minutes avec :

- de l'acridine orange à 0,01 % (w/v), qui colore les brins d'ADN et d'ARN et les fait fluorescer en vert ou en rouge lorsqu'ils sont soumis aux UV ;

- ou du 4',6 – diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) à 0,01 % (DAPI, 32670, Sigma Aldrich), qui colore uniquement les brins d'ADN.

Puis, les électrodes sont laissées à l'air ambiant dans une pièce obscure jusqu'à ce qu'elles soient sèches. Les électrodes en matériau souple comme le tissu de carbone ont été découpées en plusieurs échantillons qui ont ensuite été placés sur une boîte de Pétri sous des lamelles en verre de 0,10 µm. Les électrodes solides comme les plaques de graphite ou d'acier ont été déposées sans manipulation préalable sur le plateau d'observation du microscope.

Les biofilms marqués et éventuellement échantillonnés sont observés avec une lentille x20 (EC Plan-NEOFLUAR 20x/0.50, Zeiss) sur un microscope Axio Imager M2 (Zeiss) équipé pour l'épifluorescence (jeux de filtres n°49 : BP 445/50-FT395-G365 ou 09 : BP450-490-FT510-LP515, Zeiss) avec une lampe aux halogénures métalliques (HXP 120, Zeiss).

Des coupes précises des échantillons ont pu être obtenues dans le plan z grâce à un système de découpe optique (ApoTome.2, Zeiss) associé une caméra digitale (AxioCam MRm, Zeiss). Un logiciel de traitement d'image a permis de réaliser des images composites de toutes les coupes en z sur un seul plan (AxioVision release 4.2.8, Zeiss).

Les images obtenues sont en noir et blanc. Les tâches blanches indiquent les zones de l'électrode colonisée par les bactéries et le biofilm. Les zones noires correspondent à la surface de l'électrode non colonisée. Des recolorisations ont été effectuées grâce au logiciel de traitement d'images AxioVision release 4.2.8.

II.4.2. Microscopie électronique à balayage

Le L3MA s'est équipé, en novembre 2011, d'un microscope électronique à balayage environnemental : le MEBE Quanta 250 de la compagnie FEI (figure II-8). Le microscope Quanta 250 a permis de réaliser des images des biofilms sur la surface des électrodes et de déterminer leur composition chimique. Ce microscope permet d'imager la surface avec une résolution nanométrique et d'effectuer des micro-analyses chimiques sur tous types d'échantillon. La résolution est de 3 nm et les grossissements peuvent aller de 6x à 10^6 x.

Le microscope Quanta 250 fonctionne selon trois modes de vide :

- Haut vide ($< 1,3 \cdot 10^{-4}$ Pa), adapté aux échantillons conducteurs ;
- Low vacuum ou mode de pression partielle (de 10 à 130 Pa), pour des échantillons isolants sans préparation ;
- Mode Environnemental (de 10 à 2600 Pa), pour des échantillons hydratés et/ou vivants sans préparation.

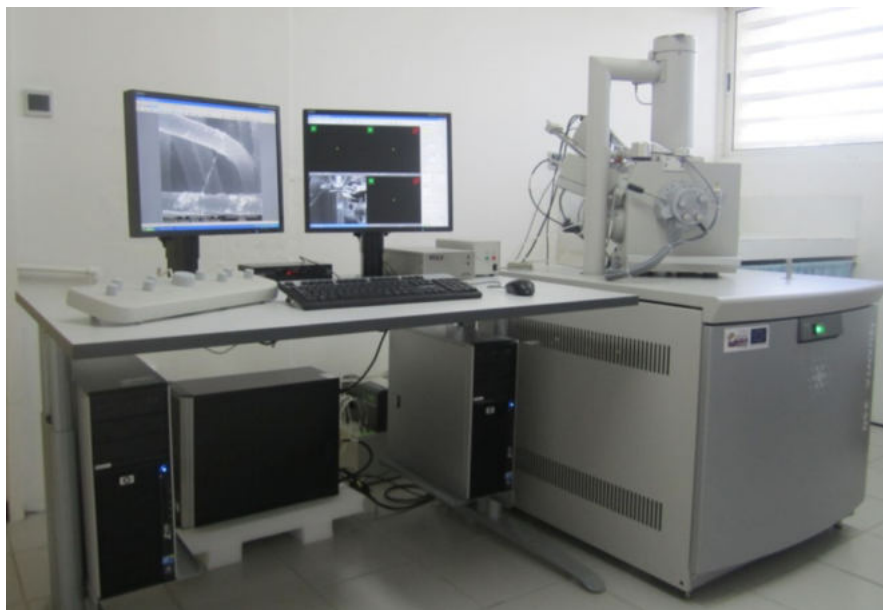


Figure II-8 : photographie du microscope électronique à balayage environnemental du L3MA.

II.4.2.1. Principe physique

La surface de l'échantillon est balayée par un faisceau d'électrons qui va interagir avec la matière. Cette interaction électrons-matière engendre l'émission de particules et de

rayonnements. L'acquisition, par des détecteurs appropriés, des différents signaux émis permet d'étudier la topographie, la microstructure et la composition chimique de la surface.

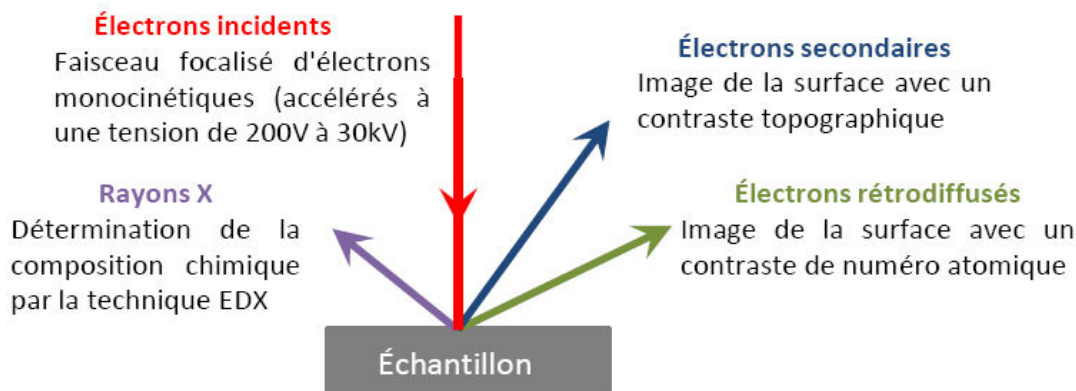


Figure II-9 : Schéma explicatif du principe physique de la microscopie électronique à balayage.

II.4.2.2. Imagerie

Le Quanta 250 dispose de détecteurs (électrons secondaires et électrons rétro-diffusés) dédiés pour chacun des modes de vide, ce qui permet d'obtenir des images avec un contraste topographique et de numéro atomique sur tous type d'échantillons.

II.4.2.2.1. Images d'électrons secondaires

Les électrons secondaires sont émis à partir de la surface du matériau (10 nm) et l'émission est d'autant plus importante que le relief est accentué. La détection des électrons secondaires permet de réaliser des images avec un contraste topographique. Le MEBE du L3MA permet ainsi d'imager la surface avec une résolution nanométrique sur tous les types d'échantillons.

Les détecteurs d'électrons secondaires pour les 3 modes de vide sont Everhart-Thornley (ETD - mode haut vide), Large Field (LFD - mode low vacuum) et Gaseous secondary electron (GSED - mode environnemental).

II.4.2.2.2. Images d'électrons rétro-diffusés

Les électrons rétrodiffusés émis lors de l'interaction électrons-matière sont sensibles au numéro atomique des éléments composant l'échantillon. Ainsi, les éléments légers engendreront l'émission de moins d'électrons rétrodiffusés (ils apparaîtront sombres sur

l'image) que les éléments lourds (qui apparaissent plus clairs à l'image). On peut donc obtenir des images avec un contraste de phases et déterminer le taux de couverture d'une phase sur l'autre.

Les détecteurs d'électrons rétro-diffusés sont Backscattered electron (BSED - mode haut vide et low vacuum) et Gaseous analytical (GAD - mode haut vide, low vacuum et environnemental).

II.4.2.3. Analyse chimique

Pour caractériser la composition chimique, on utilise la technique EDX (Energie Dispersive X-ray) basée sur l'analyse des rayonnements X émis lors de l'interaction électron-matière. Notre système (EDAX GENESIS APEX 2i) avec Détecteur SDD (Silicon Drift Detector) sans azote liquide permet de réaliser des spectres EDX et donc d'effectuer des analyses chimiques qualitative et quantitative. Notre système permet aussi la réalisation de cartographies X (cartographies de la composition chimique) avec une très bonne résolution spatiale.

II.4.2.4. Intérêt du mode environnemental

L'atout majeur du Quanta 250 est qu'il permet l'observation haute résolution dans des conditions dites environnementales avec une pression de gaz dans la chambre pouvant aller jusqu'à 26 mbar. Le mode environnemental permet, grâce à des pressions élevées, de supprimer totalement les effets de charge sur l'échantillon même pour les plus isolants et d'observer des objets hydratés et/ou vivants sans les détériorer. De plus, si on combine ce mode d'observation avec un étage Peltier permettant de refroidir les échantillons entre 0°C et 10°C, il devient possible de visualiser et d'analyser des échantillons dans des conditions d'humidité relative (jusqu'à 100% d'humidité). On choisit un couple température-pression pour déterminer le taux d'humidité de notre échantillon.

Les avantages du mode environnemental sont les suivants :

- Observation d'échantillons non conducteurs (hydratés, vivants, huileux, frais, fragiles, poreux, souillés...) combinés avec l'analyse chimique par EDX ;
- Observation d'échantillons dans leur état naturel ne nécessitant aucune préparation préalable ;

- Observation de façon dynamique des échantillons dans un environnement expérimental donné en termes de pression et de température.

II.5. Techniques d'identification des espèces bactériennes

Les biofilms ayant donné des densités de courant supérieures à 1 A/m² (cas anodiques) ou 0,5 A/m² (cas cathodique) sont envoyés en laboratoire de biologie moléculaire pour y être analysés. D'autres critères ont parfois été le moteur d'une identification des populations bactériennes. Ils seront alors détaillés lors de la présentation des résultats.

L'analyse des populations microbiennes des biofilms EA (extraction de l'ADN, PCR et DGGE) est réalisée à partir des procédures du laboratoire LEMIRE (CEA Cadarrache) sous la direction de Wafa Achouak. Leur principe général est rappelé dans ce chapitre.

Le séquençage permettant l'identification des espèces bactériennes est réalisé au laboratoire EGLAB (UMR ECOFOG Guyane) et au laboratoire Millegen à Toulouse.

Une fois les biofilms formés sur les électrodes par électrochimie et observés par microscopie, l'analyse microbiologique des biofilms EA est effectuée. Après extraction de l'ADN des biofilms présents à la surface des électrodes sélectionnées, une signature microbiologique est obtenue pour le biofilm grâce à l'électrophorèse sur gel en gradient dénaturant (DGGE : denaturing gradient gel electrophoresis). Cette technique permet, associée ou non à une identification des espèces bactériennes par séquençage, de comparer des consortia bactériens de façon fiable et efficace. C'est une technique largement utilisée pour l'analyse de larges populations microbiennes naturelles (sols, eaux,...). Dans le cadre de ces travaux, l'analyse a porté uniquement sur les bactéries du biofilm, par l'étude d'un fragment de l'ADN appartenant au gène codant pour l'ARN 16S. Ce gène, présent chez tous les procaryotes, est très conservé chez les bactéries. Variable au sein des espèces bactériennes, il est reconnu par la communauté internationale pour être une base de comparaison fiable.

Les biofilms formés sur les électrodes sont détachés à l'aide d'un étaleur stérile puis le biofilm est gratté et mis en solution dans une solution saline stérile (20 mL). Pour être lavé, le biofilm en suspension est centrifugé pendant 20 minutes puis resuspendu dans un volume de tampon de détachement plus faible. Le biofilm est ensuite conservé en solution avec 10% de DMSO à -20°C, en attente de l'extraction de l'ADN ou de la mise en culture.

La lyse des cellules bactériennes est la première étape de l'extraction de l'ADN. Elle s'effectue à chaud avec des détergents permettant la dispersion des bicouches lipidiques des membranes dénaturant les protéines. La solution alors obtenue est déprotéinée par une extraction par des solvants organiques (phénol et chloroforme). L'ADN, resté en solution dans la phase aqueuse est récupéré par centrifugation ou décantation, puis précipité par addition d'éthanol ou d'isopropanol associé à de l'acétate de sodium. L'ADN précipité peut être collecté par centrifugation et est remis en solution.

La portion de gène de l'ARN 16S qui nous intéresse est amplifiée grâce à 2 PCR successives, une première d'un fragment de 1500 paires de bases (pb), et une deuxième, nichée, de 500 pb. Cette étape permet d'obtenir une quantité suffisante d'ADN pour être détecté et étudié. L'amplification est réalisée par une succession de réactions : la dénaturation, l'hybridation, l'élongation. Lors de la dénaturation, la rupture des liaisons faibles permet la libération des 2 brins de la double hélice de l'ADN. Au cours de l'hybridation, des amorces spécifiques du gène d'intérêt se lient au brin simple et constituent le point de départ de la synthèse par une enzyme polymérase de nouveaux brins d'ADN lors de l'élongation. Une électrophorèse sur un gel d'agarose permet de contrôler le succès de chaque PCR en faisant migrer les molécules d'ADN et d'ARN en fonction de leur taille. En appliquant un champ électrique dans le gel, les molécules d'ADN chargées négativement, vont se déplacer plus ou moins vite vers le pôle positif en fonction de leur taille et de leur encombrement.

Lors de la DGGE, les brins d'ADN qui mesurent tous 500 pb à l'issue de la PCR nichée, migrent en fonction de leurs séquences nucléotidiques, et plus particulièrement de la dénaturation des brins d'ADN. Le gel utilisé lors de cette électrophorèse est un gel d'acrylamide contenant un gradient de produits dénaturants, l'urée et le formamide. La composition en bases guanine et cytosine opposée à celle en adénine et thionine des brins d'ADN influent sur la vitesse de dénaturation. Plus l'ADN contient de bases guanine et cytosine, plus il résiste à la dénaturation. A l'issue de l'électrophorèse, la révélation de l'ADN, marqué au bromure d'éthidium (BET), par illumination UV met en évidence des bandes qui correspondent chacune à une espèce bactérienne distincte.

A ce stade, une simple comparaison des profils de bandes peut déjà renseigner sur la similarité de la composition de 2 consortia bactériens. Chaque profil DGGE constitue ainsi une signature du biofilm. Toutefois, l'identification des espèces bactériennes peut permettre d'obtenir des informations sur les mécanismes électroactifs des biofilms. Cette corrélation est

possible si les espèces bactériennes ont déjà été cultivées et étudiées. A travers la connaissance de leur rôle dans l'environnement, il est possible d'envisager des mécanismes impliqués dans l'électroactivité. Par exemple, les bactéries du genre *Geobacter* sont connues pour être capables de se fixer sur des surfaces solides et pour échanger des électrons avec ces surfaces.

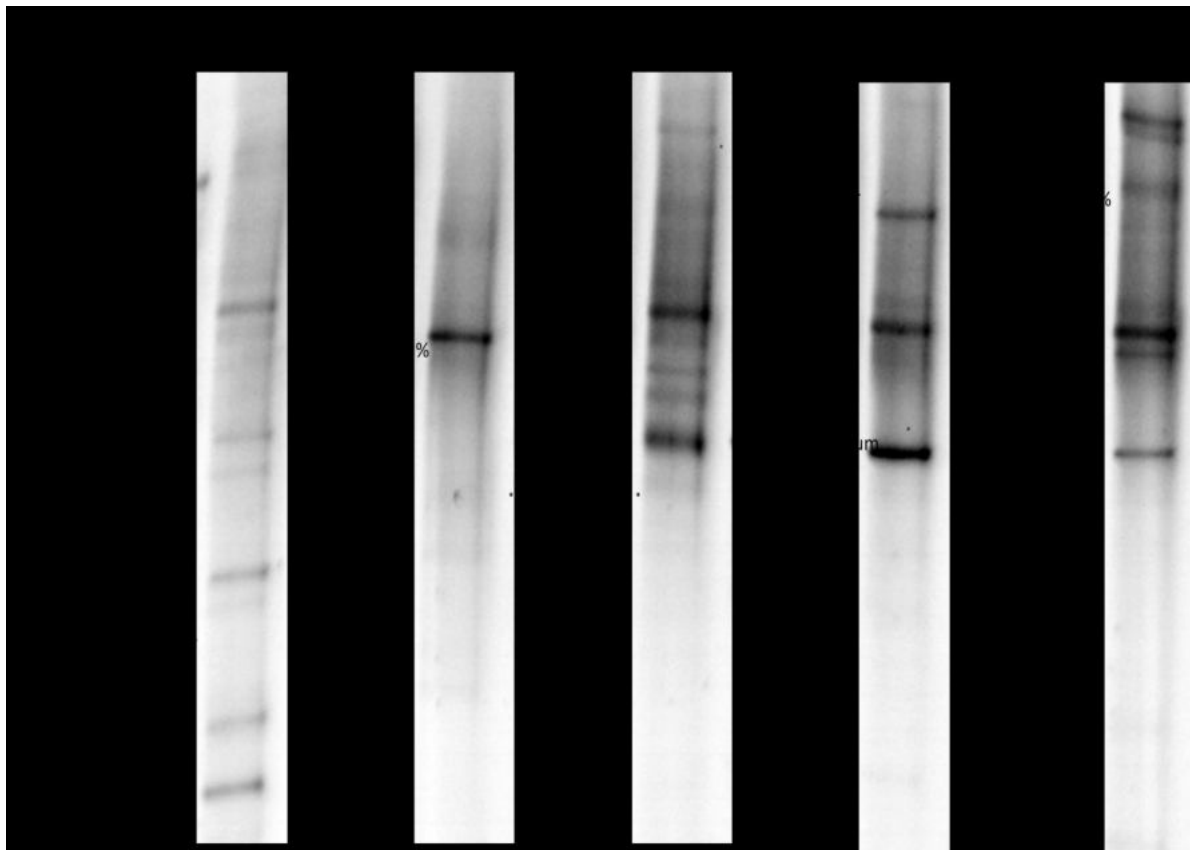


Figure II-10 : exemple de DGGE obtenues lors d'une analyse de 5 biofilms EA issus des milieux Larivot et Guatemala.

Chapitre III. Formation des biofilms électroactifs et recherche des inocula

III.1. Introduction

Depuis les années 2000, le nombre de bactéries identifiées comme étant capables d'électroactivité n'a cessé d'augmenter. Les sources de ces biocatalyseurs sont également très diverses puisqu'elles vont des effluents industriels aux sources naturelles en passant par les rejets domestiques. Cependant, une seule étude pour l'instant a été menée dans une zone de climat équatorial, comme c'est le cas en Guyane [166]. Les travaux préliminaires des laboratoires LGC de Toulouse et du L3MA de Cayenne ont montré qu'il était possible de détecter une activité catalytique issue des microorganismes du sol d'une mangrove en Guyane. Fort de ce résultat, les travaux présentés dans ce chapitre ont pour but d'approfondir et de compléter ces travaux par l'identification de nouvelles sources de biofilms EA issues des milieux humides tropicaux de Guyane.

En général, deux méthodes sont décrites pour détecter l'électroactivité de nouveaux consortia bactériens à partir de milieux naturels :

- L'utilisation d'une cellule électrochimique qui permet le contrôle du potentiel d'une électrode immergée dans le milieu à étudier. Le courant généré entre cette électrode, dite de travail, et une contre-électrode est mesuré au cours du temps (chronoampérométrie). La cellule simule ainsi les conditions d'une demi-pile. L'activité des biofilms EA va déterminer son caractère anodique ou cathodique, respectivement, l'électrode étant un accepteur d'électrons pour le biofilm EA ou un donneur d'électrons. Cette méthode possède un autre avantage qui est d'accélérer la formation du biofilm sur l'électrode [103] ;

- L'utilisation du milieu à étudier en pile à combustible microbienne qui permet la formation du biofilm sur l'électrode grâce à l'établissement spontané d'une différence de potentiel entre l'anode et la cathode. L'évolution peut être suivie grâce à la mesure périodique de la tension de la pile et à sa caractérisation en puissance. Cette méthode présente l'avantage de permettre l'observation du comportement spontané du système électrode/biofilm dans les conditions d'une pile et en fonction de la valeur de la résistance externe. De plus, l'application des biofilms EA dans un montage définitif de PACM est plus facilement prédictible.

Au cours de nos travaux, nous avons testé les deux méthodes. Dans le cadre de ce chapitre, les résultats découlent de la première méthode (en cellule électrochimique) alors que la deuxième méthode (en pile) est décrite dans les chapitres IV et V.

Le choix de contrôler le potentiel de l'électrode a été effectué dans le but de pouvoir comparer plusieurs sources de biocatalyseurs dans les mêmes conditions de surface d'électrode. Il est déterminant de contrôler ce paramètre, qui, comme décrit dans la littérature, joue un rôle très important dans la formation et la composition du biofilm EA [167,168]. De plus, la maîtrise de ce facteur permet de mettre en évidence des comportements métaboliques des biofilms EA différents, en fonction du potentiel imposé. Une meilleure analyse des mécanismes d'oxydo-réduction ayant lieu à la surface des électrodes est ainsi possible.

L'étude chronoampérométrique a été complétée par une définition des biofilms formés, grâce aux signatures électrochimiques (voltammétrie cyclique), physiques (microscopie) et microbiologiques (DGGE). Les résultats décrits ici sont à la fois ceux de la recherche de nouvelles sources de bactéries et ceux de l'optimisation du protocole de détection de ces sources.

Les milieux testés ont été préparés comme cela a été spécifié dans le chapitre II (matériels et méthodes). Les boues des environnements testés ont des concentrations en sel importantes car en contact avec des eaux saumâtres. Cependant, la quantité de sel présente dans ces milieux varie en fonction des saisons et des marées. L'observation de l'influence de la conductivité sur 13 expériences, en milieu Guatemala, à différentes périodes de l'année, a montré une variabilité des résultats de 100 mA/m^2 au maximum, pour des conductivités après dilution variant entre 0,5 et 10 mS/cm. Pour la suite des expériences, nous avons fait le choix de ne pas modifier ce paramètre par des ajouts de sel et de tenir compte des conditions obtenues après la dilution des milieux testés.

III.2. Définition du protocole de recherche des biofilms EA

III.2.1. Influences du potentiel, du substrat et des bactéries

Les premiers travaux ont eu pour objectif d'observer le courant obtenu spontanément lorsque des électrodes de travail en tissu de carbone, polarisées à différents potentiels, sont immergées dans les milieux. Les potentiels d'étude indiqués par rapport à l'électrode au calomel saturée (ECS) sont : -0,4 V ; -0,2 V ; 0,0 V ; +0,2 V ; +0,4 V. Les expériences ont été répétées deux ou trois fois pour chaque potentiel.

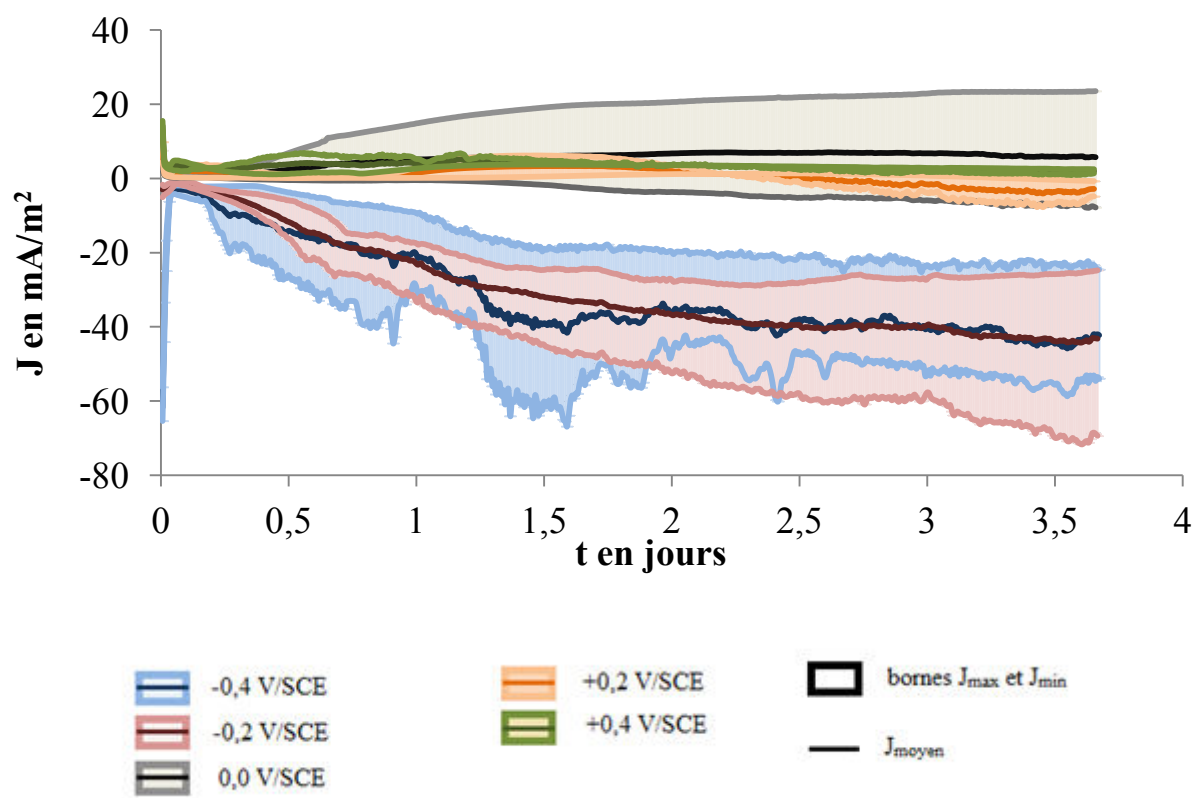


Figure III-1 : Influence du potentiel sur la densité de courant enregistrée pour des électrodes en tissu de carbone immergées dans le milieu Guatemala. Les valeurs moyennes de J correspondent à 2 ou 3 réplicats pour chaque potentiel.

Dans le cas du milieu Guatemala, deux comportements électrochimiques différents apparaissent en fonction du potentiel appliqué (figure III-1). La densité de courant diminue au cours du temps pour les potentiels -0,2 V et -0,4 V alors qu'elle augmente ou reste nulle pour les potentiels supérieurs ou égaux à 0 V. Cette différence s'installe après quelques heures d'exposition au milieu (figure III-2). En effet, la densité de courant initiale moyenne (caractérisée ici par J à 10 minutes) est de l'ordre de -60 mA/m² pour le potentiel -0,4 V et de -2, 4, 7 et 14 mA/m² respectivement pour les valeurs croissantes de potentiel allant de -0,2 à +0,4 V. Après 1 heure d'exposition au milieu, les densités de courant moyennes ne varient plus que de -3 à 3 mA/m², toujours dans l'ordre croissant des valeurs de potentiels. Cette stabilisation des valeurs autour de 0 mA/m² correspondrait à la disparition des réactifs d'une réaction d'oxydo-réduction ayant lieu à la surface des électrodes dans le sens de la réduction à -0,4 et -0,2 V et dans le sens de l'oxydation pour 0 V, +0,2 V et +0,4 V. Par la suite, deux groupes distincts sont de nouveau mis en évidence. Un courant de réduction se met en place pour les potentiels -0,4 et -0,2 V, constituant le premier groupe, et atteint des valeurs de J de l'ordre de -40 mA/m² à 3 jours. A contrario, dans le deuxième groupe, les valeurs de J restent

proches de 0 mA/m² pour 0, +0,2 et +0,4 V. Les réactions alors mises en jeu sont plus lentes que les premières détectées à 10 minutes et peuvent correspondre à la mise en place d'un biofilm bactérien à la surface des électrodes polarisées.

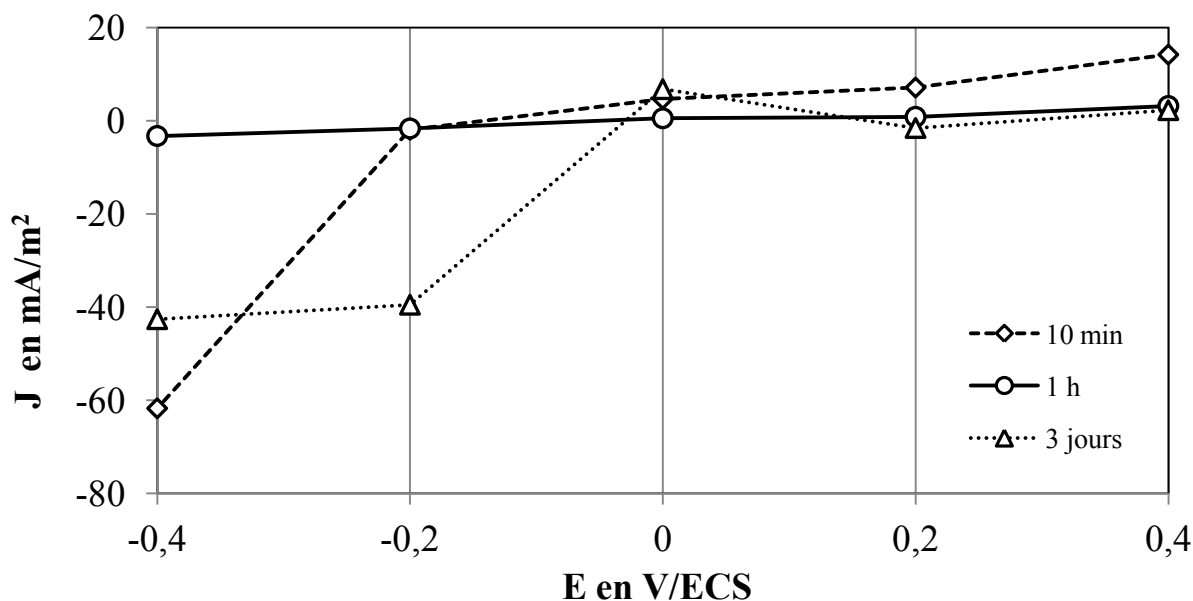


Figure III-2 : Influence du potentiel sur le J_{moyen} après que les électrodes soient restées 10 minutes, 1 heure et 3 jours plongées dans le milieu Guatemala.

Deux hypothèses peuvent expliquer cette différenciation en fonction du potentiel appliqué :

- Les biofilms EA sont de composition différente en fonction du potentiel de l'électrode. Une étude comparant les communautés bactériennes ayant colonisé des anodes de PACM a montré qu'il s'agissait de consortia différents en fonction du potentiel [168]. Les électrodes ayant un faible potentiel (-0,15 V/ESH) étaient colonisées par 92 – 99% de bactéries capables de respirer les anodes (ARB : « anode respiring bacteria ») telle que la *Geobacter sulfurreducens*. Au contraire, les électrodes ayant des potentiels plus élevés (+0,37 V/ESH) présentaient des communautés bactériennes plus diversifiées ;

- Les bactéries EA mises en jeu dans les biofilms adaptent leur métabolisme en fonction du potentiel. Plusieurs études ont montré que des ARB pouvaient établir différents processus de respiration cellulaire en fonction du potentiel de l'anode [167,169,170].

L'ajout de substrats, choisis par rapport à leur potentiel redox respectif et aux connaissances sur leur utilisation par les bactéries, a permis de mieux caractériser les phénomènes mis en jeu.

L'acétate est un substrat fréquemment utilisé pour stimuler l'activité des biofilms adhérents sur les électrodes. Le potentiel redox apparent du couple $\text{CO}_2/\text{acétate}$ (-0,531 V/ECS à pH 7) en fait un donneur d'électrons pour les bactéries.

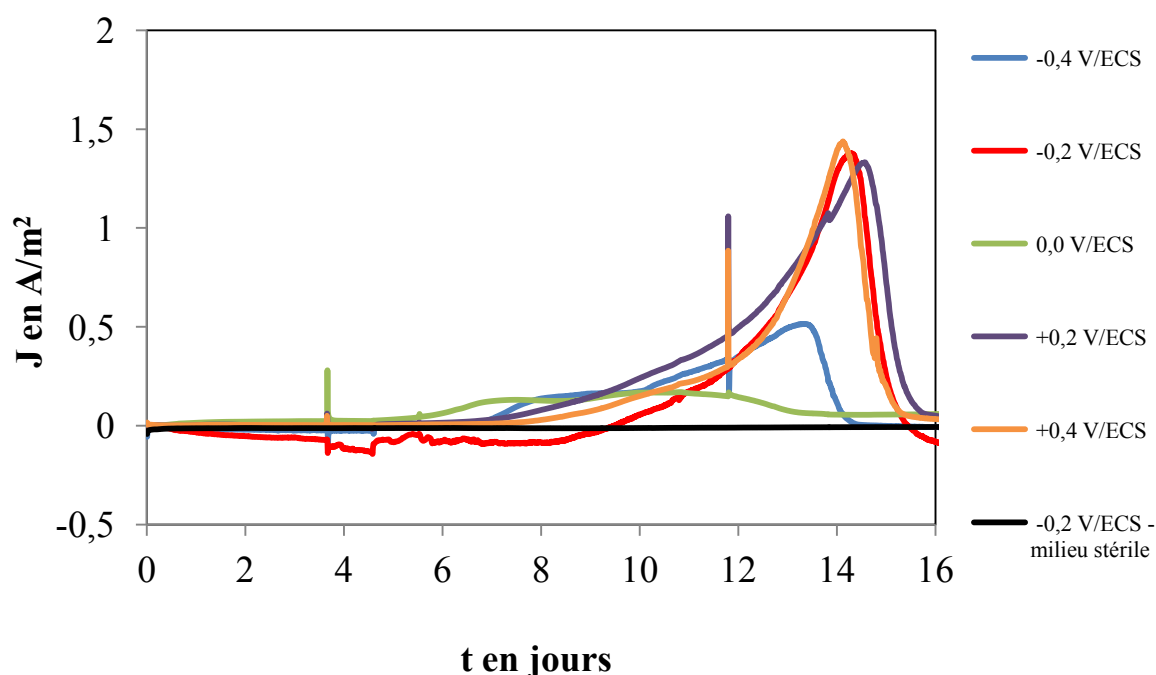


Figure III-3 : Influence de l'ajout d'acétate de sodium dans le milieu Guatemala en fonction du potentiel de l'électrode de travail.

Après l'ajout de 10 mM d'acétate de sodium dans toutes les cellules à 4 jours, une augmentation significative de la densité de courant est observée pour tous les potentiels (figure III-3). Les densités de courant maximales observées oscillent pour cet essai entre 0,2 et 1,5 A/m^2 et la diminution de la densité de courant qui suit indique la consommation de l'acétate. Au contraire, une électrode polarisée à -0,2 V/ECS et immergée dans un milieu préalablement stérilisé par autoclave, ne montre aucune activité électrochimique au cours du temps, malgré l'addition d'acétate (figure III-3). Le courant d'oxydation enregistré est donc lié au substrat ajouté et n'est possible qu'en présence des bactéries. Les électrodes de travail peuvent, quel que soit le potentiel de la gamme sélectionnée ici, être utilisées comme des accepteurs d'électrons par les bactéries lors de la dégradation de l'acétate. Une autre

expérience sur le milieu Larivot avec deux électrodes en graphite, l'une polarisée à $-0,2$ V et l'autre à $+0,2$ V, a montré des résultats similaires. Un ajout d'acétate au temps initial a permis d'obtenir des densités de courant maximales respectives de $0,9$ A/m² à 12 jours et $0,3$ A/m² à 17 jours.

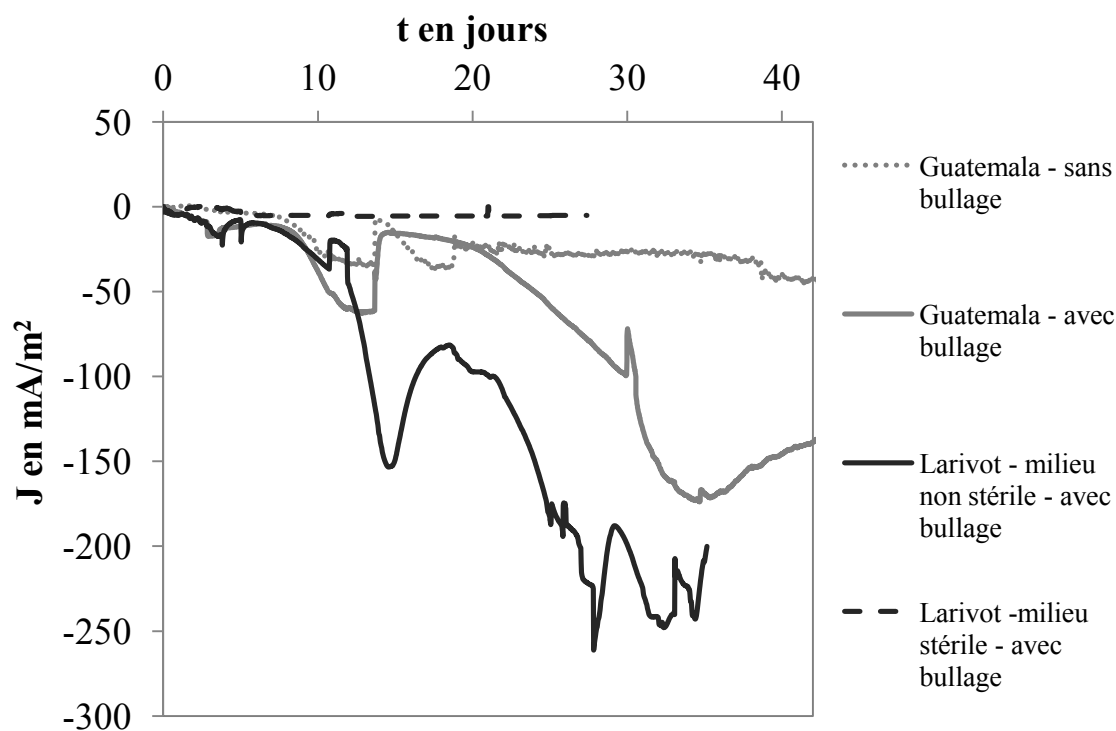
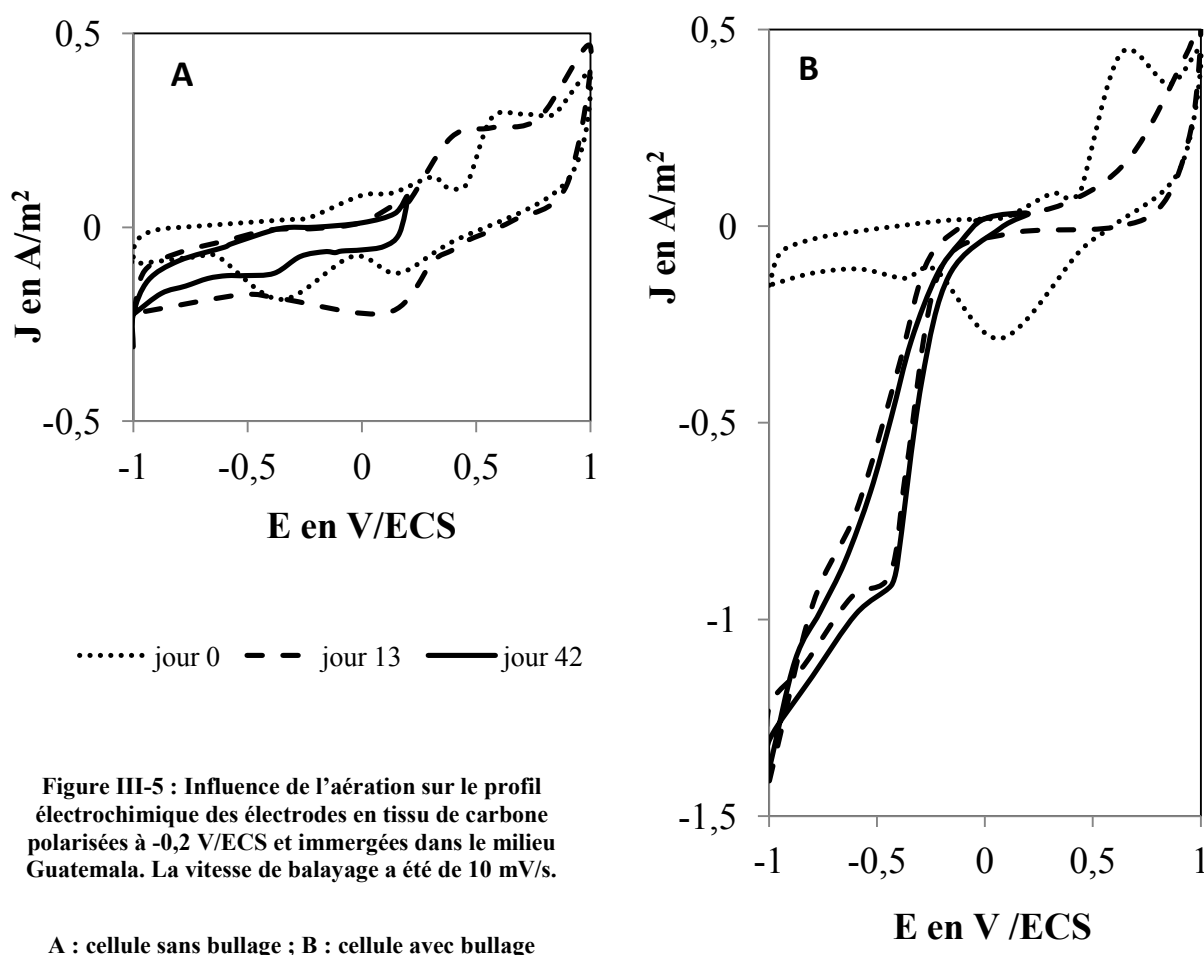


Figure III-4 : Influence de l'oxygène de l'air sur les électrodes à $-0,2$ V/ECS et immergées dans les milieux Guatemala et Larivot.

Les chronoampérogrammes obtenus dans les milieux sans ajout de substrat ont montré qu'un courant de réduction s'installait progressivement pour les électrodes polarisées à $-0,4$ V et $-0,2$ V. Lorsque du dioxygène est apporté à travers l'utilisation d'un bulleur d'air, la valeur de ce courant de réduction est augmentée significativement (figure III-4). Après 33 jours, avec des électrodes en tissu de carbone à $-0,2$ V, la densité de courant est de -166 mA/m² dans le milieu Guatemala aéré contre -28 mA/m² dans le milieu sans bullage. Dans les mêmes conditions, le milieu Larivot permet d'obtenir une densité de courant de -245 mA/m² grâce au bullage. Comme dans le cas de l'acétate, les bactéries sont directement liées à la mise en place du courant enregistré. En effet, le milieu Larivot aéré et préalablement stérilisé affiche un plateau de courant à -5 mA/m² dès les premiers jours.

Lorsque le dioxygène de l'air est le substrat, il se réduit par l'action des bactéries du milieu qui l'utilisent comme accepteur final d'électron. L'électrode est alors un donneur

d'électrons pour ces mêmes bactéries. Ainsi plus il y a d'oxygène disponible et plus l'échange électronique entre l'électrode et les bactéries est important. La voltammétrie cyclique effectuée sur les électrodes immergées en milieu Guatemala avec et sans bullage a permis de confirmer ces observations (figure III-5). Les voltammétries cycliques ont été effectuées à 0 jour, 13 jours et 42 jours. Dans le milieu sans bullage, le profil des voltammogrammes en fonction du temps n'évolue pas de façon significative. Au contraire, dans le cas du réacteur très aéré, le voltammogramme obtenu après 13 jours de polarisation montre un courant catalytique important entre 0 et -0,5 V/ECS. Le pic de réduction observé avec un sommet à -0,43 V/ECS correspondrait à la réduction du dioxygène en eau. Ce pic est toujours présent à 42 jours.



En conclusion, la gamme des potentiels choisis permet de mettre en évidence la présence de bactéries EA dans les milieux étudiés. Lorsque le milieu est stérile et ne contient pas de bactéries, aucune activité électrochimique n'est enregistrée lors de la

chronoampérométrie. Le potentiel influence le comportement électrochimique des bactéries EA du milieu en fonction du substrat présent. En effet, aux potentiels -0,4 V/ECS et -0,2 V/ECS, c'est la réduction du dioxygène qui est spontanément réalisée par les bactéries qui utilisent alors l'électrode comme donneur d'électrons. Cette réduction n'est pas possible aux potentiels supérieurs ou égaux à 0 V/ECS. Dans le cas où de l'acétate est fourni au milieu, l'acétate est alors utilisé comme donneur d'électrons par les bactéries et l'électrode devient alors l'accepteur d'électrons à tous les potentiels de -0,4 V/ECS à +0,4 V/ECS. La présence de bactéries EA capables d'être des catalyseurs de réactions à la fois anodique et cathodique dans un même milieu est une situation peu décrite dans la littérature. Cette particularité est d'un grand intérêt pour une conception future de PACM car le même milieu pourrait être utilisé en anode et en cathode.

De ces premières conclusions découlent également plusieurs questions pour lesquelles des réponses seront apportées dans la suite de ce document :

- Peut-on appliquer cette démarche à tous les milieux sélectionnés ?
- Le transfert électronique avec les électrodes est-il effectué essentiellement par les bactéries d'un biofilm adhérent à leur surface ou par une action commune entre biofilm et bactéries planctoniques ?
- Les bactéries, actrices des échanges électroniques, sont-elles les mêmes quel que soit le substrat combustible ?

III.2.2. Contribution comparée des bactéries du biofilm adhérent à l'électrode et des bactéries planctoniques (milieux enrichis en acétate)

Après avoir établi l'action des bactéries dans la génération du courant, il est important de déterminer comment ces bactéries y participent. La question est de savoir si ce sont les bactéries du biofilm formé sur l'électrode et/ou celles à l'état planctonique dans le milieu qui contribuent à la génération du courant. Des études sur la boue de la crique Gabriel et de la mangrove Guatemala ont permis d'apporter des éléments de réponse à cette question. Les résultats électrochimiques de ces études sont répertoriés sur la figure III-6 et dans le tableau III-1.

Pour tous les essais, une première électrode de travail est immergée dans un milieu initial M1 (ici, Guatemala ou Gabriel) puis polarisée à -0,2 V pendant plusieurs jours. Le chronoampérogramme permet de repérer la mise en place des échanges électroniques entre

l'électrode et les bactéries, par l'apparition d'un pic de densités de courant positives qui suit l'ajout d'acétate dans le milieu, comme vu précédemment. Les électrons échangés proviennent bien de la dégradation de l'acétate, ce qui est confirmé par la reprise du courant après un deuxième ajout du substrat, après que la densité de courant soit revenue à zéro (figure III-6).

Une fois les échanges électroniques mis en place, l'électrode est retirée du milieu M1 et réintroduite dans un autre milieu M2 qui correspond au milieu initial M1 à t_0 . En parallèle, une électrode propre est placée dans le milieu M1 de plusieurs jours dans lequel ont été observés les échanges électroniques. Les deux électrodes, celle propre et celle réintroduite, sont alors polarisées au même potentiel -0,2 V/ECS et la même quantité d'acétate est ajoutée dans les 2 milieux.

Tableau III-1 : Données expérimentales principales reflétant l'influence du biofilm EA adhérent à l'électrode sur la génération du courant. 1 : électrode initiale ; 2 : électrode initiale modifiée dans le nouveau milieu ; 3 : électrode propre introduite dans le milieu initial évolué. * : aucun substrat (acétate) ajouté pendant les 4 premiers jours.

Expérience	Gabriel 1	Gabriel 2	Gabriel 3	Guatemala 1	Guatemala 2	Guatemala 3
Nature électrode	Plaque de graphite			Tissu de carbone		
$J_{(10 \text{ min})}$ en mA/m ²	-184	143	0	-2	227	0
Durée (jours) $J < 0 \text{ mA/m}^2$	0,60 (~14 h)	0	0,78 (~19h)	9*	0	0,03 (50 min)
J_{max} en mA/m ²	Pic 1 : 915 Pic 2 : 1760	554	653	Pic 1 : 1378 Pic 2 : 5071	606	3851
$t_{J_{\text{max}}}$ en jours	Pic 1 : 10 Pic 2 : 19	0.33 (~8h)	3	Pic 1 : 14 Pic 2 : 22	10	2
Rendement faradique en %	Pic 1 : 3 Pic 2 : 4	3	1	Pic 1 : 2 Pic 2 : 6	5	4
Profil du pic	Plateau + pic	plateau	pic	pic	Pseudo-plateau	pic

Dès les premières heures de l'étude, on observe une différence de comportement entre les deux électrodes. Dans le cas de l'électrode réintroduite, la densité de courant initiale est non nulle et est égale à 230 mA/m². A contrario, avec l'électrode propre, la densité de courant initiale est de 0 mA/m² (tableau III-1). Ces résultats démontrent que la génération de courant est directement liée à l'électrode et donc à un biofilm EA adhérent à sa surface. L'électrode

réintroduite est immédiatement capable de récolter les électrons provenant de la dégradation de l'acétate dans le nouveau milieu. Il ne peut s'agir d'électrons stockés provenant du précédent milieu puisque la précaution avait été prise de retirer l'électrode lorsque la génération de courant était revenue à 0 et donc lorsque tout l'acétate avait été consommé.

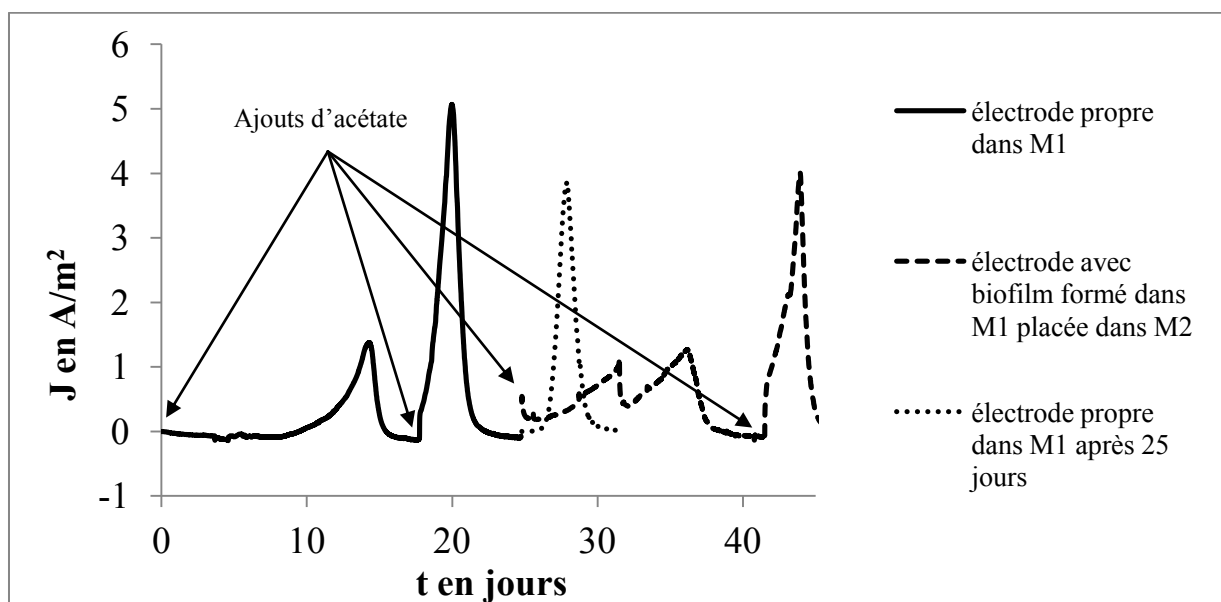


Figure III-6 : Influence du biofilm EA adhérent à l'électrode de travail dans le cas du milieu Guatemala.

Toutefois, après 50 minutes, un biofilm EA se forme sur l'électrode propre comme l'indique le pic de densité de courant sur le chronoampérogramme (figure III-6). La formation de ce biofilm est beaucoup plus rapide que le biofilm précédent. Cette accélération est liée à la présence multipliée des bactéries EA capables de dégrader l'acétate dans le milieu « initial » de plusieurs jours.

D'autres observations importantes ressortent de ces expériences. En comparant les densités de courant maximales obtenues de l'électrode propre et de celle réintroduite, on remarque que la densité est plus élevée dans le cas de l'électrode propre (tableau III-1). L'écart est plus important dans le cas du milieu Guatemala pour lequel l'électrode était en tissu de carbone. De plus, l'allure des pics est différente avec des pics plus fins obtenus avec les électrodes propres et plus étalés dans le cas des électrodes réintroduites. Ces observations permettent de conclure que le milieu initial de plusieurs jours, enrichi en acétate et en bactéries, contient les éléments nécessaires à la colonisation des électrodes par un biofilm EA, certainement similaire en composition et en pouvoir catalytique au premier biofilm. Les bactéries à l'état planctonique dans le milieu, grâce à leur croissance et à leur adaptation au

substrat, constituent alors un vivier de bactéries EA permettant la colonisation de plusieurs électrodes. Les mécanismes de dégradation de l'acétate ainsi que les transferts électroniques sont alors plus rapides.

En outre, le biofilm primaire placé dans le milieu M2 ne retrouve pas immédiatement ses performances maximales en densité de courant. Cependant des rendements faradiques similaires indiquent que la quantité d'électrons échangée reste sensiblement la même (voir tableau III-I : rendement du pic 2 du milieu 1 et du pic du milieu 2). Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cette perte de performance. Dans un premier temps, le milieu initial, après une vingtaine de jours en présence d'une électrode polarisée et plusieurs ajouts d'acétate, a évolué en conduisant à une sélectivité auprès des microorganismes ainsi que leur multiplication. Des conditions physico-chimiques et microbiologiques propices au fonctionnement du biofilm EA se sont développées. Ces conditions ne se retrouvent pas dans le deuxième milieu initial lors de l'introduction du biofilm préformé sur son électrode.

D'autre part, les mécanismes d'échange électronique engagés par les bactéries des biofilms ne sont pas connus. Une combinaison entre des transferts électroniques directs et indirects est probable. Ainsi, les biofilms développés seraient capables de transférer directement leurs électrons à la surface des électrodes mais également d'utiliser des médiateurs endogènes ou des métabolites secondaires voire d'autres bactéries pour transférer les électrons. Ces différents éléments sont certainement absents ou en quantité insuffisante dans le nouveau milieu. Dans ce cas, le courant enregistré correspondrait essentiellement à celui engendré par les bactéries EA utilisant le transfert électronique direct.

III.2.3. Application aux environnements et optimisation du protocole

III.2.3.1. Comparaison de 5 milieux d'étude et limitations du protocole

Après avoir établi le lien entre les bactéries et la génération de courant mesurée pendant les chronoampérogrammes, cinq sites de prélèvement sont étudiés en tant que source de bactéries EA (Guatemala, Kourou, Larivot, Mahury et Gabriel). Le protocole appliqué consiste à préparer des milieux à partir des boues des divers sites (crique, mangrove littorale, mangrove d'estuaire,...). De l'acétate de sodium (10 mM dans le milieu), est ajouté dans les milieux d'étude à t_0 . Des électrodes en graphite sont polarisées à potentiel -0,2 V/ECS et le courant a été suivi en fonction du temps. A partir de ce protocole, il s'avère que tous les milieux sélectionnés présentent les caractéristiques d'un inoculum potentiel. En effet, les pics

de densité de courant après ajout d'acétate sont observés après des temps de latence variables entre 1 à 3 jours (figure III-7). L'allure des courbes montre quelques différences, notamment pour les maximums enregistrés à des dates différentes et à des intensités différentes. Mais dans tous les cas, le transfert électronique vers l'électrode dure entre 13 et 15 jours, certainement parce que la même quantité d'acétate est présente au départ de l'expérience. Le rendement faradique moyen est de 2%.

Tous ces résultats montrent qu'il est possible de détecter une électroactivité dans plusieurs communautés bactériennes de sol à partir du protocole mis en place.

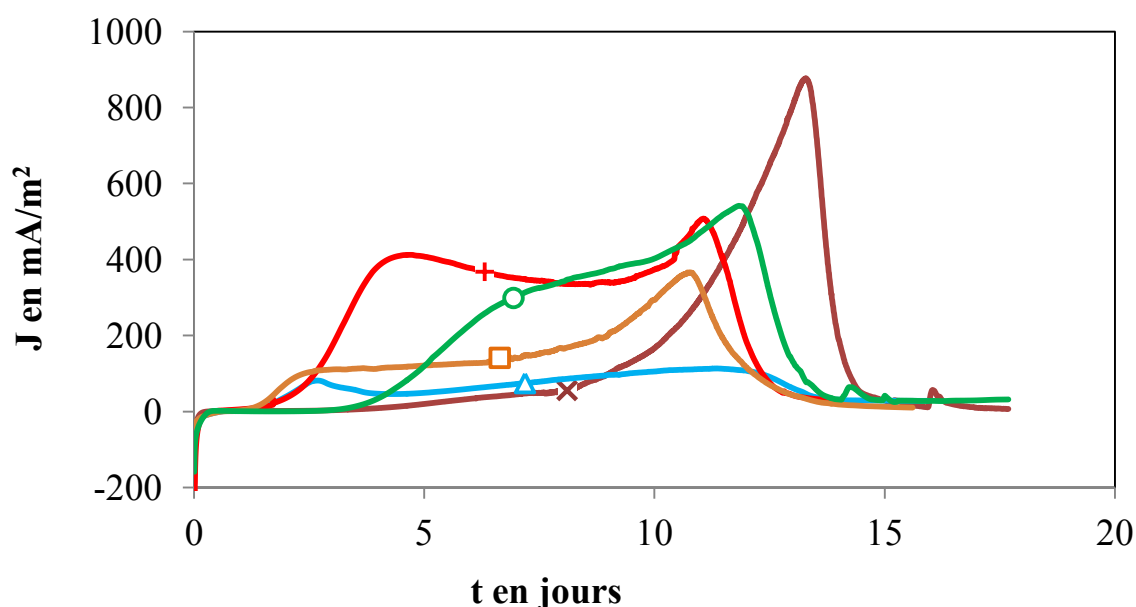


Figure III-7 : influence du milieu sur la génération du courant lorsque les électrodes de travail sont en graphite et polarisées à -0,2 V/ECS. Δ : Guatemala ; + : Kourou ; □ Gabriel ; ○ : Mahury ; × : Larivot.

Les performances obtenues à partir des 5 milieux testés posent plusieurs questions. Les communautés bactériennes mises en jeu et les mécanismes de transfert électronique sont-ils les mêmes d'un milieu à l'autre ? S'agit-il des performances maximales possibles, et si non quels sont les facteurs limitants : surfaces des électrodes, présence d'autres accepteurs d'électrons, volume réactionnel trop important favorisant d'autres réactions,...

III.2.3.2. Optimisation du protocole et augmentation des performances

III.2.3.2.1. Influence du matériau et de la surface de l'électrode de travail

Trois natures d'électrode de travail sont comparées au cours des essais : plaque de graphite, plaque d'acier inoxydable de 254 SMO et tissu de carbone (figure III-8). Dans tous

les cas : la surface projetée est de 16 cm², le milieu est celui de Guatemala, le potentiel imposé est de -0,2V/ECS et des ajouts de 10 mM d'acétate sont effectués dans le milieu.

Le courant obtenu avec l'électrode de travail en tissu est 13 fois plus grand que celui obtenu avec le graphite et 6,5 fois plus grand que celui avec l'acier (tableau III-2 & figure III-8). L'augmentation des performances s'observe également avec le calcul des rendements faradiques. La quantité de charges récupérées par unité de temps est plus importante avec le tissu de carbone. Cette amélioration des performances peut s'expliquer par la plus grande surface spécifique offerte par le tissu de carbone (chapitre II, matériels et méthodes).

Tableau III-2 : Principaux résultats illustrant l'influence du matériau sur la génération du courant.

Matériau d'électrode	Graphite	Acier inox 254 SMO	Tissu de carbone
Courant maximal en mA	0,2	0,4	2,6
Rendement faradique en %	1,0	2,1	4,6

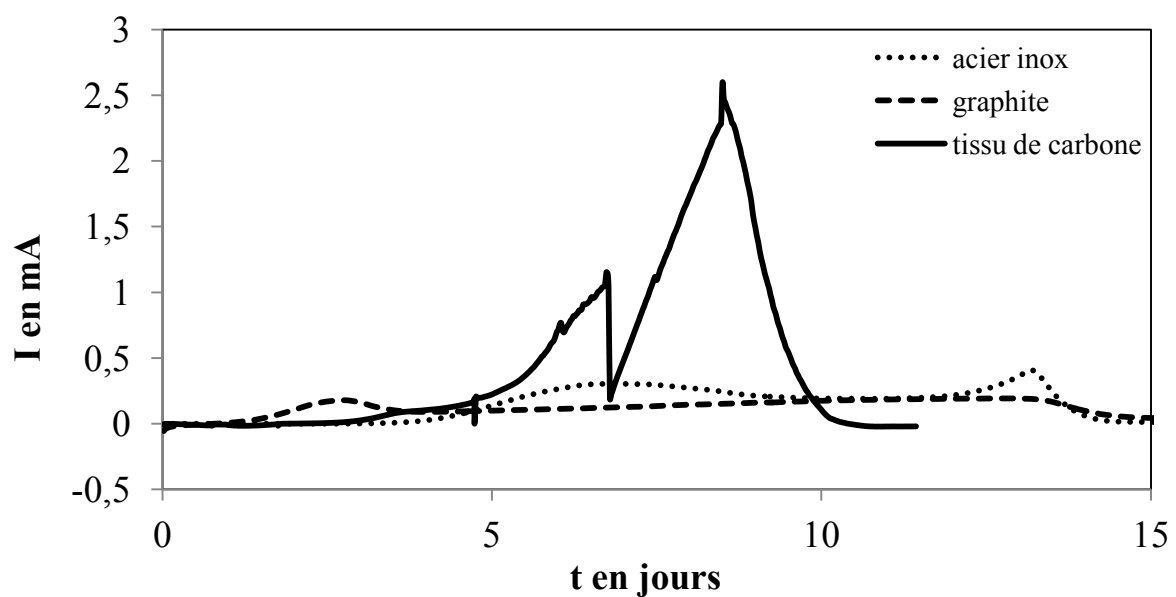


Figure III-8 : Influence du matériau de l'électrode de travail sur le courant généré à partir du milieu Guatemala.

Des observations effectuées au cours du temps avec un microscope à épifluorescence sur les électrodes de travail en acier inox montrent la colonisation de la surface par le biofilm (figure III-9). Après un jour d'immersion dans le milieu, les sillons du matériau sont encore visibles et seules quelques bactéries (points blancs) sont présentes. Après 4 jours d'immersion, des agrégats dont le centre est fortement lumineux sont apparus à divers

endroits de l'électrode. Une observation avec un grossissement plus important (x40) a permis de visualiser la composition de ces agrégats (figure III-10). De nombreuses bactéries sont présentes autour et en-dessous d'une substance qui apparaît sur les photos, transparente et blanchâtre. Cette substance, qui diffuse la fluorescence provenant des bactéries, est probablement la matrice d'exopolymères que sécrètent ces dernières lors de la maturation du biofilm. Après 10 et 17 jours d'immersion, le biofilm sur les électrodes s'étend très sensiblement pour couvrir la totalité de la surface (100% de taux de couverture). Contrairement à 4 jours, il est difficile de distinguer les bactéries dans le biofilm. L'ensemble du biofilm fluoresce et présente une surface à fort relief.

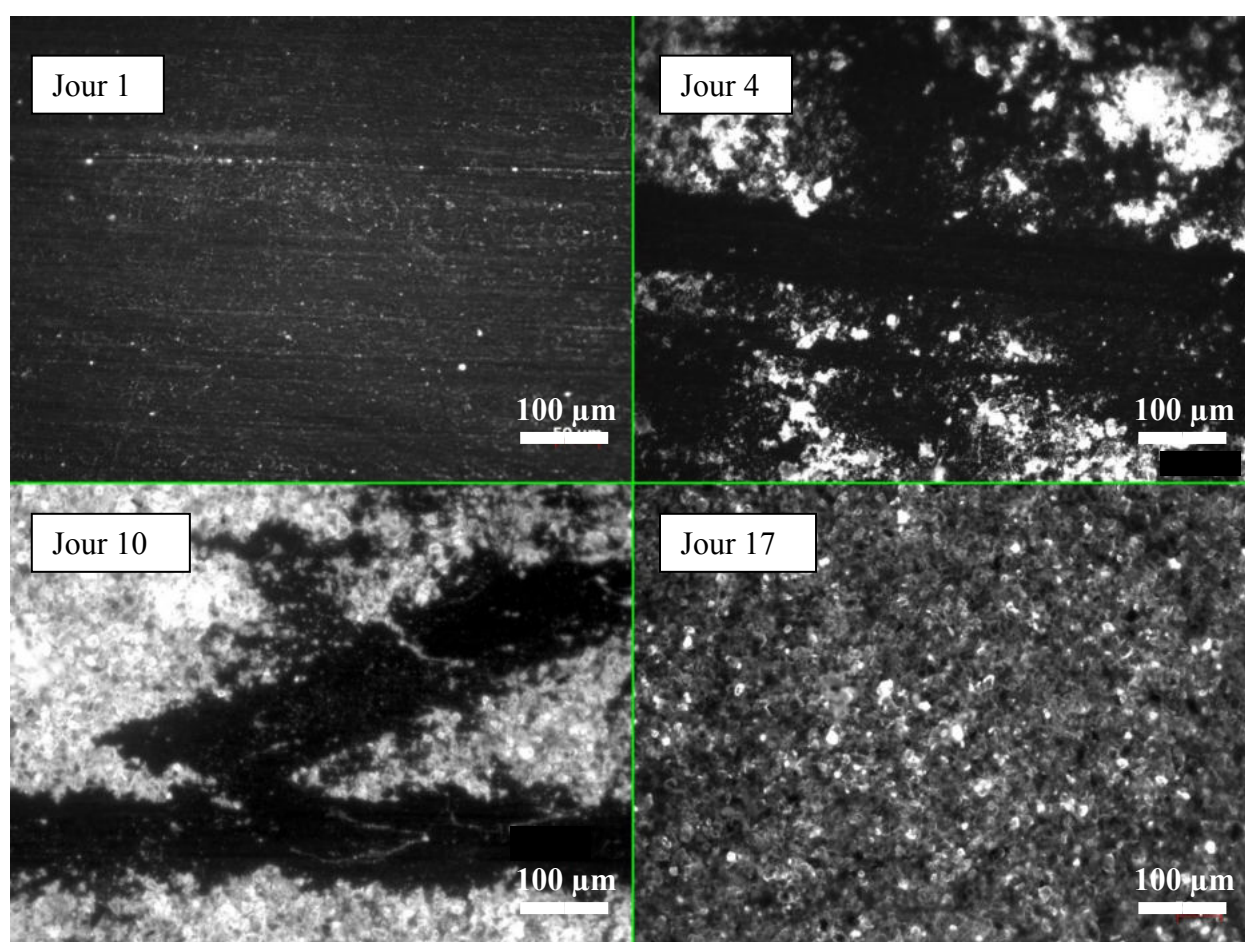


Figure III-9 : Evolution du biofilm sur la surface d'une électrode en acier inox 254SMO après 1 jour, 4 jours, 10 jours et 17 jours d'immersion dans un milieu Guatemala. Grossissement x20 - fluorochrome acridine orange.

Le relief des matériaux graphite et tissu de carbone empêche l'observation des surfaces avec un microscope à épifluorescence classique. En effet, de nombreuses zones de flou gênent sur les images réalisées à cause d'une mise au point faite par l'appareil photo sur un seul plan de l'échantillon. Le microscope est donc équipé d'un système de coupe optique (Apotome®)

et d'un plateau motorisé. La figure III-11 présente les images comparées obtenues à partir de 4 électrodes en tissu de carbone à l'aide du microscope à épifluorescence. Les images A et B des électrodes polarisées à -0,2 V/ECS pendant 4 et 8 jours montrent l'évolution du biofilm sur les fibres de carbone du tissu. Les images sélectionnées ici correspondent à des zones correspondant au maximum de colonisation possible par le biofilm à 4 ou 8 jours. A 8 jours, il existe donc des zones où les fibres de carbone sont complètement englobées par le biofilm, ce dernier étant coloré en vert sur les images, alors que seuls des points isolés verts sont présents un peu partout sur l'ensemble des fibres à 4 jours. Cette observation va dans le même sens que celle faite avec l'électrode en acier inox qui montre une croissance du biofilm visible dès les premiers jours de polarisation.

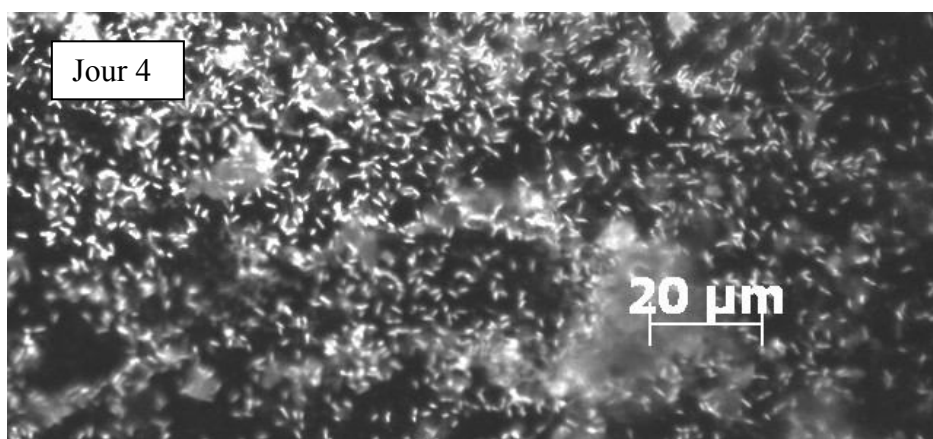


Figure III-10 : Bactéries en forme de bâtonnets et substance blanchâtre à la surface d'une électrode en acier inox254 SMO après 4 jours d'immersion dans un milieu Guatemala. Grossissement x40 – fluorochrome acridine orange

Deux électrodes non polarisées sont placées dans les mêmes réacteurs que ces électrodes polarisées. Leur surface est observée aux mêmes dates et dans les mêmes conditions (figure III-11, section non polarisées). Une évolution du biofilm est également mesurée entre 4 et 8 jours mais elle est visiblement moins rapide sans une polarisation des électrodes. La polarisation pourrait accélérer un processus de colonisation de l'électrode par des bactéries organisées en biofilms. Ce résultat confirme qu'imposer un potentiel électrochimique à une électrode permettrait de créer un site d'adhésion privilégié pour les bactéries qui tirent un bénéfice de cette association. Il n'est cependant pas possible de conclure sur la similarité des communautés bactériennes formées sous et sans polarisation.

Afin de compléter ces premières observations des surfaces des électrodes modifiées, la microscopie électronique à balayage a fourni des images haute définition du biofilm sur les électrodes de travail en tissu de carbone.

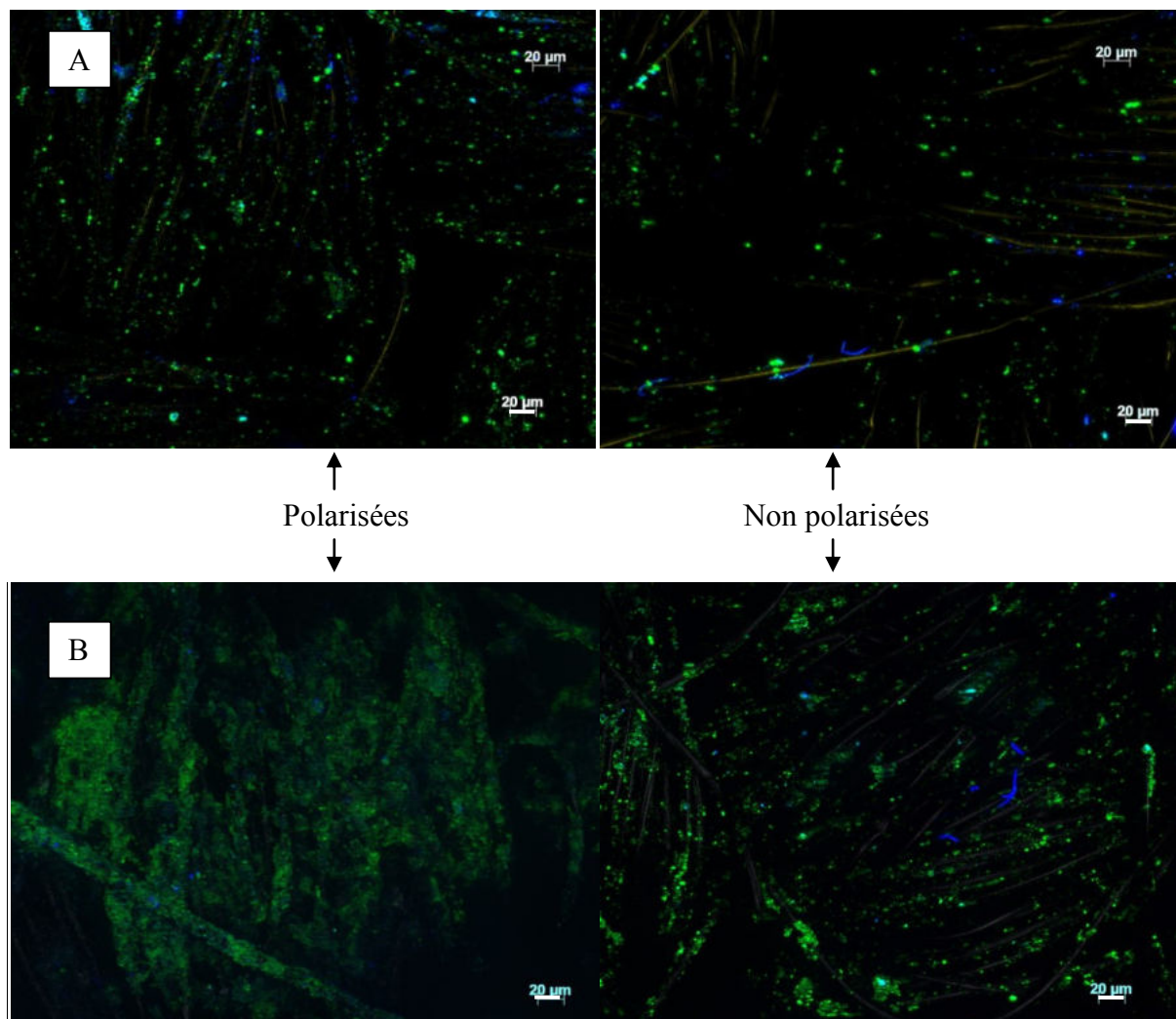


Figure III-11 : Photographies d'électrodes en tissu de carbone polarisées à -0,2 V/ECS ou non polarisées après immersion de 4 jours (A) et de 8 jours (B) dans un milieu Guatemala. Les zones colorées en vert correspondent à la coloration à l'acridine orange. Les fibres de carbone apparaissent en jaune. Grossissement x20 – système Apotome®

Tout d'abord, en utilisant le mode environnemental et de forts grossissements, des détails de structure du biofilm sont observés (figure III-12). Les images, prises dans des conditions de forte humidité, c'est-à-dire proche des conditions réelles de vie du biofilm, révèlent la complexité structurale du biofilm adhérent à la surface du tissu de carbone. En effet, il se compose d'agrégats de matière sédimenteuse autour et entre les fibres de carbone, et certainement englués dans la matrice polymérique sécrétée par le biofilm (figure III-12). Des diatomées (micro-algues) sont également incrustées dans le biofilm (figure III-12A à 12D). La présence de longs fils inter-connectant les agrégats est également visible (figure III-12F). Il ne peut pas s'agir de « nanowires » bactériens à cause de leurs dimensions (plusieurs micromètres) et on ne peut pas conclure sur la nature de la connexion mise en place.

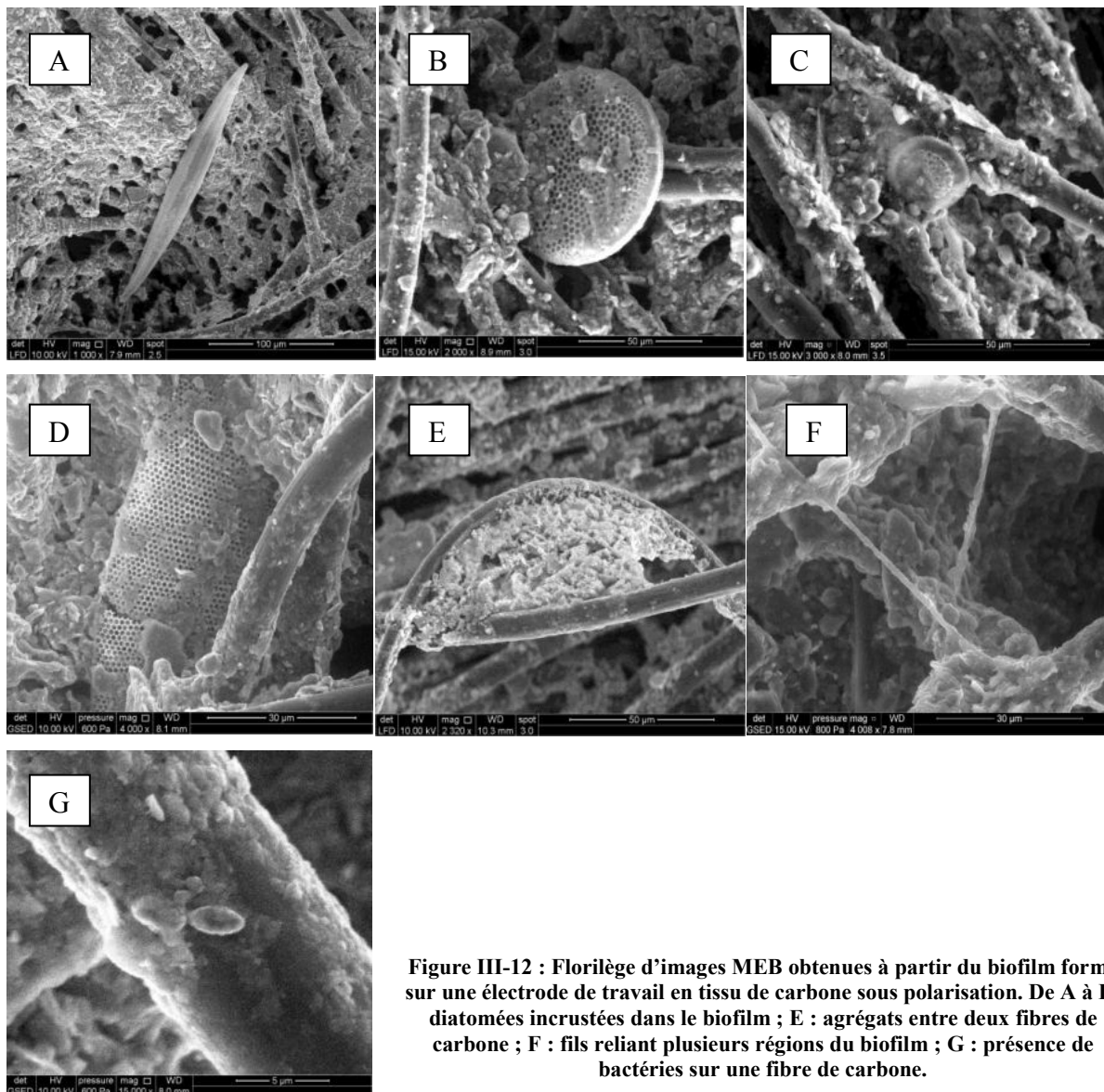


Figure III-12 : Florilège d'images MEB obtenues à partir du biofilm formé sur une électrode de travail en tissu de carbone sous polarisation. De A à D, diatomées incrustées dans le biofilm ; E : agrégats entre deux fibres de carbone ; F : fils reliant plusieurs régions du biofilm ; G : présence de bactéries sur une fibre de carbone.

Une analyse EDX sur un échantillon d'électrode avec son biofilm a permis d'identifier les éléments chimiques composant le biofilm (figure III-13) :

- Du sodium, du potassium et du magnésium qui associés au chlore forment des sels habituellement présents dans les milieux marins : NaCl, KCl et MgCl₂. Le sodium Na provient également des ajouts d'acétate de sodium dans le milieu ;

- Du silicium, de l'aluminium et de l'oxygène, tous les trois composants récurrents des sédiments sous la forme d'aluminosilicates (argile) ou de dioxyde de silicium (sable) ;

- Du carbone et de l'oxygène, constituants de la majorité des molécules organiques et des microorganismes ;

- Du fer, métal connu pour être présent dans les sédiments marins sous la forme d'oxydes de fer II ou III. L'étude des biofilms EA anodiques en milieu sédimentaire fait souvent référence à des bactéries capables de transférer leurs électrons à l'élément fer sous sa forme solide.

Cette énumération peut ne pas être exhaustive dans le cas où des éléments seraient dans les limites de détection de l'analyseur.

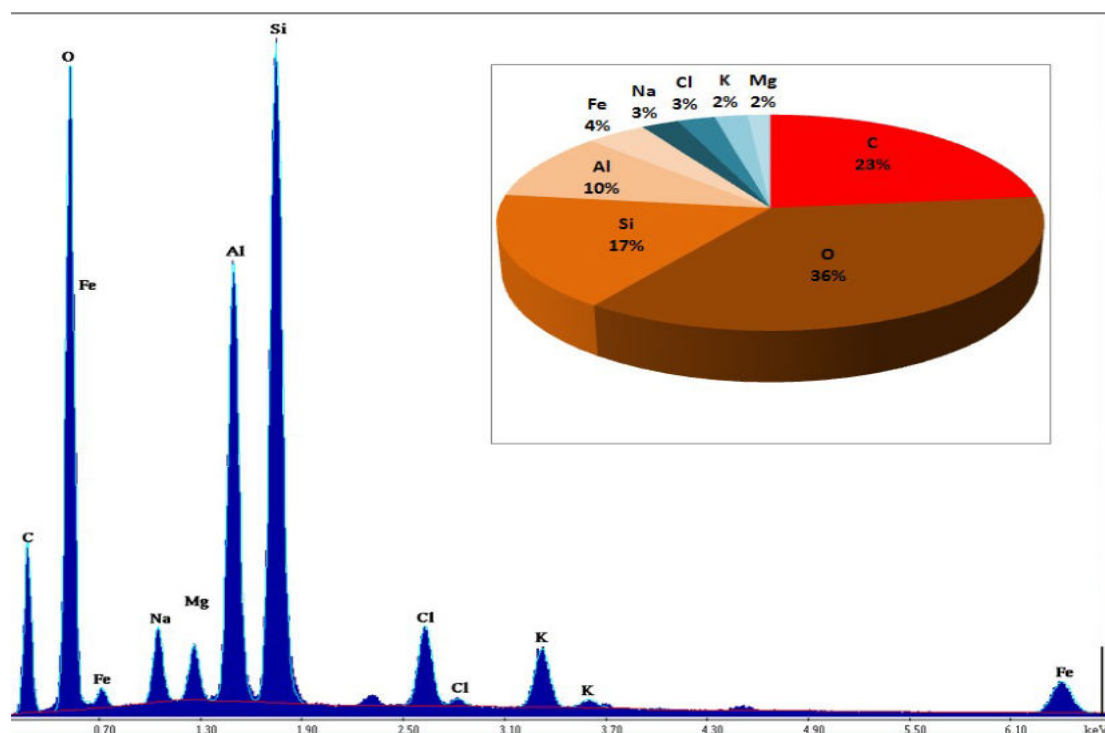


Figure III-13 : Analyse EDX d'un échantillon de biofilm formé sur une électrode en tissu de carbone et les pourcentages des éléments chimiques détectés.

Grâce à ces informations, un détecteur d'électrons rétro-diffusés (BSED) est sélectionné pour mieux visualiser le biofilm sur les fibres de carbone. En effet, un meilleur contraste basé sur les différences de numéro atomique est obtenu : le carbone de l'électrode apparaît en gris sur les images et le biofilm correspond aux zones blanches.

Des échantillons d'électrodes, extraits après 3 jours, 8 jours et 11 jours d'immersion et de polarisation sont observés suivant la procédure définie précédemment. Après un traitement numérique des images consistant à accentuer les contrastes entre les zones claires et les zones plus sombres, seul le biofilm est visible et apparaît blanc sur un fond noir. Les taux de couverture moyens du biofilm sur l'électrode sont estimés pour chaque temps d'immersion. Entre 5 et 10 images à faibles grossissements, entre x50 et x100, ont été utilisées pour chaque

calcul de taux moyen. Les calculs ne concernent que la surface visible de l'électrode et ne prennent pas en compte les biofilms dans l'épaisseur de l'électrode. Les taux obtenus sont toutefois considérés comme étant représentatifs du taux de couverture total. Ainsi, le taux de recouvrement estimé et moyen varie de $11 \pm 2\%$ à 3 jours à $45 \pm 6\%$ à 11 jours, avec une moyenne de $21 \pm 3\%$ à 8 jours (figure III-14).

Les densités de courant enregistrées sont plus élevées dans le cas du tissu de carbone comparativement aux électrodes en acier ou en graphite, or seulement 45 % environ de la surface du tissu de carbone est mise en jeu. Il est légitime de penser qu'un taux de couverture supérieur sur le tissu de carbone devrait conduire à une augmentation du courant enregistré. Il est malgré tout difficile de comparer les performances obtenus à partir de l'acier inox et du tissu de carbone, sans connaître la véritable surface représentée par ces 45 % ni sans mesurer le nombre de bactéries présentes dans les biofilms étudiés.

La surface disponible du matériau d'électrode a tout de même une grande importance pour la génération du courant par l'action des microorganismes. Par la suite, il faudrait envisager la conception et l'utilisation de matériaux offrant de nombreuses possibilités d'adhésion pour les biofilms telles que des mousses, des brosses de fibres, des surfaces microstructurées... D'autre part, des techniques de caractérisation plus fines d'étude du biofilm devront être proposées telles que la numération des bactéries ou la mesure de l'épaisseur du biofilm grâce à des logiciels de traitement d'images sur les coupes obtenues par microscopie.

III.2.3.2.1. Protocole d'apport du combustible

Les bactéries du biofilm électroactif ont besoin de substrat à dégrader pour transférer des électrons vers l'électrode et donc initier la génération de courant. La consommation totale du réactif dans le milieu se caractérise par la chute abrupte de la densité de courant visible sur les chronoampérogrammes.

Au vu des résultats précédents, renouveler les ajouts d'acétate dans le temps a semblé pertinent pour augmenter les densités de courant enregistrées et pour développer le biofilm sur l'électrode. Ainsi, après chaque chute de densité de courant, correspondant à la consommation complète de l'acétate, un nouvel ajout de substrat est effectué. Les concentrations sont de 10 mM ou de 20 mM à chaque ajout.

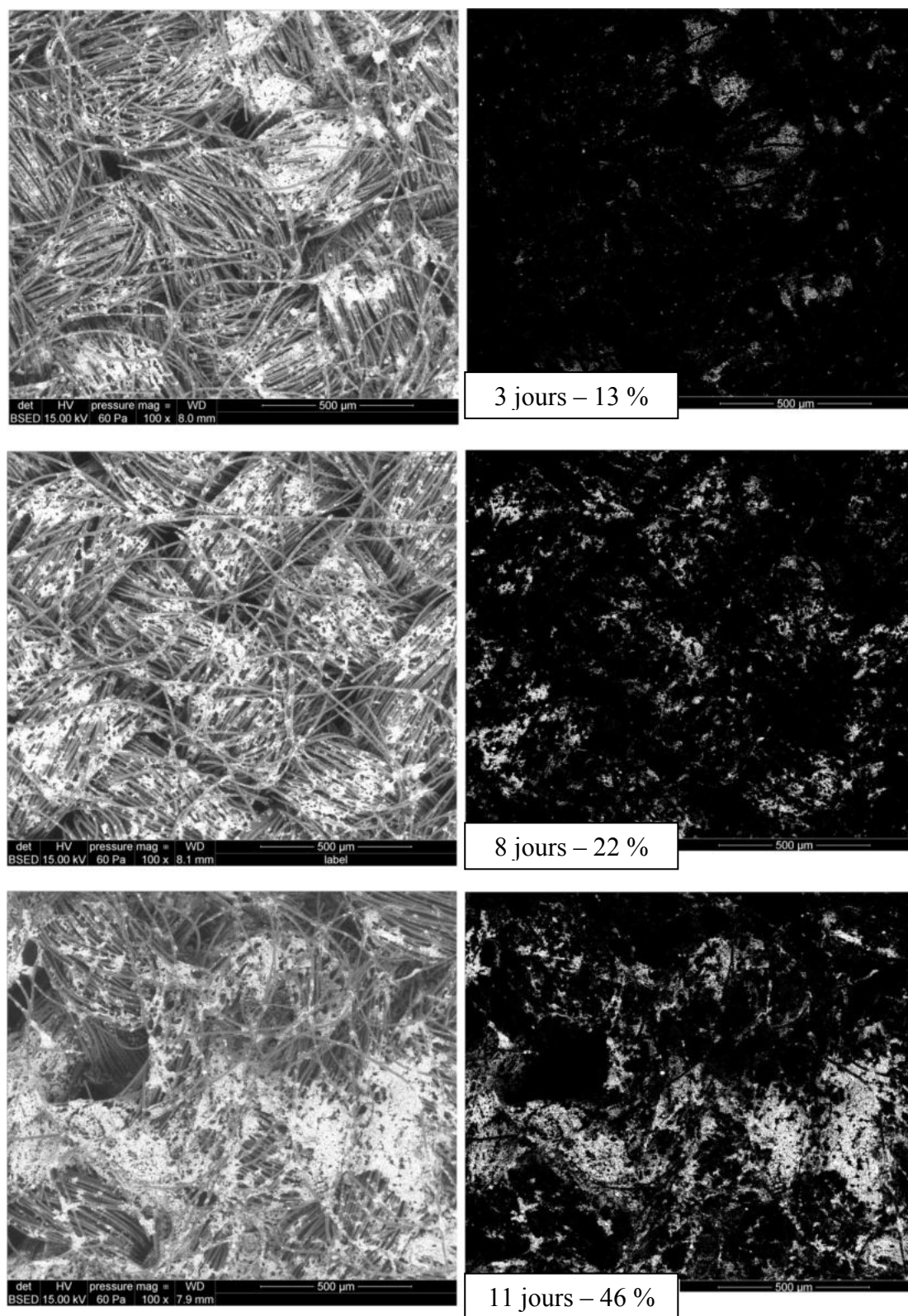


Figure III-14 : Photographies MEB d'une électrode en tissu de carbone après immersion pendant 3 jours, 8 jours et 11 jours. Colonne de gauche : images obtenues grâce au détecteur BSED ; Colonne de droite : images après traitement pour renforcer le contraste.

Des expériences menées avec des électrodes en graphite sur les milieux Mahury et Kourou mettent en évidence l'évolution des pics de densités de courant avec une $J_{\max}$ de plus en plus importante (figures III-15 & III-16). Pour le milieu Kourou, les $J_{\max}$ évoluent de 0,5 A/m² pour le 1^{er} pic à 4,4 A/m² pour le 6^{ème} ajout d'acétate. Pour le milieu Mahury, les deux premiers ajouts sont de 10 mM et les deux derniers de 20 mM chacun. La densité de courant maximale est de 0,5 A/m² pour le premier pic et de 3,3 A/m² pour le 4^{ème} pic.

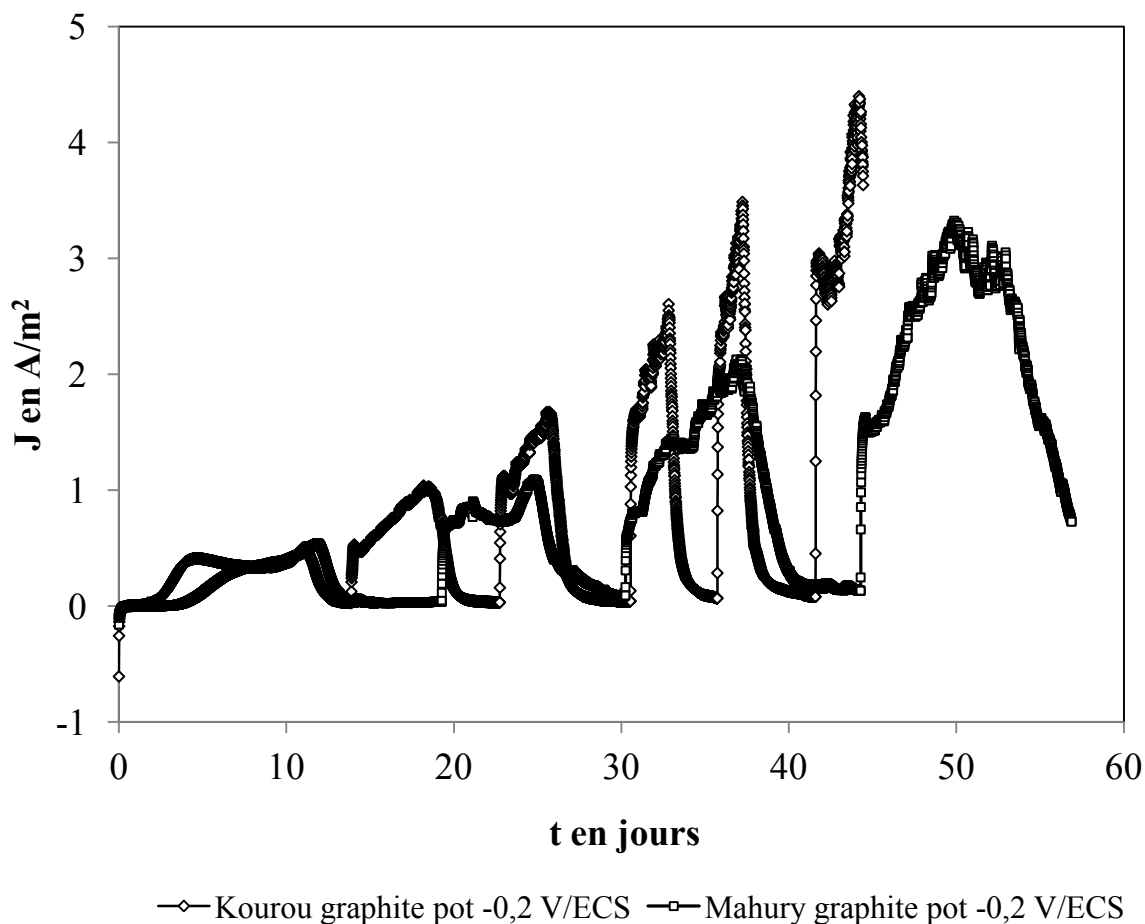


Figure III-15 : chronoampérogrammes réalisés sur les milieux Mahury (□) et Kourou (◇). Chaque pic de densité de courant suit un ajout d'acétate dans le milieu, le premier ayant été apporté au temps initial. Les autres ajouts correspondent exactement au démarrage d'un nouveau pic de densité de courant.

Pour les deux milieux testés, la densité de courant augmente donc significativement à chaque nouvel ajout du substrat. La communauté est certainement mieux adaptée aux mécanismes de dégradation de l'acétate et de transfert électronique mis en jeu.

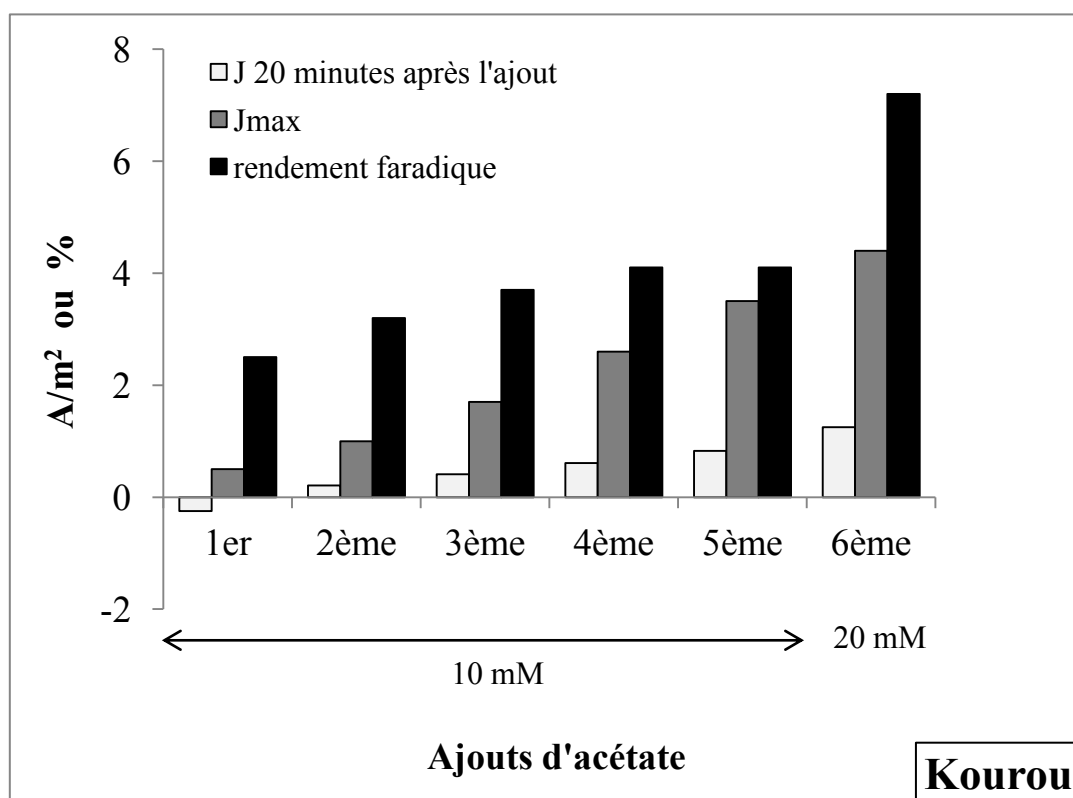
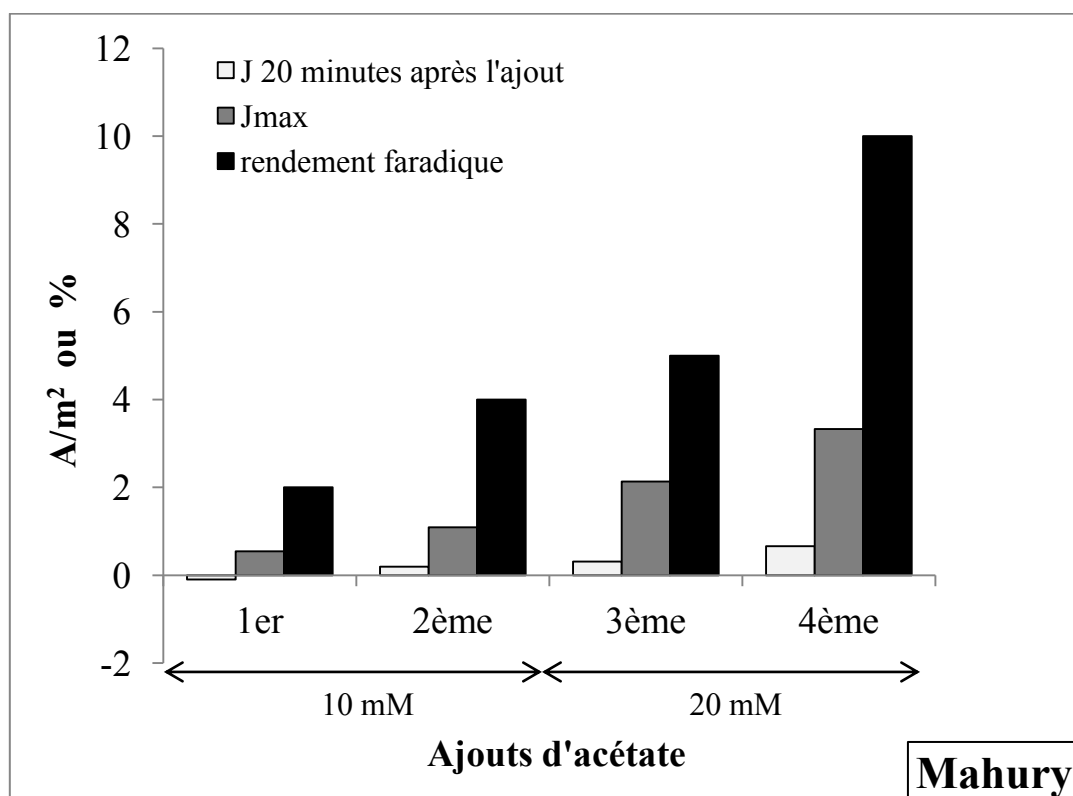


Figure III-16 : Evolution de la densité de courant maximale (J_{max}), de la densité de courant mesurée 20 minutes après un ajout d'acétate (J 20 minutes après l'ajout) et du rendement faradique en fonction des ajouts d'acétate pour les milieux Mahury et Kourou.

De plus, chaque ajout de substrat successif est immédiatement suivi d'un saut de courant, de plus en plus élevé (figure III-16 ; J 20 minutes). Ainsi, les densités de courant obtenues 20 minutes après les ajouts successifs montrent une évolution croissante. Cette évolution positive peut s'expliquer par deux facteurs :

- le biofilm formé à la surface de l'électrode est plus efficace pour récupérer les électrons provenant de l'acétate et pour les transférer à l'électrode,
- les microorganismes qui composent le biofilm sont plus nombreux et le nombre d'électrons transférés est également plus important.

Les rendements faradiques observés renseignent sur la quantité d'électrons fournis à l'électrode au cours du temps et des ajouts. Ils indiquent une augmentation notable pour le milieu Mahury pour lequel on a doublé les concentrations pour les 3^{ème} et 4^{ème} ajouts : de 2 % pour le 1^{er} pic à 10 % pour le 4^{ème} pic. Cette augmentation est moins importante dans le cadre du milieu de Kourou pour lequel les ajouts d'acétate ont été de concentration constante (10 mM) pendant 5 ajouts. L'évolution du rendement faradique atteint un palier à 4 % alors qu'il augmente jusqu'à 7 % dès lors que la concentration en acétate est doublée (6^{ème} ajout). La quantité de microorganismes augmente dans le biofilm mais également dans le milieu. La quantité d'acétate fournie est consommée de plus en plus rapidement au cours du temps. La compétition entre les microorganismes planctoniques et ceux du biofilm peut expliquer le palier atteint lorsque la concentration en substrat n'évolue pas, comme c'est le cas avec le milieu Kourou. Pour cette même raison, en augmentant progressivement la quantité d'acétate dans le milieu Mahury, le transfert électronique par le biofilm EA peut être amplifié.

Par un protocole d'apport en acétate adapté et évolutif, les densités de courant et les rendements faradiques peuvent être améliorés. Un biofilm plus mature et nourri régulièrement en substrat fournit de plus en plus d'électrons à l'électrode.

Dans toutes les expériences précédentes, l'acétate était ajouté de façon discontinue dans le milieu lorsque la densité de courant revenait à 0 mA/m². Cette méthodologie a permis d'obtenir des générations de courant à durée limitée puisque dépendantes d'une quantité finie de substrat. Maintenir les densités de courant à leur maximum dans le temps permettrait d'obtenir un système de production d'électricité continu. Cette perspective apparaît comme une nécessité si par la suite les électrodes modifiées par adhésion de biofilms EA devaient être utilisées dans des PACM.

Afin de stabiliser le courant obtenu, le protocole suivant est utilisé. La première étape consiste à former les biofilms EA sur les électrodes et d'obtenir une densité de courant maximale fixée arbitrairement au-dessus de 6 A/m^2 . Cette étape est réalisée en respectant le principe de progression dans l'apport du substrat mis en avant précédemment. Les ajouts d'acétate sont ensuite effectués plus fréquemment au moment où s'amorce la chute de courant, indiquant la disparition de l'acétate dans le milieu.

La figure III-17A illustre les résultats obtenus lors d'une expérience sur le milieu Guatemala réalisée avec une électrode en tissu de carbone. La première étape du protocole est réalisée par 2 ajouts successifs de 20 mM puis 1 ajout de 30 mM. La densité de courant maximale obtenue est de 8 A/m^2 . La deuxième étape du protocole permet d'augmenter la densité de courant graduellement jusqu'à 12 A/m^2 et de la maintenir au-dessus de 6 A/m^2 pendant une centaine de jours. Cependant, un abaissement progressif du courant est observé après 40 jours environ et ne peut être empêché malgré des ajouts d'acétate plus importants (40 mM à 160 jours par exemple).

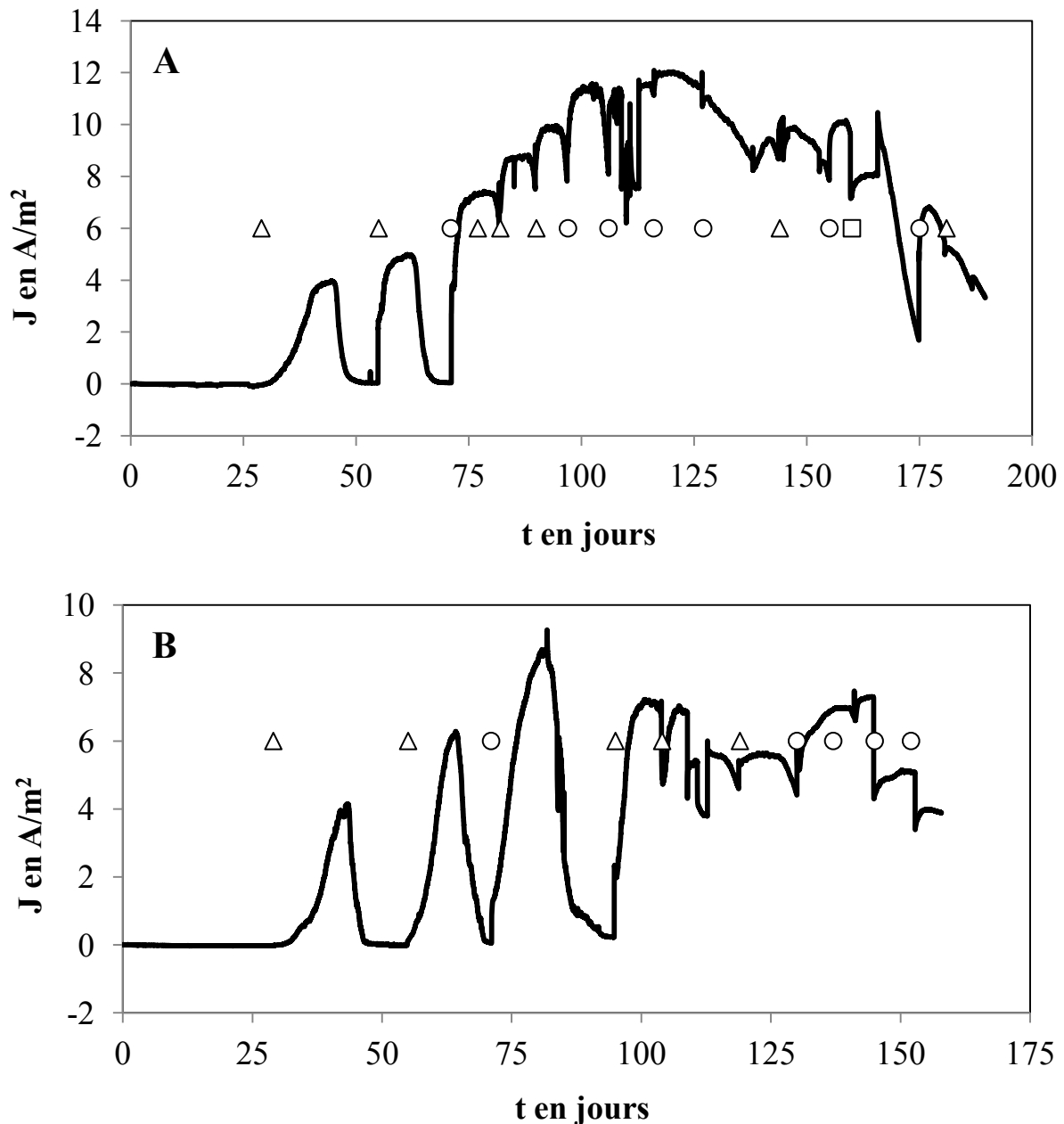
Les rendements faradiques calculés sont de 13 % et 15 % pour les 2 premiers pics (ajouts d'acétate entre 0 et 70 jours) puis de 24 %, cette dernière valeur étant estimée et moyennée pour la période de densités de courant correspondant aux ajouts n° 3 à 7. La méthodologie employée s'avère concluante avec un objectif atteint puisque un courant continu est obtenu pendant plus de 3 mois.

Néanmoins, la chute de courant observée après environ 150 jours de manipulation reste encore à expliquer, notamment pour une utilisation de ces électrodes en PACM par la suite. Deux pistes peuvent être proposées :

- D'autres études ont démontré qu'une concentration trop importante en substrat peut inhiber l'action du biofilm EA sur l'électrode [171]. Il serait donc souhaitable d'améliorer la procédure d'apport en substrat ;
- Les bactéries du milieu sont en phase de déclin. Un appauvrissement en nutriments, nécessaires au métabolisme des bactéries, peut engendrer leur fin de vie. Travailler dans des volumes de milieu plus importants ou encore régulièrement renouvelés pourrait constituer une solution.

Dans une expérience similaire, l'augmentation progressive de la concentration en acétate apporté dans le milieu n'est pas respectée (figure III-17B). Ainsi, le 4^{ème} ajout

d'acétate, effectué après le retour à 0 quasi-complet du pic précédent, induit une densité de courant maximale de 7 A/m^2 , soit 1 A/m^2 de moins que celle du pic précédent. Par la suite, les ajouts répétés d'acétate ne permettent pas d'obtenir une évolution graduelle comme dans le cas de la figure III-17A. Le lien entre concentration adaptée du substrat et génération de courant est encore une fois démontré.



Dans cette deuxième expérience, le déclin du courant est également observé à partir de 150 jours de polarisation. Une électrode propre polarisée au même potentiel, immergée dans

le milieu de cette expérience à 160 jours, montre des performances extrêmement faibles inférieures ou égales à 12 mA/m^2 et ce malgré de nouveaux ajouts d'acétate. Les bactéries EA ne sont certainement plus présentes dans le milieu ou inhibées. En parallèle, l'électrode avec le biofilm EA est encore active. Ces résultats démontrent l'épuisement en nutriment du milieu et son impact sur l'activité catalytique du biofilm.

III.2.3.2.1. Amélioration du milieu électrolytique par filtration

Des expériences préalables ont permis de mettre en évidence que le positionnement de l'électrode de travail dans le mélange eau-boue pouvait avoir une influence sur les résultats. En effet, la densité de courant était augmentée d'un facteur 10 lorsque l'électrode de travail était située dans l'eau surnageante plutôt qu'enfouie dans la boue, comme c'est le cas pour les anodes des PACM benthiques. Ce positionnement surélevé permet un accès des réactifs vers l'électrode plus simple et rapide dans les cellules électrochimiques. Par ailleurs, les milieux n'étant pas brassés, la présence d'oxygène reste limitée dans les cellules même dans l'eau surnageante. Ces observations ont permis d'envisager qu'une épuration par filtration du milieu pourrait peut-être permettre d'augmenter les échanges électroniques entre le biofilm et l'électrode.

Les milieux utilisés pour les chronoampérométries étaient jusqu'alors des mélanges d'eau distillée et de boue dans les proportions 4/5-1/5. Une filtration de ces mélanges sur tissu ou sur papier absorbant est effectuée afin d'en récupérer le filtrat liquide. L'objectif est d'obtenir une solution électrolytique contenant les molécules solubles de la boue (comme les sels, la matière organique solubilisée ou encore les oligo-éléments, nutriments ou ions) ainsi que les bactéries. Cette solution électrolytique pourrait permettre d'améliorer certaines étapes de l'étude telle que les observations microscopiques du biofilm, qui sont rendues difficile par une forte présence sédimentaire. D'autre part, toujours dans l'optique de l'utilisation future dans une PACM, cette filtration pourrait éviter les colmatages de la membrane échangeuse de protons ou encore du séparateur par les sédiments.

Deux filtrats différents, obtenus du milieu Guatemala, sont testés. Le premier, filtrat I, est issu d'une seule étape de filtration alors que le deuxième, filtrat III, de 3 filtrations successives. La différence essentielle réside dans la présence ou non de particules sédimentaires. En plaçant l'électrode de travail dans le filtrat I, la décantation entraîne le dépôt des particules sédimentaires, présentes en faible quantité, sur la surface de l'électrode

de travail. Les chronoampérogrammes issus de la polarisation à $-0,2$ V/ECS d'électrodes de travail en acier inox 254 SMO, plongées dans ces milieux, montre une différence significative (figure III-18). En effet, par l'ajout de 10 mM d'acétate de sodium, la densité de courant maximale dans le filtrat I est de 5 A/m^2 soit 10^3 fois plus que celle dans le filtrat III. Le rendement faradique est de 16 % dans le cas de la 1^{ère} filtration. Le filtrat III ne contient probablement pas les éléments nécessaires à la formation d'un biofilm EA performant à la surface de l'électrode. La raison principale semble être l'absence des particules sédimentaires. Il est alors envisagé que les bactéries responsables de l'électroactivité sont celles qui sont présentes dans ces particules.

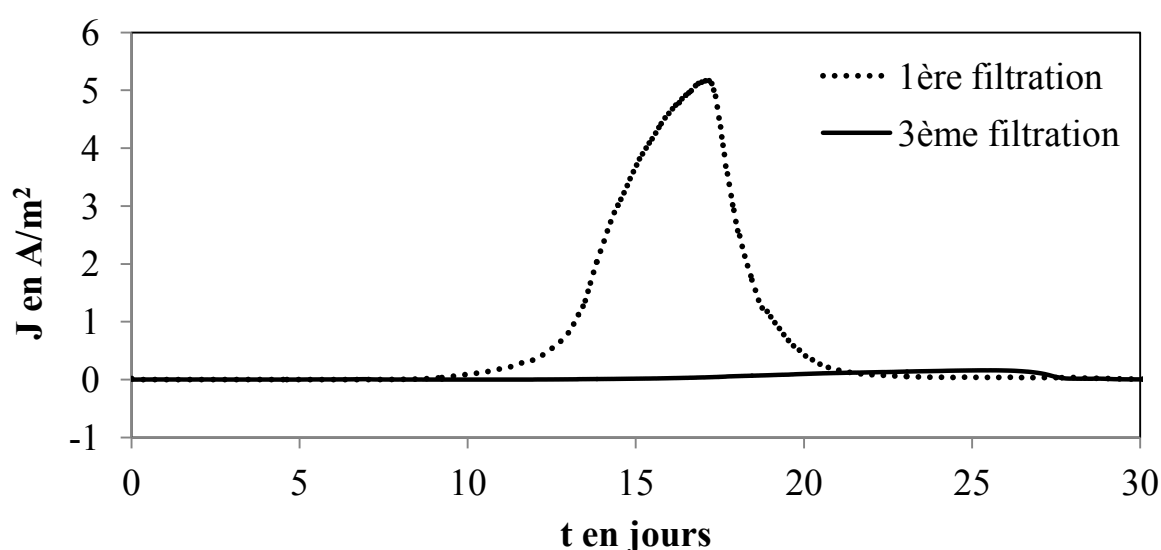


Figure III-18 : Chronoampérogrammes obtenus d'électrodes de travail en acier inoxydable 254 SMO plongées dans des milieux Guatemala préalablement filtrés selon deux protocoles différents.

Afin de confirmer l'influence des sédiments dans la génération du courant, des apports de sédiments sont effectués dans plusieurs cellules contenant les filtrats (figure III-19). Les électrodes sont dans ce cas en tissu de carbone toujours polarisées à $-0,2$ V/ECS. A chaque fois, les ajouts de sédiments induisent, après un laps de temps d'une journée, une augmentation significative des densités de courant. A l'issue du pic de densité de courant obtenu, un deuxième ajout de sédiment permet de s'assurer que la génération de courant n'est pas liée à un apport d'un substrat dégradé par les bactéries mais très certainement à un apport de bactéries EA dans le milieu. En effet, le deuxième ajout n'engendre pas un nouveau pic de densité de courant comme c'est le cas avec l'acétate, confirmant que le substrat dégradé précédemment était l'acétate déjà présent dans le milieu et pas un composé contenu dans la

boue. Une autre expérience avec un volume très réduit de sédiment (5 mL) a montré qu'une faible quantité de particules permet de générer un courant.

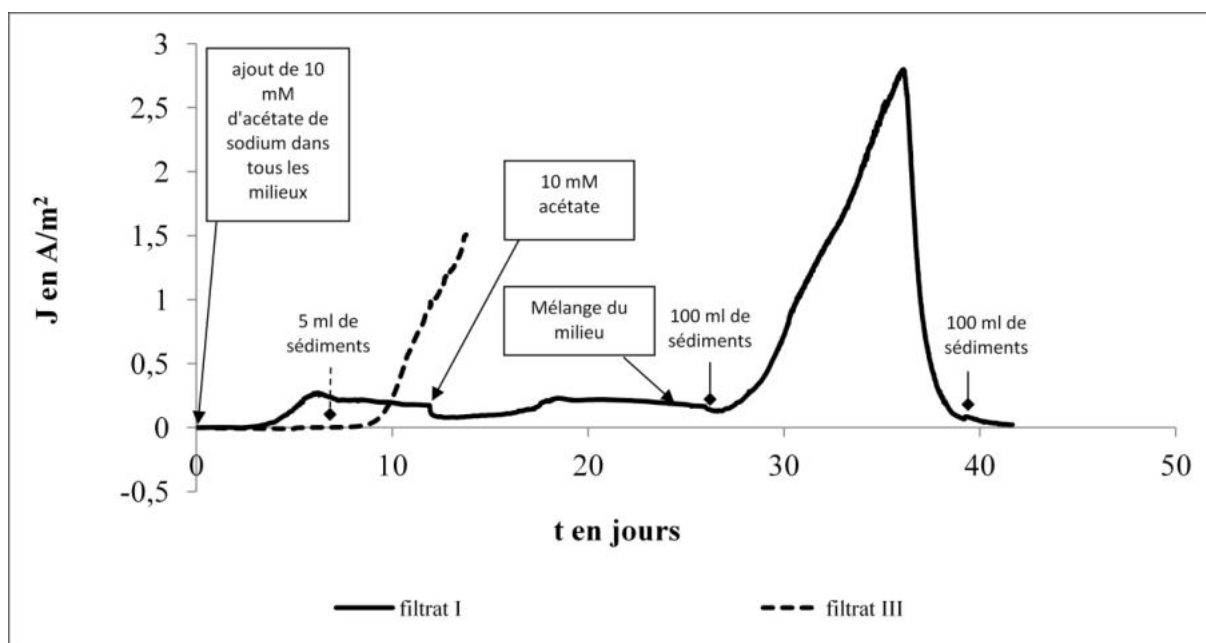


Figure III-19 : Chronoampérogrammes obtenus à partir d'électrodes de travail en tissu de carbone polarisées à -0,2 V/ECS et de filtrat du milieu Guatemala. Les flèches à bout losange indiquent les volumes de sédiments ajoutés dans les milieux.

III.2.3.2.2. Biofilms EA de seconde génération

Les sédiments se sont avérés être le support des bactéries EA dans les milieux d'étude. Pour autant, toujours avec l'objectif d'épurer le milieu électrolytique, un autre vecteur des bactéries EA est envisagé. Un biofilm EA préformé pourrait constituer un mode de transport de bactéries EA, à condition de trouver un milieu adapté à la recolonisation. Liu et al. en 2008 ont pu recoloniser de nouvelles électrodes à partir de biofilms EA préformés sous polarisation à + 0,2 V vs. Ag/AgCl [103]. Les biofilms de deuxième génération, formés dans une solution stérile nutritive, ont permis d'obtenir un courant plus important. Une méthodologie et des résultats similaires avaient déjà été diffusés par Kim et al. en 2005 pour coloniser de nouvelles bioanodes à partir des biofilms EA récupérés sur d'autres bioanodes et réinoculés dans les PACM [108]. Cette amélioration est expliquée par la sélectivité des bactéries, qui se met en place de biofilm en biofilm. Les communautés bactériennes des milieux naturels sont complexes et diversifiées. Le biofilm primaire, se formant sur une électrode plongée dans ces milieux, est alors composé de bactéries EA mais également de bactéries non EA, pouvant gêner le transfert électronique vers l'électrode (compétition avec les bactéries EA pour

dégrader le substrat par exemple, obstacle physique,...). Toutefois, cette communauté est le plus souvent dominée par les bactéries EA ou ayant une synergie avec ces bactéries et n'est pas représentative de toutes les espèces présentes dans le milieu d'origine. Une fois replacée dans un milieu stérile, seules les bactéries de la communauté adhérente à l'électrode peuvent recoloniser les nouvelles électrodes. La compétition est alors moins forte de recolonisation en recolonisation.

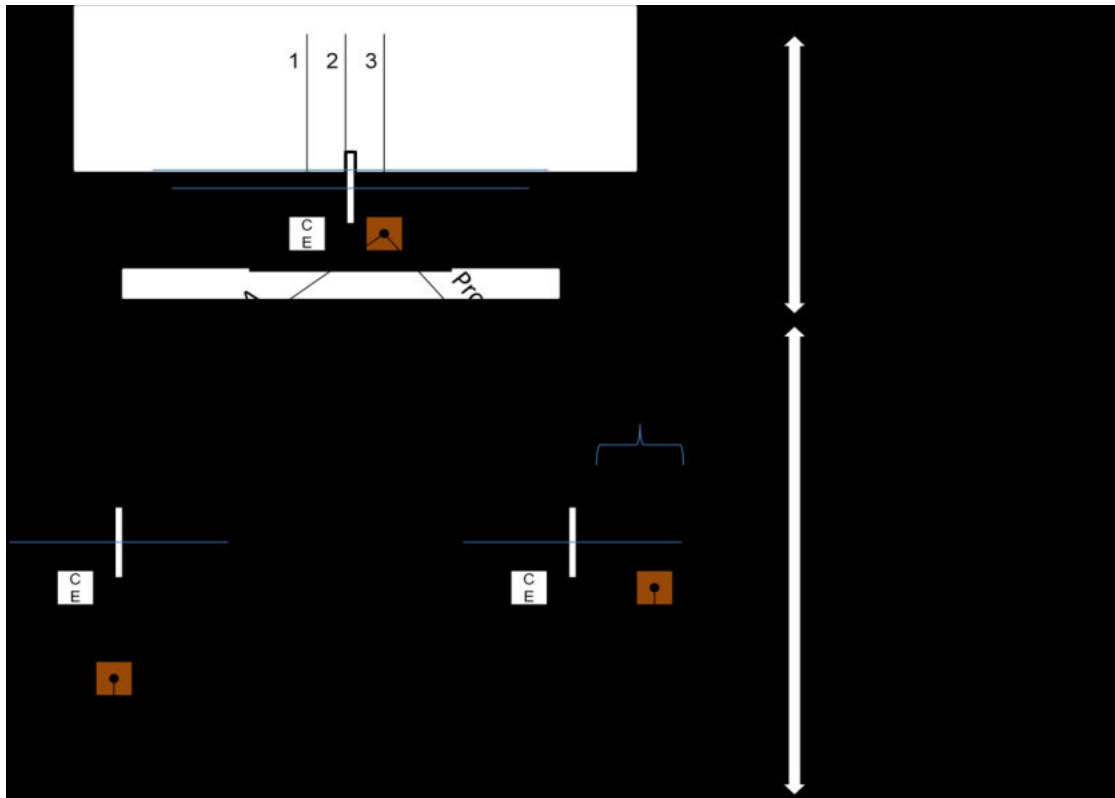


Figure III-20 : Schéma des protocoles d'inoculation des bactéries d'un biofilm EA préformé. Les électrodes de travail sont en tissu de carbone et elles sont polarisées à $-0,2$ V/ECS.

La méthodologie, décrite succinctement dans le paragraphe précédent, est adaptée pour faire l'objet de l'étude présentée ci-dessous. Les résultats attendus sont la formation de biofilms EA de 2^{ème} génération plus efficaces et, toujours, l'obtention d'un milieu d'étude avec un minimum de particules sédimentaires. Deux protocoles sont envisagés et décrits dans les schémas de la figure III-20. Dans le cas A, le biofilm primaire, dont une partie est mise en suspension dans le réacteur et l'autre encore attachée à l'électrode primaire, est placé dans la cellule. Dans ce réacteur, seule l'électrode propre à coloniser est polarisée. Dans le cas B, l'électrode avec le biofilm primaire et l'électrode propre à coloniser sont toutes les deux polarisées et placées côte à côte. Le milieu pour la recolonisation est un filtrat Guatemala stérilisé par autoclave.

Pour le cas A, le biofilm primaire, préformé pendant 160 jours, permet d'obtenir la densité de courant de 4 A/m^2 (Etape 1). Après la mise en place dans le 2^{ème} réacteur (Etape 2), un courant d'oxydation est enregistré après 8 jours sur la nouvelle électrode et après mélange du milieu (figure III-21). Ce courant indique que la nouvelle électrode a pu être colonisée par des bactéries EA issues du biofilm préformé. Toutefois, malgré 2 ajouts d'acétate, les performances du nouveau biofilm formé sont inférieures à 1 A/m^2 . Le courant généré est stable dans le temps puisqu'il est maintenu pendant 80 jours.

Dans le cas B, l'objectif est de maintenir le biofilm EA primaire actif et de comparer les performances des 2 biofilms EA (primaire et secondaire). Comme attendu, la densité de courant initiale du biofilm primaire est non nulle contrairement à l'électrode propre (figure III-22). Le biofilm primaire, qui au moment du retrait de son précédent milieu indiquait une densité de courant de 3 A/m^2 après 190 jours, permet ici d'obtenir $1,5 \text{ A/m}^2$. Ce courant initial décroît rapidement jusqu'à $0,3 \text{ A/m}^2$ avant de remonter progressivement. Il correspond certainement à une charge en électrons pendant son transfert d'un milieu à l'autre puis à une décharge rapide. A l'issue de cette décharge, le biofilm connaît une phase progressive d'adaptation à son nouveau milieu qui est caractérisé par un courant croissant jusqu'à $2,5 \text{ A/m}^2$, proche de ses performances dans son ancien milieu. Pour l'électrode propre, après quelques jours, la génération d'un courant indique la formation d'un biofilm EA. La densité de courant maximale obtenue est de $1,5 \text{ A/m}^2$ mais suite à la réalisation d'une voltammétrie cyclique (VC), les performances vont baisser et rester proches de $0,5 \text{ A/m}^2$. Le même affaiblissement est constaté pour le biofilm primaire. Ce dernier est capable de générer à nouveau un courant similaire à celui précédent la VC après quelques jours, contrairement au biofilm secondaire. Le biofilm secondaire apparaît donc plus fragile que le biofilm primaire. Une technique telle que la voltammétrie peut avoir un effet destructeur au niveau de la surface de l'électrode ce qui peut, comme vu dans ce cas, perturber fortement le biofilm EA.

Malgré la forte diminution de la densité de courant de l'électrode secondaire, une autre expérience est menée sur le réacteur B. L'électrode primaire est retirée du réacteur et le comportement du courant de l'électrode secondaire est observé (figure III-22). La densité de courant augmente immédiatement après le retrait de l'électrode primaire. Ce phénomène peut s'expliquer par une compétition, existant entre les 2 électrodes polarisées dans le réacteur, lors de la récupération des électrons provenant de la dégradation de l'acétate.

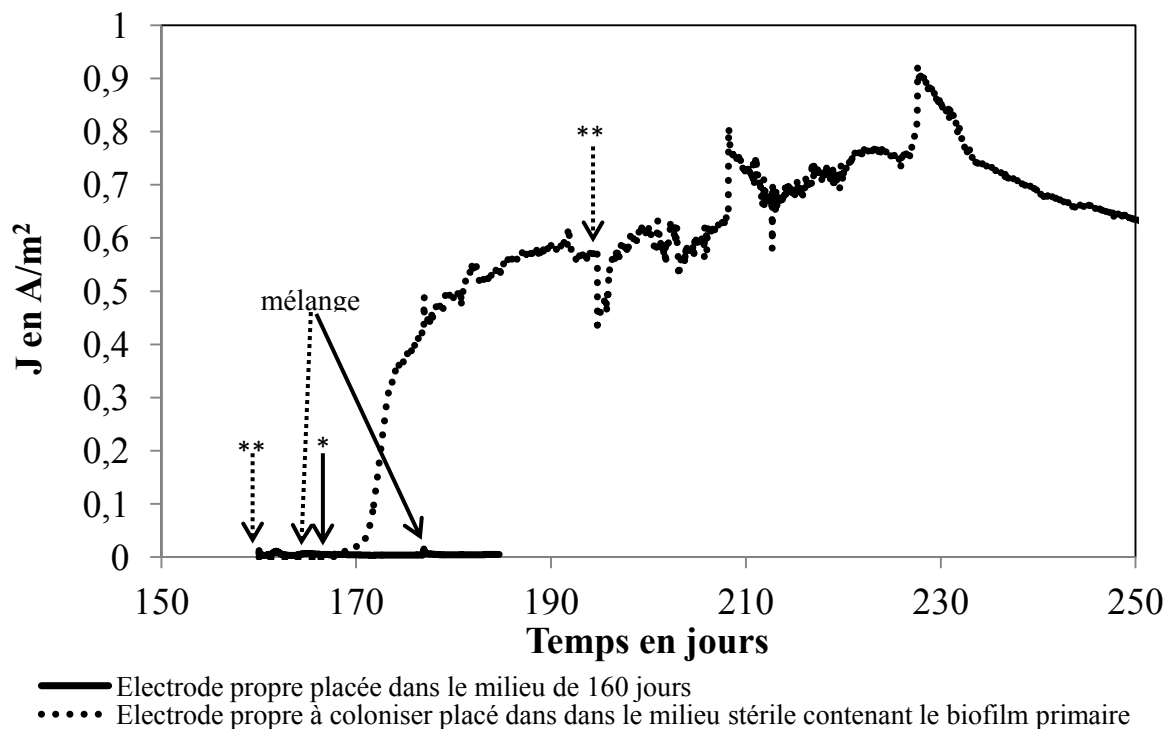


Figure III-21 : Formation d'un biofilm de 2^{ème} génération à partir d'un biofilm EA préformé selon le protocole A (figure III-20) dans un filtrat Guatemala stérile. * : 10 mM d'acétate de sodium ; ** : 20 mM d'acétate de sodium.

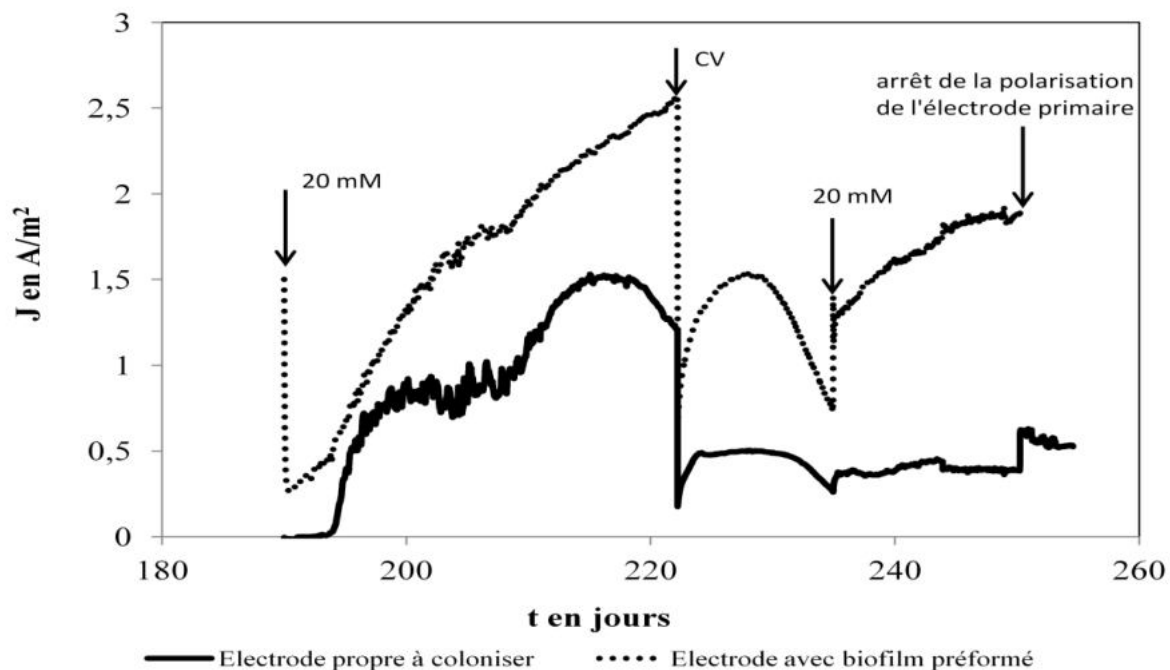


Figure III-22 : Formation d'un biofilm de 2^{ème} génération à partir d'un biofilm EA préformé selon le protocole B (figure III-20) dans un filtrat Guatemala stérile.

Dans les 2 cas présentés ici, former un biofilm de deuxième génération a été possible à partir des bactéries inoculées par le biais d'un précédent biofilm. De plus, la génération du courant a pu être réalisée dans un filtrat sans particules sédimentaires. Par contre, les biofilms de 2^{ème} génération n'ont pas été plus performants que les biofilms primaires. Deux explications pourraient être soit la nature du nouveau milieu ou soit la compétition entre biofilms primaire et secondaire (cas B).

En effet, précédemment, l'hypothèse que les biofilms EA mis en jeu dans les milieux d'étude constitués de boue et d'eau distillée, devaient certainement fonctionner grâce à des transferts électroniques de type directs et indirects a été mise en avant. Or le filtrat stérile empêche la participation d'autres bactéries que celles du biofilm primaire. Par conséquent, des métabolites secondaires formés lors de l'action des bactéries fermentatrices dans le milieu, pourraient par exemple être absents, éliminant ainsi un mode de transfert électronique probable vers le biofilm EA.

III.2.4. Caractérisation de l'interface biofilm-électrode par voltammétrie cyclique

Grâce à la chronoampérométrie, il a été possible de lier la formation de biofilms EA sur les électrodes de travail à la génération de courant sous polarisation. Cette génération de courant est dépendante de la multiplication des bactéries dans le biofilm et dans leur milieu. Elle est également liée aux transferts électroniques directs et indirects mis en place par les bactéries du biofilm.

Dans le cadre des travaux sur les biofilms EA, la voltammétrie cyclique (VC) est utilisée pour obtenir des informations sur l'interface triple : électrode – biofilm – électrolyte. En effet, la présence de l'électrolyte ne doit pas être ignorée puisque celui-ci est présent dans les interstices du biofilm.

Les bactéries EA mettent en place des connexions avec l'électrode à travers l'utilisation de pili conducteurs ou encore grâce à des protéines trans-membranaires. Les médiateurs endogènes ou exogènes sont également susceptibles de se trouver en surface de l'électrode et de participer aux échanges électroniques. La VC permet d'obtenir une signature électrochimique du biofilm dans son milieu à travers la lecture de tous ces phénomènes redox. Toutefois, dans les travaux présentés ici, la complexité et l'hétérogénéité du milieu et des biofilms formés rendent difficile l'identification des espèces redox mises en jeu et visibles sur

les voltammogrammes obtenus. L'étude réalisée tente d'apporter quelques éléments sur le fonctionnement des biofilms formés dans le milieu Guatemala.

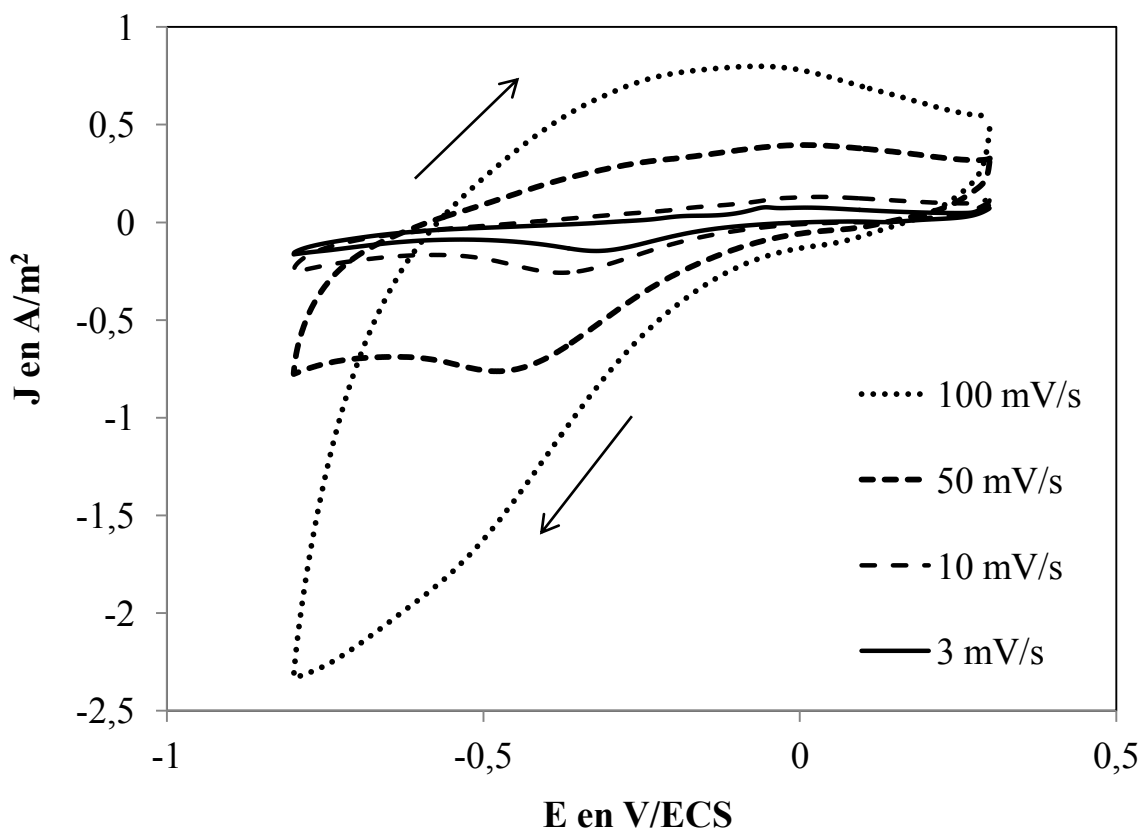


Figure III-23 : Influence des vitesses de balayage sur l'hysteresis du voltammogramme d'une électrode de travail en tissu de carbone immergée dans un milieu Guatemala et polarisée à -0,2 V/ECS. Les potentiels extrêmes du balayage sont -0,8 V/ECS et 0,3 V/ECS.

Différentes vitesses de balayage sont appliquées à une électrode de travail en tissu de carbone, immergée depuis 1 journée dans un milieu Guatemala nourri à l'acétate (figure III-23). A 100 mV/s, les pics de réduction et d'oxydation ne sont que de larges bosses et empêchent une interprétation précise des phénomènes. Au contraire, à 3 mV/s, il est possible de visualiser un pic de réduction ainsi que 2 pics d'oxydation sur le trajet retour du voltammogramme. Ces différences de profil informent sur la rapidité des réactions mises en jeu à la surface des électrodes. Par la suite pour caractériser les électrodes de travail et obtenir une signature électrochimique de chaque biofilm, la vitesse de balayage de 3 mV/s sera utilisée.

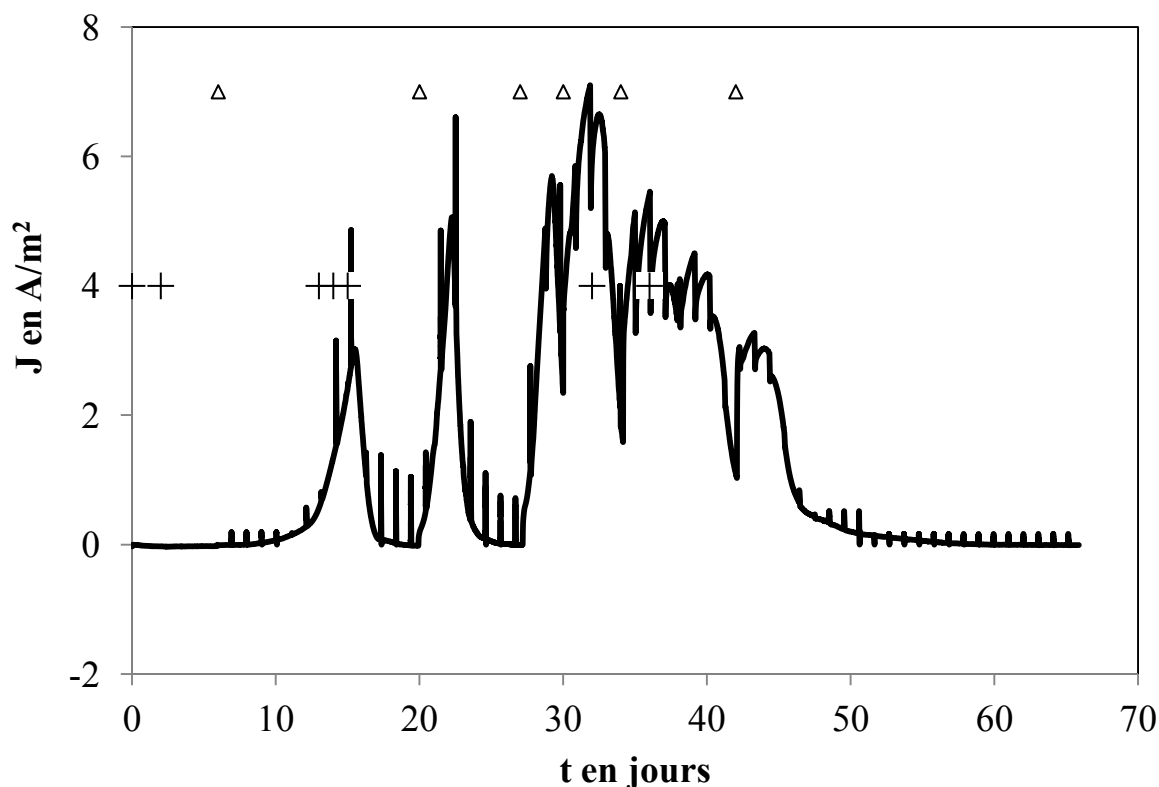


Figure III-24 : électrode de travail en tissu de carbone polarisée à -0,2 V/ECS dans un milieu Guatemala nourri à l'acétate. Des voltammétries cycliques sont réalisées quotidiennement et sont repérables sur le graphe par des traits verticaux. Les + indiquent les jours où les voltammogrammes présentés dans la figure III-25 ont été réalisés. Les Δ indiquent les ajouts d'acétate (10 mM).

La caractérisation quotidienne d'un système électrode-biofilm, par voltammétrie cyclique, permet de mettre en évidence les potentiels redox directement liés à la génération du courant (figures III-24 et III-25). En effet, l'augmentation des densités de courant sur le chronoampéromètre correspond systématiquement à une augmentation du courant à partir du potentiel -0,5 V/ECS sur le voltammogramme dans le sens des potentiels positifs. Cette inflexion apparaît après le premier ajout d'acétate dans le milieu et sa pente est de plus en plus importante au cours du temps et avec le courant croissant. Ainsi pour le premier pic de densité de courant, l'observation des voltammogrammes à 13, 14 et 15 jours montrent, dans le sens des potentiels positifs, une courbe de type exponentielle à partir de -0,5 V/ECS jusqu'à -0,3 V/ECS. Ce potentiel de -0,5 V/ECS correspond au potentiel d'équilibre du couple $\text{CO}_2/\text{CH}_3\text{COO}^-$ à pH 7. A -0,3 V/ECS, on observe le sommet d'un léger pic d'oxydation et au-delà un palier qui correspond au courant limite, zone de potentiels où la réaction est limitée par la diffusion. Ce courant limite est de 1 A/m² à 13 jours et de 3 A/m² à 15 jours, correspondant aux densités de courant enregistrées à ces mêmes dates sur le

chronoampérogramme. Ce courant limite n'existe plus lors des voltammétries réalisées à 32 et 36 jours.

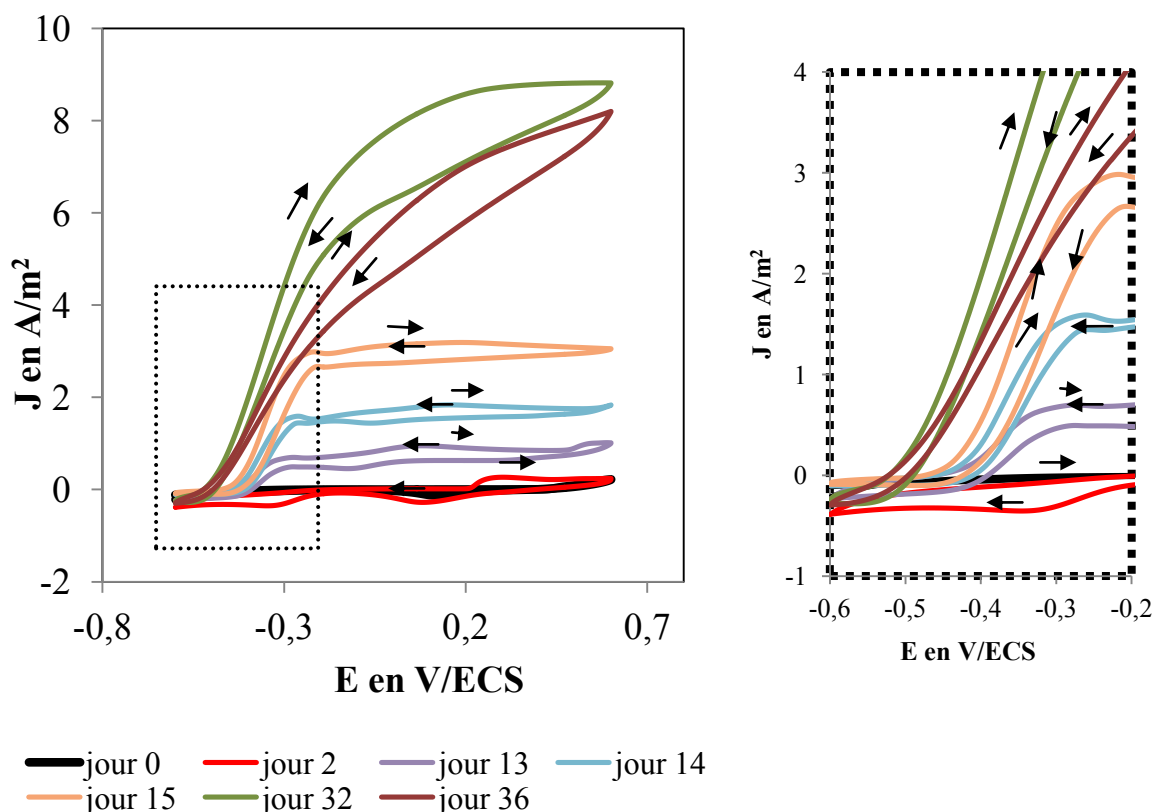


Figure III-25 : voltammogrammes réalisés lors de la chronoampérométrie de la figure III-23. La vitesse de balayage est de 3 mV/s. Les flèches indiquent le sens du balayage en potentiel. Le rectangle en trait discontinu correspond à la zone qui a été zoomée dans le graphe de droite.

Ceci peut s'expliquer par le fait que pendant cette phase, le substrat est renouvelé régulièrement et ne constitue donc pas une limitation pour le système. De plus, la maturité du biofilm augmente, c'est-à-dire que la population bactérienne est croissante dans le biofilm. Par conséquent, les transferts électroniques s'améliorent et la densité de courant augmente passant de 3 à 6 A/m². En comparant les voltammogrammes obtenus à 15 jours et à 32 jours, la surtension anodique diminue jusqu'à s'annuler pour le pic d'oxydation lié à l'acétate et la pente du pic est de plus en plus importante. Cette augmentation s'explique par l'augmentation du pouvoir catalytique du biofilm qui permet une oxydation de l'acétate plus efficace au fur et à mesure du développement du biofilm.

III.2.4.1.1. Signature électrochimique de l'électrode dans le milieu

Afin de définir l'origine des espèces redox dont les pics sont visibles sur les voltammogrammes, des électrodes de travail de même nature sont immergées dans des

milieux témoins. Ainsi, les solutions salines avec ou sans acétate (Figure III-26A) montre une courbe de réduction qui pourrait correspondre à celle du dioxygène dissous (Eq.1). Hormis sur le platine, la réduction de O_2 est une réaction présentant une grande surtension cathodique, ce qui explique que son pic soit observé entre -0,2 et -0,6 V/ECS. Aucun autre pic d'oxydation n'est observé dans la zone des potentiels étudiés. Il est donc possible à ce stade d'éliminer une éventuelle signature du matériau de l'électrode de travail.



$E^\circ = 1,23 \text{ V/ESH}$ soit $E^\circ = 0,989 \text{ V/ECS}$ (à pH 7, $E^{\circ*} = 0,81 \text{ V/ESH}$ soit $0,569 \text{ V/ECS}$)

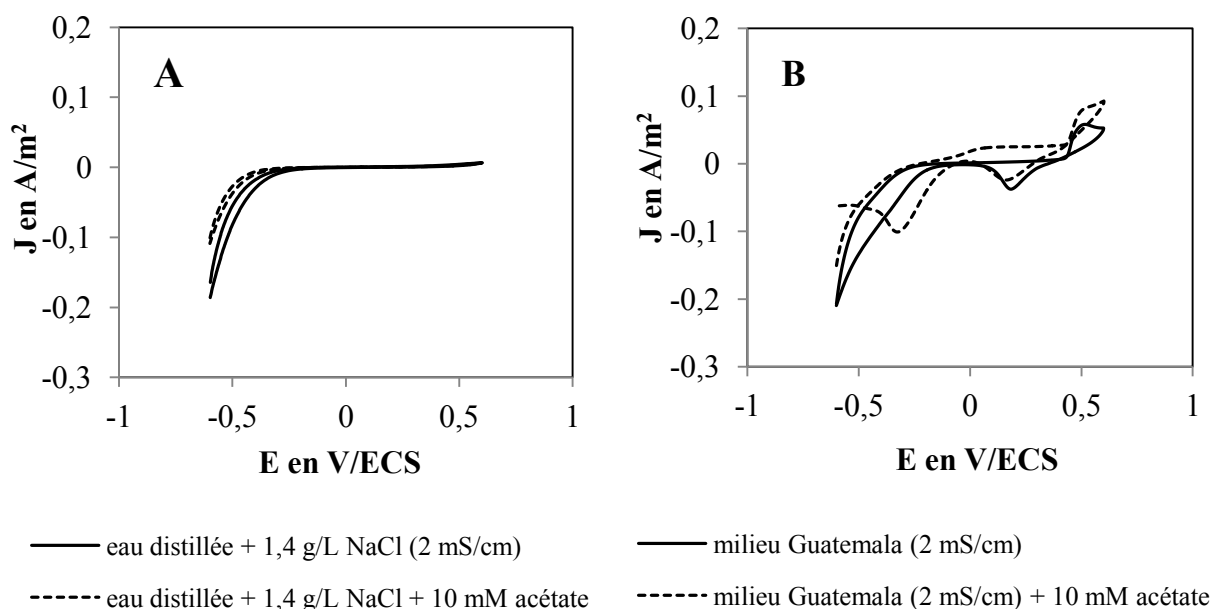


Figure III-26 : Influence du milieu sur la signature électrochimique de l'électrode à t_0 . A : l'électrode de travail est immergée dans une solution saline avec ou sans acétate; B : l'électrode de travail est immergée dans le milieu Guatemala avec ou sans acétate .

Les pics d'oxydo-réduction observés sur les voltammogrammes immédiatement après immersion dans le milieu Guatemala, avec ou sans acétate, sont donc directement liés aux espèces présentes dans ce milieu, autres que les ions Na^+ , Cl^- (figure III-26B). En ce qui concerne les ions CH_3COO^- , il a déjà été montré que leur participation intervient une fois que le biofilm EA est mis en place sur l'électrode.

Seuls deux couples redox sont observés sur les voltammogrammes des électrodes dans les milieux Guatemala. Le premier couple est présent qu'il y ait de l'acétate ou non. Le deuxième couple n'apparaît qu'après un certain laps de temps d'immersion dans le cas du

milieu sans acétate. Le premier couple observé a un potentiel de pic de réduction de 0,2 V/ECS et un potentiel de pic d'oxydation de 0,5 V/ECS. L'autre couple d'espèces électroactives est visible sur le voltammogramme dès le début de l'immersion en présence d'acétate alors qu'il apparaît progressivement dans le cas où l'acétate est absent. Le potentiel du pic cathodique est -0,3 V/ECS et celui du pic anodique est 0 V/ECS.

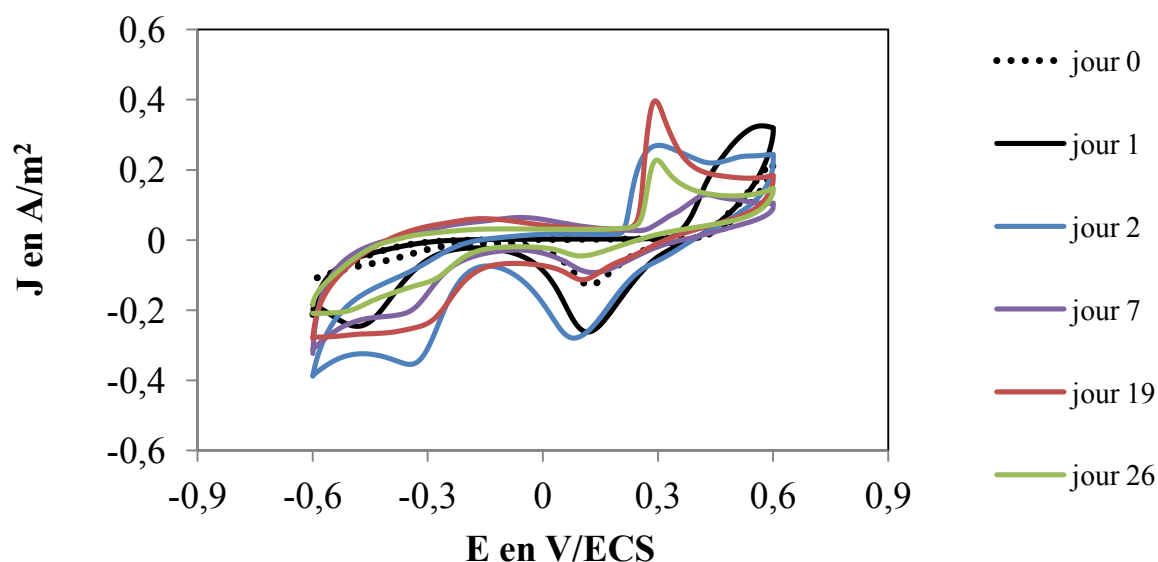


Figure III-27 : Suivi de la signature électrochimique (CV) d'une électrode en tissu de carbone immergée dans un milieu Guatemala. Les jours 0 et 2 correspondent à des moments où de l'acétate n'avait pas encore été ajouté dans le milieu. Les jours 7, 19 et 26 correspondent à des moments où la densité de courant est revenue à 0 A/m² après que tout l'acétate ait été consommé dans le milieu.

Les deux couples redox observés dès le premier jour, sont présents avec plus ou moins d'intensité tout au long des expériences de chronoampérométrie. C'est ce que révèle le suivi des voltammogrammes au cours du temps, en comparant ceux obtenus durant les 3 premiers jours d'immersion sans acétate et ceux des jours pour lesquels la densité de courant est nulle ou quasi-nulle à la suite de la consommation totale de l'acétate. Il est donc possible d'évoquer la signature électrochimique de l'électrode en tissu de carbone dans le milieu Guatemala (figure III-27).

III.3. Identification des espèces bactériennes des biofilms EA

L'étude électrochimique a permis de démontrer que des bactéries capables d'échanger des électrons avec les électrodes sont présentes dans les milieux humides de Guyane telles que les mangroves par exemple. L'étude de ces mêmes biofilms grâce à la biologie moléculaire avait pour objectif de déterminer quelles étaient les espèces bactériennes les composant.

Les résultats de DGGE et d'identification des espèces proviennent des travaux effectués par deux équipes : le LEMIRE sous la direction du directeur de recherche W. Achouak et le L3MA sous la responsabilité du docteur M. de Rivoyre.

Le tableau III-3 rassemble les identifications d'espèces bactériennes qui ont pu être obtenues sur une sélection de biofilms. Elle lie le milieu d'étude, le potentiel de polarisation, la nature de l'électrode, la date de l'étude et le nom des espèces bactériennes identifiées ou ayant un fort pourcentage d'homologie.

D'une façon générale, les biofilms sélectionnés étaient composés d'un consortium bactérien plus ou moins important. Cette étude ne permet pas de déterminer si toutes les bactéries de ces consortia ont un rôle dans la génération du courant. Les pourcentages d'homologie obtenus pour les espèces bactériennes ont été le plus souvent inférieurs à 90%, empêchant de conclure sur leur nature. Ceci peut s'expliquer par des facteurs techniques mais pas seulement. En effet, la microbiologie des sols des milieux humides de Guyane fait l'objet de peu d'articles. Il est probable que peu d'espèces de ces zones humides n'aient été enregistrées dans les bases de données utilisées pour l'identification ou identifiées.

En regardant l'ensemble des espèces identifiées, certains biofilms présentent des espèces bactériennes déjà référencées comme étant électroactive (EA). *Pseudomonas aeruginosa*, présente dans le biofilm n°4, est impliquée dans des réactions anodiques et cathodiques [55,172]. A l'anode, elle fait intervenir des médiateurs tels que des phénazines ou des pyocyanines alors qu'à la cathode, elle récupère les électrons directement à la surface de l'électrode en utilisant des protéines trans-membranaires. Le genre *Pseudomonas* est présent sur 4 des biofilms sélectionnés, obtenus à partir du milieu Guatemala.

L'espèce *Geobacter metallireducens* est une espèce connue pour réduire les oxydes solides de fer III en se connectant directement à leur surface [173]. Elle est déjà référencée pour réduire le nitrate avec pour seul accepteur d'électron la cathode d'une PACM [26] ou encore pour oxyder un composé aromatique comme le toluène transférant les électrons à une bioanode [25]. Elle est présente majoritairement sur le biofilm n°7 issu du milieu Kourou et présente 93% d'homologie avec une bactérie du biofilm n°9 issu du milieu Larivot. Ces deux milieux sont situés dans des ports qui présentent des coques de bateau soumises à la corrosion ou encore des infrastructures métalliques (ponts et passerelles).

Tableau III-3 : Tableau récapitulatif des espèces bactériennes identifiées dans les biofilms EA au cours de la thèse.

N°	Milieu	Date de prélèvement et informations	Potentiel V/ECS	Matériau de la WE	Espèces bactériennes identifiées (% d'homologie)	
1	Guatemala	Décembre 2009	+0,2	Graphite	- <i>Shewanella</i> sp. (94 – 100%) - <i>Pseudomonas</i> sp. (93%) - <i>Desulfuromonas</i> sp. (96%)	
2	Guatemala	Décembre 2009	+0,2	Graphite	- <i>Shewanella</i> sp. (96 – 99%) - <i>Pseudomonas</i> sp. (94%) - <i>Desulfuromonas</i> sp. (93%)	
3	Guatemala	Décembre 2009	-0,2	Acier inox 254 SMO	- <i>Pseudomonas</i> sp. (98 – 99%) - <i>Citrobacter</i> sp. (75%) - <i>Azospirillum</i> sp. (76%)	
4	Guatemala	Septembre 2010	-0,2	Tissu de carbone	- <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (96%) - <i>Parabacteroides</i> sp. (97%)	Biofilm fils : - <i>Desulfovibrio vulgaris</i> (91%)
5	Guatemala	Septembre 2010	-0,2	Tissu de carbone	- <i>Aminomonas paucivorans</i> (92%) - <i>Thermovirga</i> sp. (89%) - <i>Nitrincola laciponensis</i> (99%) - <i>Shewanella decolorationis</i> (95%)	Après transfert et non polarisée : - <i>Alkaliphilus metalliredigens</i> (94%)
6	Guatemala	2 ^{ème} colonisation à partir du milieu	-0,2	Tissu de carbone	- <i>Pelobacter propionicus</i> (96%)	
7	Kourou	Mars 10	-0,2	Graphite	- <i>Geobacter metallireducens</i> (99%)	
8	Mahury	Mars 10	-0,2	Graphite	- <i>Aeromonas hydrophila</i> (85%) - <i>Shewanella putrefaciens</i> (94%) - <i>Desulfuromonas acetexigens</i> (97%)	
9	Larivot	Octobre 2010 Eau distillée et boue du milieu	-0,2	Tissu de carbone	- <i>Desulfarculus baarsii</i> (79%) - <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (81%) - <i>Deftia acidovorans</i> (81%) - <i>Geobacter metallireducens</i> (93%)	
10	Larivot	Octobre 2010 Eau et boue du milieu	-0,2	Tissu de carbone	- <i>Marinobacterium stanieri</i> (93%) - <i>Marinomonas mediterranea</i> (86%) - <i>Pelobacter carbonolicus</i> (85%) - <i>Marinobacter</i> sp. (79%) - <i>Sphingobacterium</i> sp. (84%)	
11	Larivot (eau) 10/2010	Biofilm préformé Guatemala (septembre 2010)	-0,2	Tissu de carbone	- <i>Roseobacter</i> sp. (98%) - <i>Sphingobacterium</i> (84%)	
12	Larivot (eau + boue du site) 10/2010	Biofilm préformé Guatemala (septembre 2010)	-0,2	Tissu de carbone	- <i>Spirochaeta caldaria</i> (92%)	

G. metallireducens fait partie de la famille *Geobacteraceae* comme un autre genre présent, *Desulfuromonas*. Ces espèces sont aussi des bactéries dissimilatrices du fer III. Le

Desulfuromonas est présent sur 2 électrodes en graphite immergées dans le milieu Guatemala et sous sa forme *D. acetexigens* sur le biofilm Mahury. Dans ce même biofilm (milieu Mahury), deux autres espèces EA lui sont associées : *Aeromonas hydrophila* et *Shewanella putrefaciens*. La première est supposée utiliser des mécanismes de transfert direct [28]. La deuxième utiliseraient des mécanismes directs par l'action des cytochromes et indirects grâce à la production de médiateurs [72,174]. Le genre *Shewanella* est associé dans 3 biofilms au genre *Desulfuromonas* (biofilms n°1, 2 et 8), laissant supposer qu'elles pourraient agir en synergie.

Le genre *Pelobacter*, qui apparaît sur les biofilms n°6 et 10 contient des espèces qui sont capables de réduire le fer mais surtout de participer à la fermentation de l'éthanol en formant de l'acétate. *P. propionicus* a été référencée pour coloniser majoritairement les anodes de PACM nourries à l'acétate [175] et celles nourries à l'éthanol [176]. Dans ces dernières, elle agit en synergie avec d'autres bactéries capables de respirer l'anode comme les *Geobacter*.

D'autres espèces bactériennes sont présentes dans les biofilms. L'état actuel de notre recherche ne permet pas de définir si elles ont un rôle dans la génération de courant ou si elles sont électroactives. Toutefois, une comparaison des profils de certains biofilms apportent quelques informations supplémentaires. Ainsi les biofilms, formés ou réintroduits dans un milieu contenant de l'eau du site – eau de l'estuaire Larivot en particulier – indique la présence de bactéries vivant dans l'eau de mer contrairement aux populations qui ressortent dans les biofilms obtenus dans des mélanges de boue et d'eau distillée.

Par exemple, les genres *Marinobacterium*, *Marinomonas*, *Marinobacter* sont présents sur le biofilm n°10 qui a été formé dans un mélange d'eau et de boue de la mangrove d'estuaire du Larivot. Le biofilm n°9, formé en parallèle dans un mélange d'eau distillée et de boue du même site, présente au contraire des genres bactériens des sédiments comme *Desulfarculus*. Le biofilm n°11, pourtant obtenu en milieu Guatemala dans lequel aucune bactérie d'eau de mer n'a été détectée, montre la présence de *Roseobacter* après son immersion dans de l'eau du Larivot.

La méthodologie d'étude des biofilms EA mise en place a permis de donner un premier aperçu des communautés bactériennes présentes. Toutefois, la complexité des biofilms qui ressort lors de l'observation des profils DGGE, empêche de conclure sur l'électroactivité des

bactéries présentes. L'analyse doit porter sur chacune des bactéries présentes dans le biofilm et sur les interactions qui peuvent exister entre elles. Il peut s'agir de cohabitation, de synergie ou de compétition.

III.4. Conclusion

Au cours de cette étude, plusieurs sites en Guyane ont permis de former des biofilms EA à partir de leur flore bactérienne endogène : 2 types de mangrove (estuaire et littoral), 1 crique et 1 forêt marécageuse d'arrière-plage. C'est sur le site de la mangrove du lieu-dit Guatemala qu'ont porté l'essentiel des études, notamment en raison de son accessibilité, de l'abondance de la matière première et de la faible influence de la présence humaine. Ces études ont permis d'optimiser les paramètres de formation des biofilms EA.

Le même inoculum a permis d'obtenir des biofilms EA capables de fournir des électrons à une électrode (anode) ou de récupérer les électrons provenant d'une électrode (cathode). Le potentiel d'électrode de -0,2 V/ECS a notamment permis d'obtenir les 2 types de comportement en fonction du substrat apporté dans le milieu électrolytique : acétate pour le cas anodique et oxygène pour le cas cathodique.

Les étapes d'optimisation du protocole de formation de biofilms EA de type anodique – c'est-à-dire l'amélioration du positionnement des électrodes, l'augmentation de la surface spécifique des électrodes de travail et la mise au point d'un apport continu de substrat – ont été autant de facteurs qui ont permis l'amélioration des performances des biofilms EA. Ainsi, des densités de courant de l'ordre de 8 à 12 A/m² et des bilans faradiques de l'ordre de 18 à 25 % ont pu être obtenus par la formation de biofilms EA, nourris régulièrement à l'acétate, sur des électrodes en tissu de carbone polarisées à -0,2 V/ECS. Cette optimisation de la procédure a d'ailleurs fait l'objet d'une publication dans le journal Bioresource Technology [177].

L'étude des populations bactériennes a montré la présence d'espèces déjà connues pour leurs propriétés électroactives, telles que *Geobacter metallireducens* ou *Pseudomonas aeruginosa*. Cependant, d'autres bactéries dont les espèces ont été identifiées ou non, composent les consortia bactériens formés sur les électrodes. Les travaux d'identification des espèces n'ont pas encore permis de tout révéler et des études électrochimiques à partir des cultures pures de ces bactéries devront être réalisées afin de définir leur rôle dans la génération de courant.

**Chapitre IV. Etude des biofilms EA en piles à
combustible microbiennes à compartiment
unique et cathode à air**

IV.1. Introduction

Une autre approche pour former des biofilms EA consiste à utiliser directement un milieu contenant les bactéries EA et les substrats à dégrader dans une PACM. Dans ce cas, contrairement à la chronoampérométrie décrite au chapitre III, les conditions électrochimiques ne sont plus contrôlées. En effet, le potentiel des électrodes s'instaure naturellement du fait de l'adhésion du biofilm et des processus redox ayant lieu dans le milieu. Le présent chapitre ainsi que le chapitre V proposent l'utilisation de 2 architectures de PACM et étudient leurs performances lors de leur utilisation avec les milieux d'étude décrits dans cette thèse.

Le premier prototype exploité et présenté dans ce chapitre est une PACM à compartiment unique et à cathode à air. Dans ce type de pile, le compartiment unique contient le milieu anodique dans lequel se produisent les mécanismes de dégradation de la matière organique et, par conséquent, le transfert électronique vers l'anode par le biofilm EA développé sur sa surface. La cathode est abiotique et met en jeu la réduction du dioxygène de l'air avec les électrons qu'elle reçoit de l'anode. Elle est chargée en platine qui agit comme un catalyseur de la réduction. Le choix d'une PACM à compartiment unique et à cathode à air a donc permis de se concentrer uniquement sur la formation de bioanode, simplifiant dans un premier temps les paramètres à étudier.

Les objectifs de cette étude sont de :

- Vérifier la possibilité d'obtenir des biofilms EA de type anodique en conditions électrochimiques non contrôlées ;
- Concevoir un prototype de PACM à cathode à air fonctionnant à partir de la flore bactérienne endogène d'une mangrove issue de notre présélection ;
- Etablir un protocole d'étude et de comparaison des PACM à partir des techniques électrochimiques à notre disposition.

IV.2. Descriptif des PACM utilisés au cours des essais

Le dispositif utilisé dans ce chapitre est celui décrit dans les matériels et méthodes (chapitre II). Plusieurs paramètres ont varié au cours de l'étude et sont répertoriés dans le tableau IV-1. Dans la suite du chapitre, les piles seront identifiées par leur numéro donné dans le tableau. Toutes les piles de ce chapitre sont connectées dès le temps initial à une résistance externe de 1000 Ω .

Tableau IV-1 : Paramètres des piles testées au cours de la thèse et présentées dans ce document.

N° pile	Chargement en platine	Liant de la couche catalytique	Membrane	Forme du collecteur en titane	Concentration initiale en acétate	Données complémentaires
1	1,5 mg Pt/cm ²	60 % PTFE	Nafion 117 pressé manuellement	Tige	43 mM	
2	0,5 mg Pt/cm ²	Nafion	Nafion 117 thermocollé	Grille	10 mM	
3	0,5 mg Pt/cm ²	20 % PTFE	Membrane anionique	Grille	10 mM	
4	0,5 mg Pt/cm ²	Nafion	Nafion 117 thermocollé	Grille	10 mM	la bioanode de la pile 2 est placée à côté de l'anode

IV.3. Comportement des électrodes et influence du substrat pendant le fonctionnement

Immédiatement après le démarrage de la pile n°1 (tableau IV-I), la tension de la pile initiale est nulle et les deux électrodes sont au même potentiel de 380 mV/ECS (figure IV-1). L'étude de la courbe $U_{pile} = f(t)$ indique une augmentation de la tension en fonction du temps. Son évolution ressemble à celle de la densité de courant lors des essais en chronoampérométrie. Tout d'abord, un temps de latence pendant lequel les potentiels des 2 électrodes évoluent en même temps, passant de 380 à 210 mV, et U_{pile} reste nulle. Les courbes $E_a = f(t)$ et $E_c = f(t)$ présentent une pente assez abrupte qui correspond à une évolution spontanée du potentiel du matériau carbone dans le milieu Guatemala.

Une deuxième phase commence à 0,8 jour et correspond à la formation du biofilm sur l'anode. La pente diminue pour les 2 courbes E_a et E_c en fonction du temps et les 2 potentiels commencent à se différencier. E_a décroît plus vite que E_c , certainement par l'action catalytique des bactéries du biofilm EA.

Pendant la troisième phase, E_a et E_c atteignent un palier à -480 mV/ECS pour l'anode et +20 mV/ECS pour la cathode. Ces potentiels correspondent bien à ceux habituellement trouvés dans la littérature (cf. chapitre I). Un palier est observable également pour la tension de la pile qui se stabilise à 500 mV. Cette dernière est caractéristique de la pile en fonctionnement et de la dégradation par les microorganismes de l'acétate dans l'anolyte. D'ailleurs, une fois tout l'acétate consommé, la tension de la pile chute rapidement de sa

valeur maximale à 50 mV. Cette chute correspond à un gap de potentiel de +430 mV/ECS pour E_a alors que E_c ne varie que de 80 mV/ECS. Un nouvel ajout d'acétate dans le compartiment anodique, cette fois de 10 mM, entraîne une nouvelle augmentation abrupte de U_{pile} qui atteint un palier inférieur au précédent avec une valeur de 440 mV/ECS.

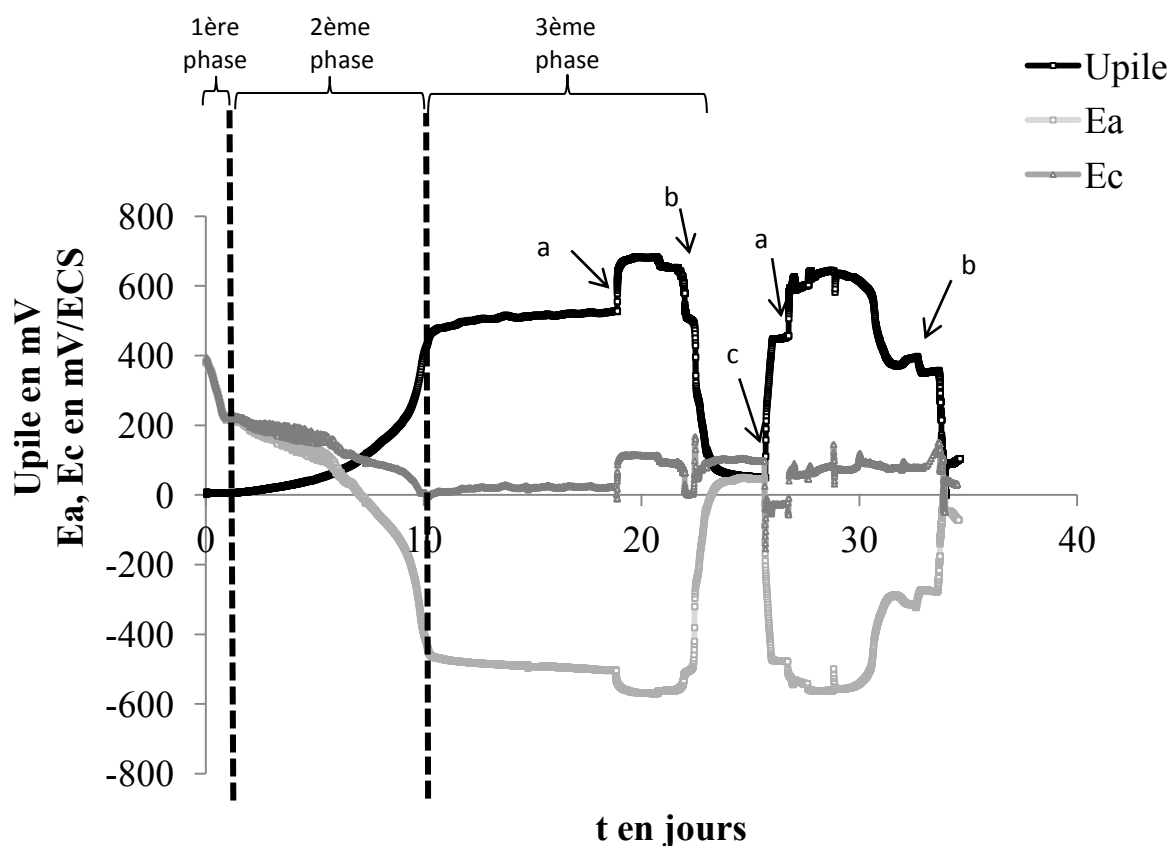


Figure IV-1 : U_{pile} , E_a et E_c de la PACM n°1 en fonction du temps. a : modification de la valeur de R_{ext} à 10000 Ω ; b : la valeur de R_{ext} redevient 1000 Ω ; c : ajout de 10 mM d'acétate de sodium dans le compartiment anodique.

Les résultats montrent que l'activité biocatalytique du biofilm E_a sur l'anode influe fortement sur U_{pile} . En ce qui concerne la cathode à air, une fois son potentiel stabilisé, ce dernier varie peu au cours du temps. La concentration en acétate plus importante implique une valeur de palier plus importante pour U_{pile} .

IV.4. Influence du type de la membrane : anionique ou cationique

Lors de l'étude des biofilms EA en conditions électrochimiques contrôlées (chapitre III), l'observation du pH des milieux avait révélé que ce dernier tendait vers 9 au cours du temps. L'utilisation d'une membrane échangeuse de protons dans les piles soulève alors des questions. N'est-il pas plus intéressant favoriser le passage des ions OH^- plutôt que celui des

H^+ ? Les protons transférés avec l'utilisation d'une membrane Nafion ne proviennent-ils pas de la membrane elle-même, qui constituerait alors un réservoir de protons ?

Afin de tenter de répondre à ces questions, une expérience comparative est menée sur 2 PACM munies chacune d'une membrane différente : la PACM n°2 avec une membrane échangeuse de cations (Nafion) et la PACM n°3 avec une membrane échangeuse d'anions.

L'observation de la tension U_{pile} en fonction du temps et des ajouts d'acétate montre que la pile n°2 débite plus longtemps que la pile n°3 avec la même quantité d'acétate (figure IV-2). Par ailleurs, les valeurs maximales de U_{pile} de la pile n°2 sont légèrement inférieures à celles de la pile n°3 avec la membrane anionique.

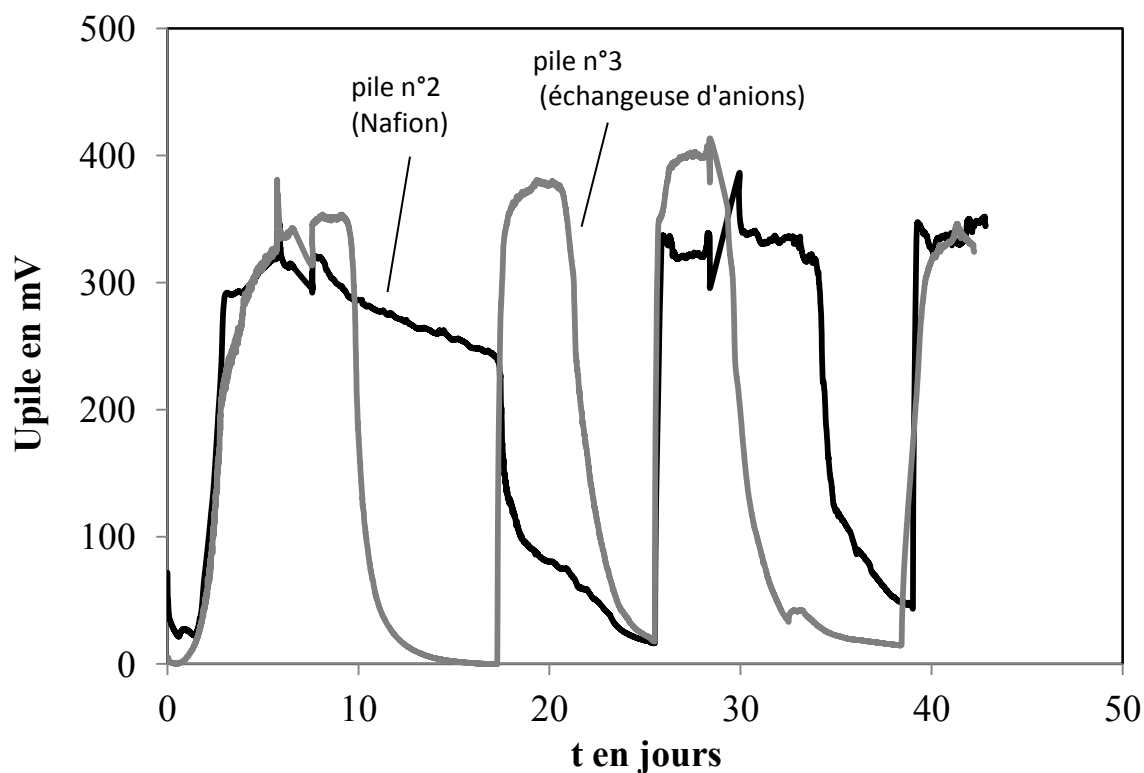


Figure IV-2 : influence du choix de la membrane dans les piles n°2 et n°3, cationique et anionique respectivement.

Afin de mieux caractériser les 2 piles, les courbes de polarisation et de puissance sont réalisées après 28 jours de fonctionnement pour les 2 piles (figure IV-3). La résistance interne estimée et la puissance maximale débitée sont plus importantes pour la pile n°3 qui utilise la membrane anionique : 380Ω au lieu de 350Ω et 140 mW/m^2 au lieu de 106 mW/m^2 . Toutefois, le courant généré aux faibles résistances externes (région des faibles tensions sur la

courbe de polarisation) est plus élevé dans le cas de la pile n°2 qui utilise une membrane cationique : 630 mA/m^2 au lieu de 370 mA/m^2 .

Les courbes de polarisation anodique et cathodique, effectuées à partir des potentiels E_a et E_c des électrodes permettent de démontrer que les différences liées au type de membrane sont essentiellement ressenties sur la bioanode (figure IV-4). En effet, les courbes de polarisation cathodiques sont similaires pour les piles n°2 et n°3 et ne présentent pas de perturbations en fonction du potentiel. A contrario, les profils anodiques sont très fortement perturbés, notamment dans la zone des courants plus importants, et le potentiel anodique à courant nul est différent.

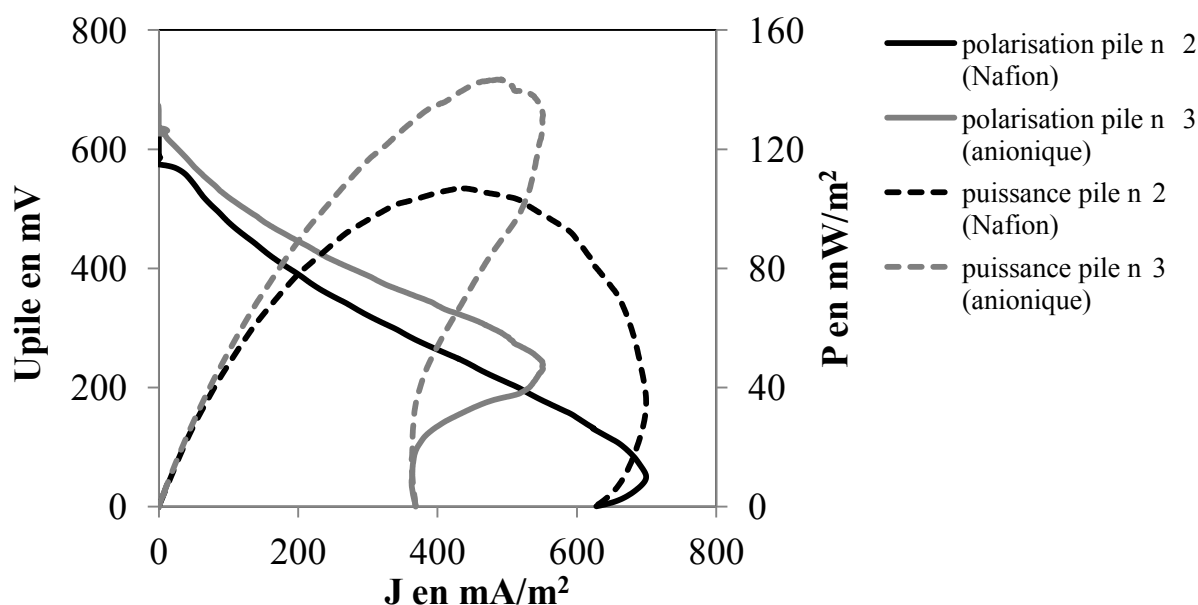


Figure IV-3 : courbes de polarisation et de puissance à 28 jours des piles n°2 et n°3

L'hypothèse la plus probable pouvant expliquer ces différences est que l'utilisation de la membrane anionique limite le passage des protons du compartiment anodique vers la cathode entraînant une accumulation de H^+ autour de l'anode. Cette accumulation aurait plusieurs conséquences :

- l'acidification de l'anolyte observé par le déplacement des potentiels d'équilibre des mécanismes redox ayant lieu à l'anode. Or, un pH alcalin permet de meilleures interactions entre les bactéries EA et l'électrode ainsi qu'un transfert électronique plus rapide pour le biofilm anodique [178,179] ;

- la limitation physique de l'accès de l'acétate autour de l'anode. Ce phénomène peut expliquer les pertes de concentration enregistrées pour la pile n°2. Ces pertes sont d'autant

plus importantes que la résistance externe est faible. En effet, il a été démontré qu'une R_{ext} faible favorisait les échanges électroniques entre le biofilm EA et l'électrode [160,180].

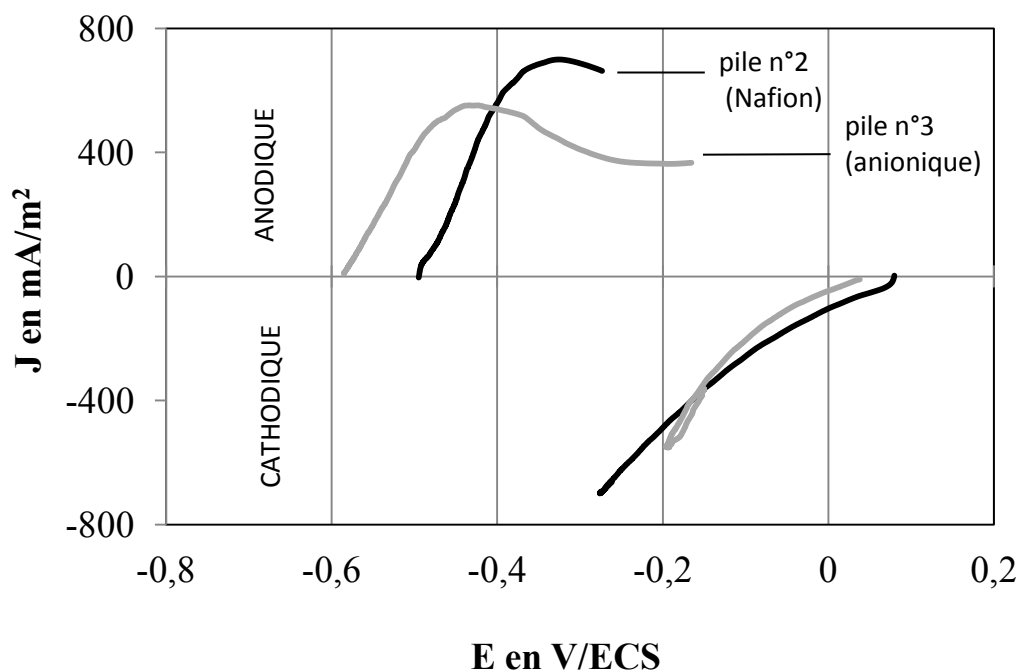


Figure IV-4 : Courbes de polarisation anodiques et cathodiques des piles n° 2 et n° 3 après 28 jours de fonctionnement.

En conclusion, les résultats démontrent que l'utilisation de la membrane échangeuse de protons favorise la production d'un courant plus important et plus durable ainsi que la mise en place d'une résistance interne plus faible. Par ailleurs, la membrane échangeuse d'anions qui devrait limiter la circulation des protons entraînant une acidification de l'anolyte et une inhibition des transferts électroniques permet d'obtenir la puissance maximale la plus importante et n'affecte pas la réduction cathodique.

IV.5. Evolution du biofilm sur l'électrode au cours du temps

La caractérisation des PACM au cours du temps permet de mettre en évidence l'évolution du biofilm EA à la surface de l'anode.

Ainsi, les performances en puissance et en courant de la pile n°2 au cours du temps se sont améliorées (figure IV-5). La puissance maximale de la pile évolue de 106 mW/m² à 131 mW/m², respectivement à 28 jours et à 42 jours de fonctionnement. Cette augmentation de la puissance s'accompagne d'une baisse de la résistance interne R_{int} du système, de 354 Ω à 254 Ω . Les échanges électroniques étant facilités grâce à une R_{int} plus faible, le courant maximal

généralisé passe de 600 mA/m^2 à 1140 mA/m^2 . L'observation des profils anodique et cathodique indique que cette amélioration des performances se traduit par une modification du comportement anodique (figure IV-6). En effet, la pente de la courbe de polarisation anodique augmente significativement et ne présente plus d'instabilité à 42 jours aux valeurs faibles de résistances. De plus, lorsque la pile est en circuit ouvert, E_a se déplace vers les potentiels plus négatifs à 42 jours alors que E_c ne change pas entre 28 jours et 42 jours. Ceci permet l'augmentation d' U_{pile} en circuit ouvert de 415 mV à 446 mV.

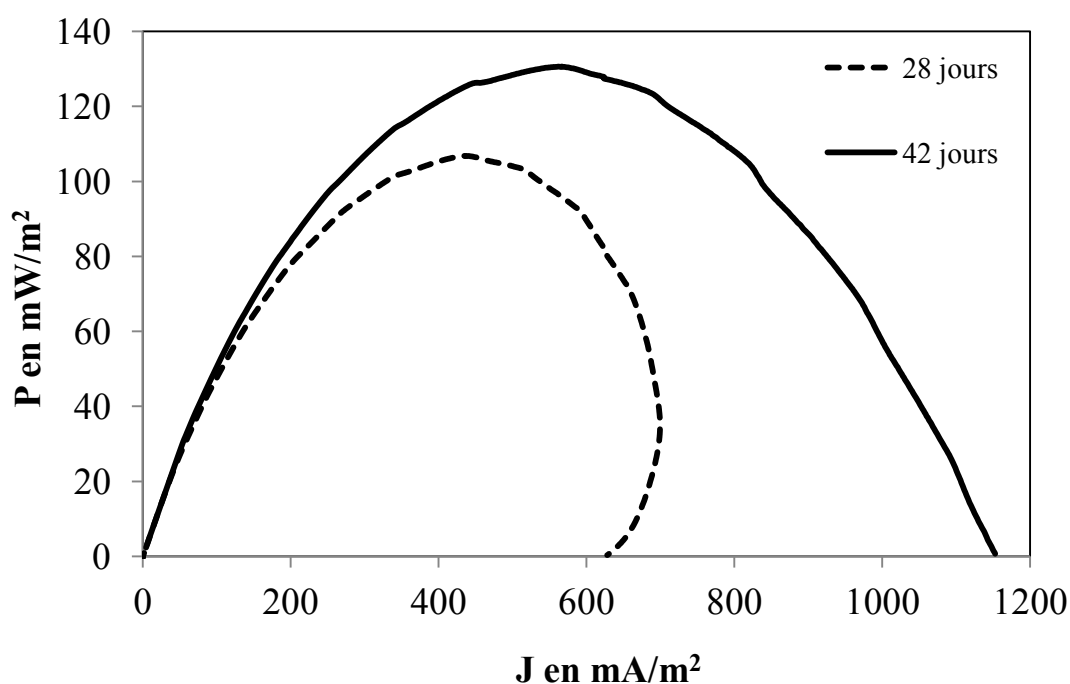


Figure IV-5 : courbes de puissance obtenues après 28 jours et 42 jours de fonctionnement de la pile n°2.

Ces résultats montrent que les performances de la pile, mesurées dans cette expérience, sont directement liées à la formation du biofilm EA à l'anode. En effet, il a déjà été démontré dans le chapitre III, que le développement du biofilm à la surface de l'électrode et les ajouts successifs de substrat permettaient d'augmenter la génération de courant dans le cas d'une cellule électrochimique. Le même effet se retrouve avec la pile où une amélioration des performances catalytiques du biofilm permet l'abaissement de la résistance interne de la pile et l'augmentation du courant et celle de la puissance maximale.

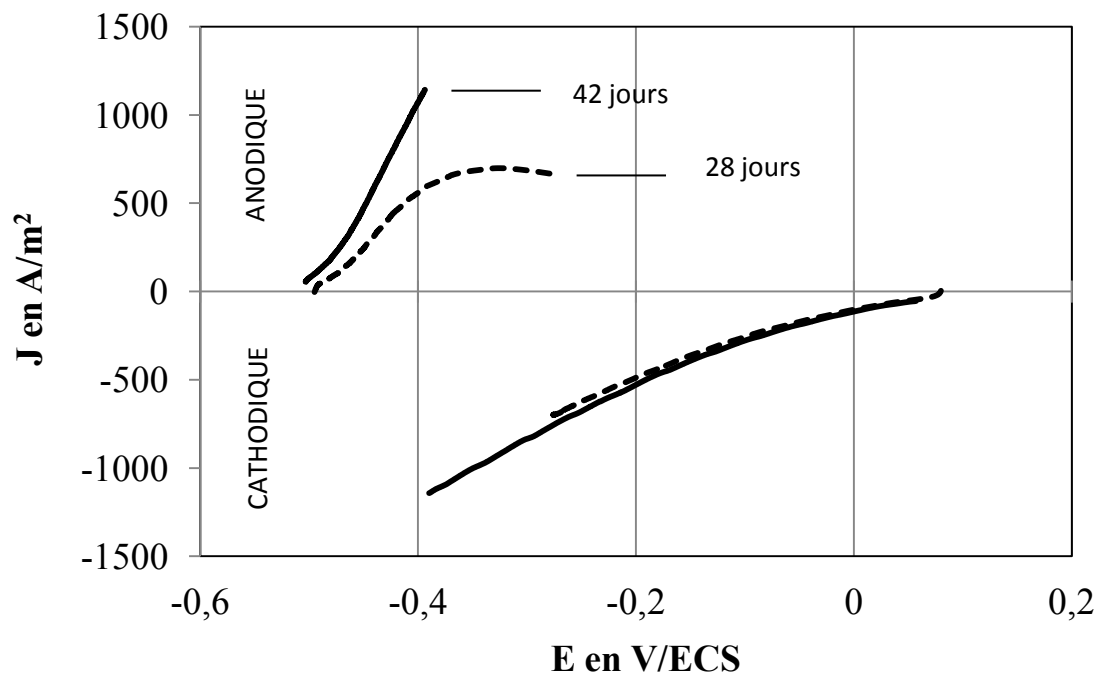


Figure IV-6 : courbes de polarisation anodiques et cathodiques de la pile n°2 après 28 jours (trait gris) et 42 jours (trait noir) de fonctionnement.

IV.6. Bioanode de 2^{ème} génération

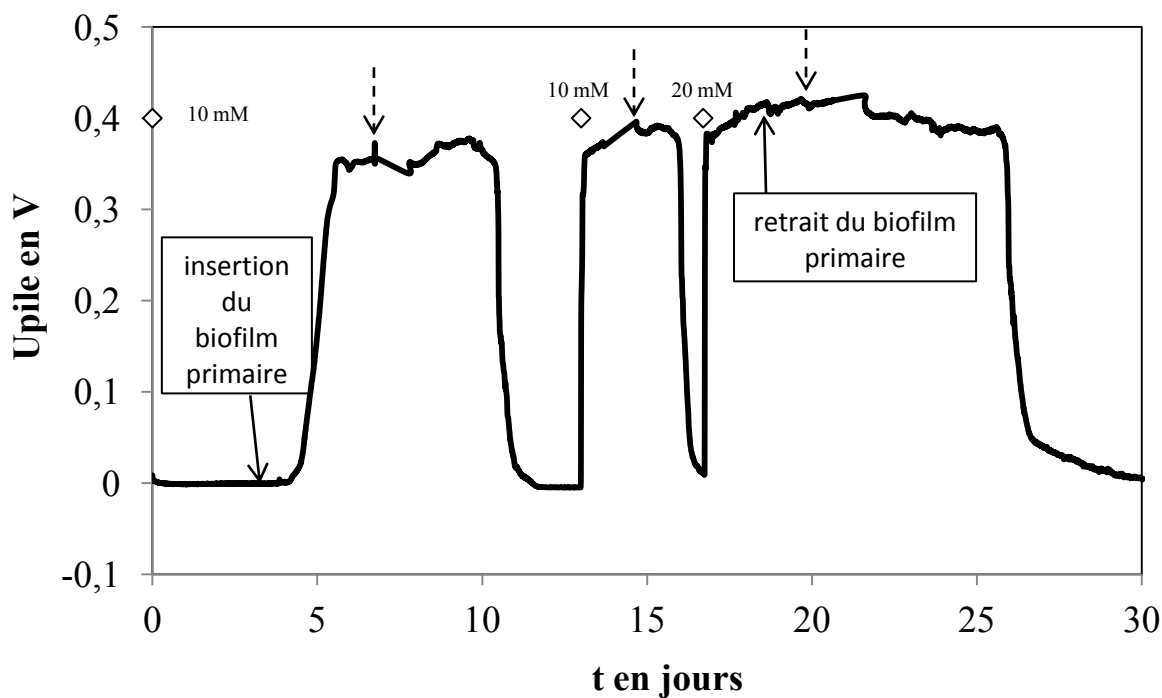


Figure IV-7 : Influence du biofilm de la bioanode de la PACM n°2 sur le fonctionnement de la PACM n°4 dont l'anolyte est stérile. Les losanges indiquent les ajouts d'acétate dans le milieu. La concentration en acétate est indiquée à côté de chaque losange. --> indiquent les jours de réalisation des polarisations linéaires de la pile à 7 jours, 14 jours et 21 jours.

Le compartiment anodique de la pile n°4 est rempli avec du filtrat Guatemala autoclavé. Aucune activité électrochimique n'est observée lors des premiers jours de fonctionnement malgré la connexion d'une résistance de 1000 Ω entre l'anode et la cathode (figure IV-7). Après 3 jours, la bioanode de la pile n°2 est introduite dans le compartiment anodique de la pile n°4, sans être connectée au circuit électrique et à 4 cm de l'anode déjà en place. Quelques heures plus tard, une tension est alors délivrée par la pile n°4 jusqu'à atteindre un plateau de 360 mV à 5 jours. Un biofilm EA s'est donc développé sur l'anode de la pile n°4 à partir de la communauté bactérienne présente sur la bioanode d'une autre PACM, la n°2.

Tableau IV-2 : Principaux résultats des courbes de polarisation et de puissance de la PACM n°2 à 42 jours et de la PACM n°4 à 7 jours, 14 jours et 21 jours.

N° pile	Durée de fonctionnement	$P_{\max}$ (mW/m ²)	R_{int} (Ω)	$J_{\max}$ (mA/m ²) (court-circuit)
2	42 jours	131	254	1153
4	7 jours	87	670	172
4	14 jours	129	246	346
4	21 jours	182	205	1484

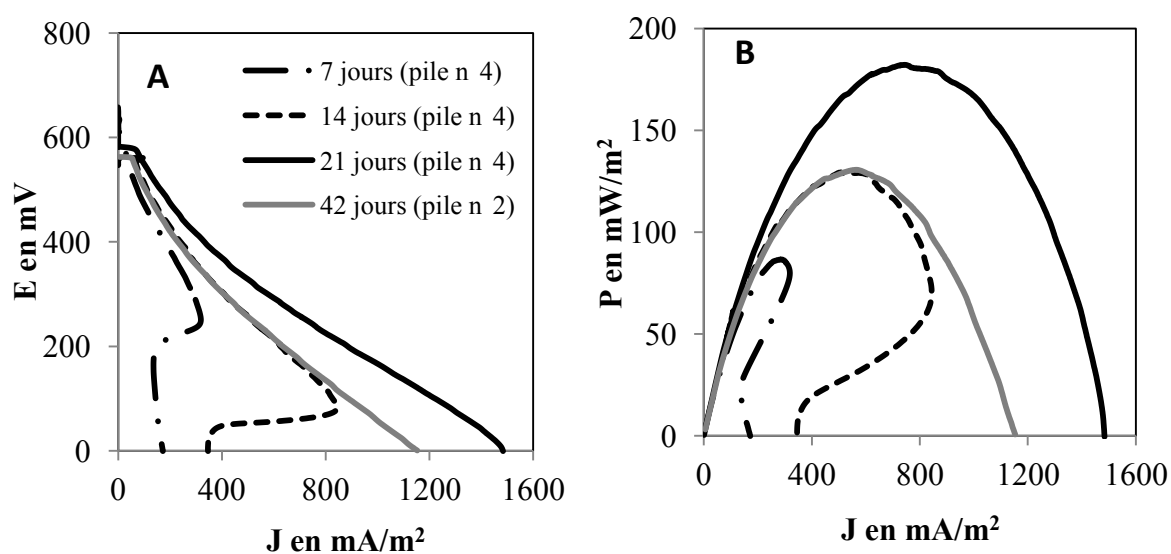


Figure IV-8 : Evolution des courbes de polarisation (A) et de puissance (B) de la pile n°4 au cours du temps et comparaison avec les courbes de la pile n°2 après 42 jours (en gris).

Après 18 jours de fonctionnement, la bioanode primaire (pile n°2) est enlevée du compartiment anodique. La pile continue de fonctionner normalement, montrant alors que les 2 biofilms EA fonctionnent indépendamment. La nouvelle bioanode possède donc tous les éléments nécessaires pour fournir des électrons dans la pile, tout comme la bioanode primaire.

Des courbes de polarisation ont été acquises au 7^{ème}, 14^{ème} et 21^{ème} jours avec la pile n°4. Comme pour la pile n°2, $P_{\max}$ et J_{pile} augmentent avec le temps et la formation du biofilm sur l'anode alors que les pertes de concentration et R_{int} diminuent (figure IV-8 et tableau IV-2).

Après 21 jours de fonctionnement, la PACM n°4 avec la bioanode de 2^{ème} génération permet d'obtenir de meilleure performance que la pile n°2 à 42 jours. La méthodologie employée a donc permis d'améliorer l'efficacité du biofilm EA formé sur la bioanode.

IV.1. Analyses MEB

Une analyse du biofilm formé sur la bioanode de la pile n°4 a été effectuée par microscopie électronique à balayage (figure IV-9). Comme dans le cas des biofilms obtenus par polarisation sur les électrodes en tissu de carbone, le biofilm sur la bioanode consiste en une substance recouvrant les fibres de carbone (figure IV-9A). Une analyse des échantillons par EDX a permis d'identifier les éléments chimiques composant le biofilm (figure IV-9B).

L'analyse révèle que l'aluminium, le silicium et l'oxygène sont les constituants principaux de l'échantillon. Ces éléments composent les alumino-silicates, autrement dit l'argile, ou encore le sable de formule SiO_2 , composants des sédiments. Les éléments sodium, chlore, potassium et magnésium sont les constituants de trois sels présents en milieux marins : NaCl , KCl et MgCl_2 . Le carbone peut être attribué à la fois aux fibres de carbone mais également à des molécules organiques et aux microorganismes présents dans le biofilm. L'oxygène lui aussi est un constituant des composés organiques. Le fer, enfin, est un élément connu pour être présent dans les milieux sédimentaires. Il est utilisé comme accepteur d'électron solide par les bactéries du genre *Geobacteraceae*, connues pour se développer sur les anodes de PACM.

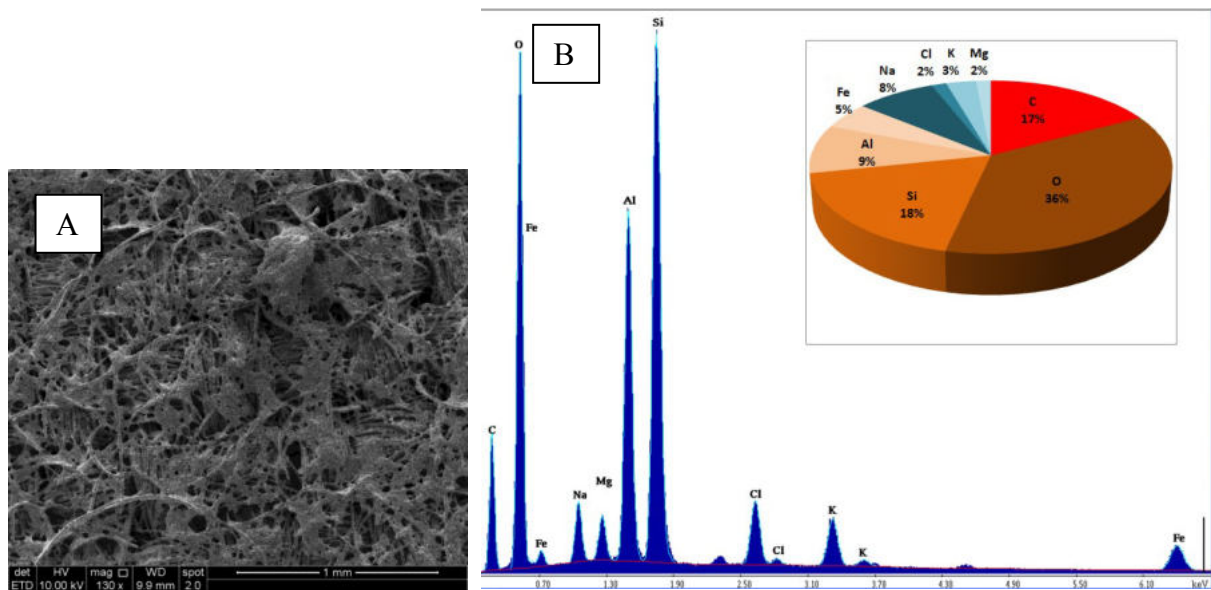


Figure IV-9 : Image MEB réalisé du biofilm sur la bioanode de la pile n°4 (A) et analyses EDX et pourcentages des éléments chimiques le constituant (B).

Des images MEB à fort grandissement réalisés sur la bioanode ont mis en évidence la présence d'une multitude de bactéries dans le biofilm et sur les fibres du tissu carbone (figure IV-10). Dans le cas de la pile n°4, le biofilm anodique a été formé dans un filtrat de boue contrairement à la plupart des essais où le milieu était un mélange de sédiments et d'eau. L'élimination de la majorité des sédiments a permis d'obtenir des biofilms un peu moins complexe structuralement parlant mais surtout moins chargé en masse sédimentaire. Cet allègement du milieu a facilité l'observation des bactéries sur les fibres de carbone de l'électrode en tissu.

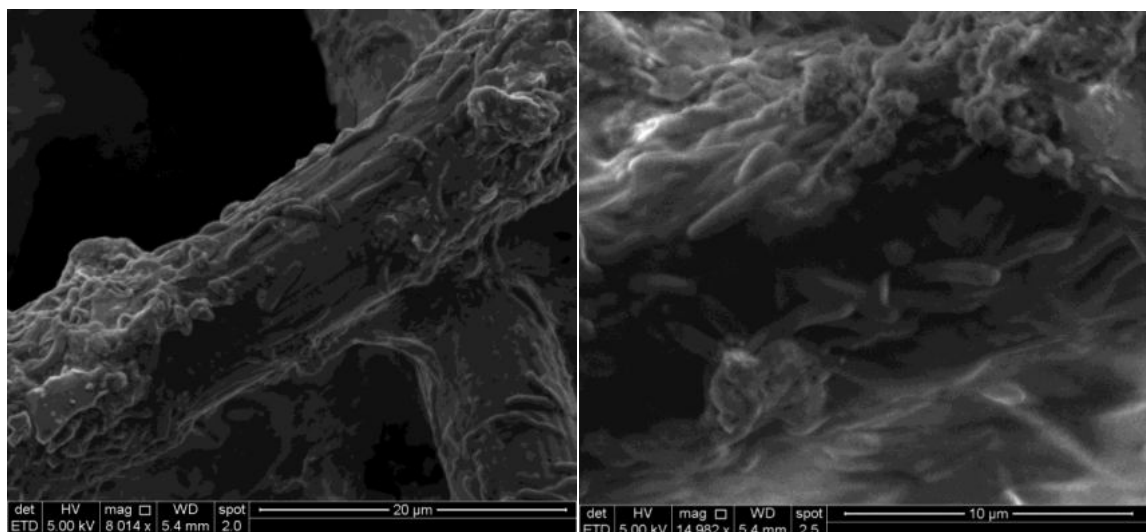


Figure IV-10 : Photographies MEB des bactéries recouvrant la bioanode de la pile n°4.

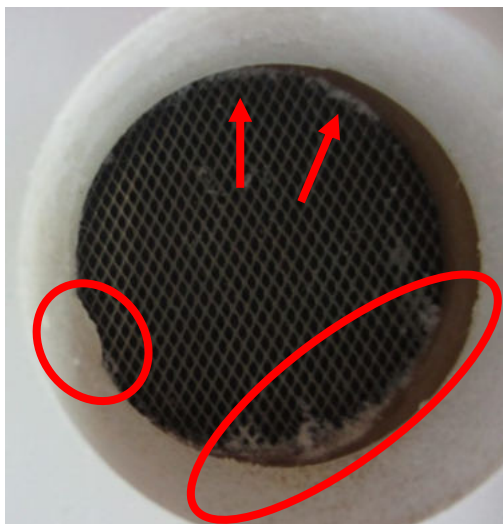


Figure IV-11 : Photographie du collecteur en titane après plusieurs jours de fonctionnement de la PACM n°4. Des dépôts solides blancs d'oxyde de sodium sont mis en évidence par les flèches et les cercles rouges.

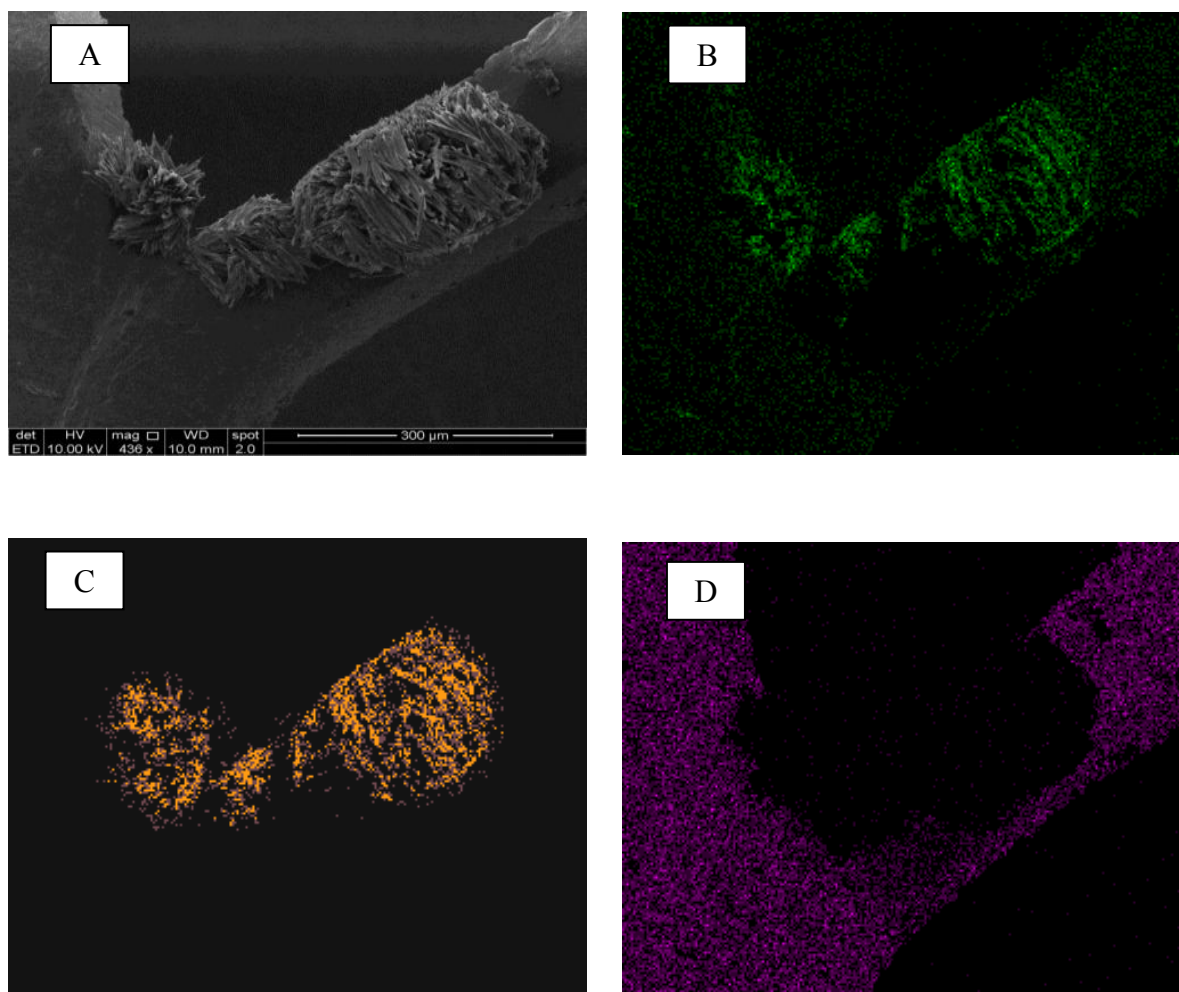


Figure IV-12 : Cartographies EDX d'une région du collecteur en titane sur lequel s'est déposé un solide. A : Image MEB d'une maille du collecteur en titane sur lequel un dépôt solide est observé. B,C,D : Cartographies EDX correspondant à l'image A avec l'identification des éléments chimiques oxygène (B), sodium (C) et titane (D) la composant.

Lors du fonctionnement de la pile, des écoulements liquides transparents ont eu lieu au niveau de la cathode et du collecteur en titane ainsi que le dépôt de cristaux blancs visibles après évaporation de l'eau (figure IV-11). Tout d'abord, ces cristaux blancs ont été attribués à du sel (chlorure de sodium par exemple) qui serait apparu suite à des fuites de l'anolyte vers l'extérieur de la pile. Mais, une analyse EDX et une cartographie sur le collecteur en titane ont montré qu'il s'agissait uniquement de sodium associé à de l'oxygène (figure IV-12). D'autres analyses de collecteur ont révélé également la présence de magnésium. Les cations Na^+ et Mg^{2+} ont traversé la membrane Nafion qui permet le passage des protons mais également des cations, ce qui explique leur concentration au niveau du collecteur de la pile.

IV.2. Conclusion

Dans des conditions électrochimiques non contrôlées, la flore bactérienne endogène d'un milieu de mangrove a été capable de coloniser une électrode, formant alors une bioanode. La puissance maximale la plus élevée a été de l'ordre de 130 mW/m^2 après 42 jours pour une pile de première génération avec une membrane cationique Nafion. La puissance fournie par les PACM testées a augmenté avec le développement du biofilm EA sur l'électrode. L'étude des courbes anodiques et cathodiques dans le temps a effectivement permis de démontrer que l'évolution des performances des PACM dépendait de la modification de l'anode. La cathode au contraire n'a pas évolué au cours du temps. Pour améliorer les performances de la pile, il faut améliorer l'efficacité du biofilm sur l'anode mais également améliorer la surtension cathodique liée à la réduction de O_2 .

Les biofilms EA obtenus par cette voie électrochimiquement non contrôlés se sont avérés être assez résistants pour pouvoir recoloniser d'autres électrodes. Ainsi, un biofilm primaire a permis de former une nouvelle bioanode, plus rapidement efficace que la précédente, permettant d'obtenir une puissance maximale de 182 mW/m^2 après 21 jours.

Les puissances obtenues avec ce dispositif sont encore faibles si l'on considère les performances obtenues avec le même milieu mais en conditions électrochimiques contrôlées ou encore celles obtenues par d'autres études sur les PACM. Pour augmenter les performances, plusieurs pistes sont à envisager :

- Effectuer plusieurs recolonisations successives afin d'améliorer l'efficacité des biofilms EA ;
- Nourrir l'anode en continu afin de permettre la durabilité des performances ;

- Augmenter la surface des électrodes, anode et cathode, afin de permettre un transfert électronique plus important, par l'utilisation de matériaux ayant des structures en 3 dimensions encore plus complexe que le tissu de carbone ;
- Diminuer la résistance interne de la pile en utilisant un assemblage anode-membrane-cathode ou également en éliminant la membrane.

L'étude présentée ici sur les PACM à cathode à air permet de valoriser le milieu naturel sélectionné comme inoculum. Toutefois, il reste encore de nombreux paramètres à étudier et à maîtriser afin d'obtenir des performances intéressantes.

Chapitre V. Etude des biofilms EA en piles à combustible microbiennes benthiques

V.1. Introduction

La PACM benthique présente l'avantage d'être de conception simple. En effet, cette pile utilise les mécanismes métaboliques existant naturellement dans la zone benthique d'un environnement sédimentaire. La bioanode utilise les propriétés électro-catalytiques des microorganismes vivant dans les sédiments alors que la biocathode utilise ceux de l'eau surnageante. Une différence de potentiel s'établit naturellement entre les 2 électrodes grâce à l'action des microorganismes et des réactions d'oxydo-réduction des 2 milieux constitués par les sédiments et l'eau surnageante. Cette différence permet la génération d'un courant dans la pile.

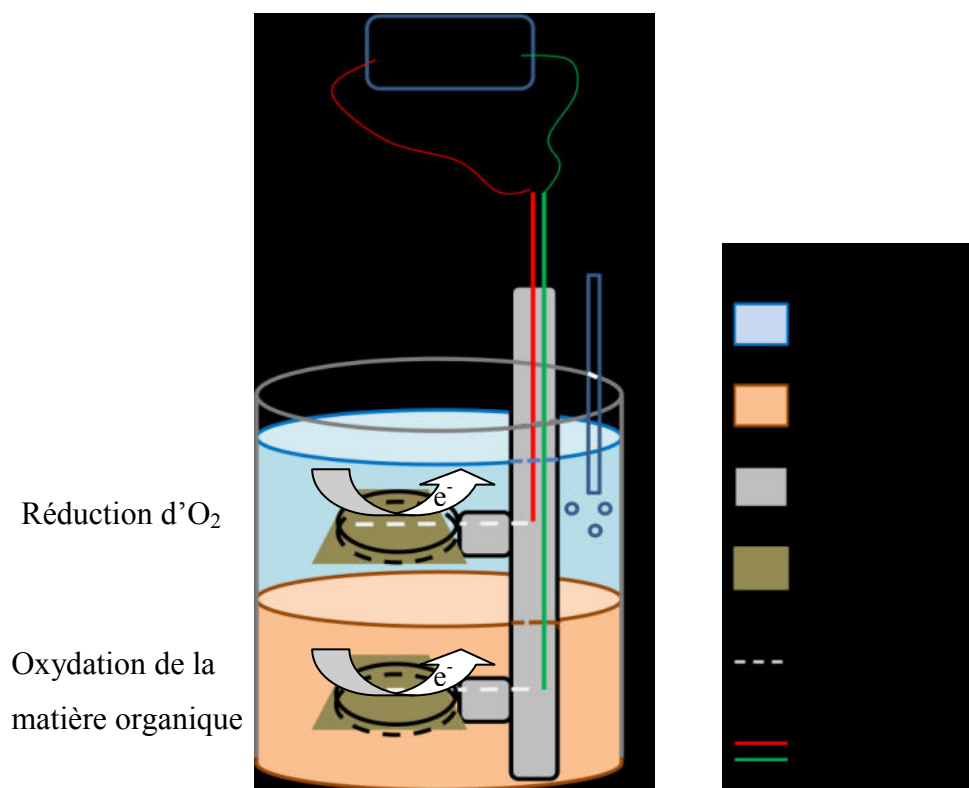


Figure V-1 : Schéma de la PACM benthique et de son support en PVC dans un milieu eau-sédiment.

Les travaux présentés dans cette partie permettent d'évaluer l'utilisation d'une PACM benthique en milieu mangrove, sur le terrain et en laboratoire.

Une PACM est fabriquée au laboratoire à partir de tubes en PVC (figure V-1). Elle est composée d'un tube principal et deux petits tubes parallèles entre eux, perpendiculaires au tube principal. Les tiges de titane, destinées à être connectées aux électrodes en tissu de carbone, passent à travers les 2 petits tubes, permettant ainsi l'accroche des tissus de carbone

à l'extérieur du dispositif et la connexion titane-cuivre à l'intérieur. De part et d'autre des faces planes des électrodes, deux cercles de PVC, directement collés à la sortie des petits tubes, assurent leur maintien horizontal et leur parallélisme. Les câbles de cuivre gainés sortent du tube principal par le haut pour être reliés à une résistance électrique située à l'extérieur du dispositif. Une fois la PACM benthique complète, elle est alors placée soit dans un contenant rempli d'un mélange eau-sédiments au laboratoire soit sur le terrain. Des modulations sur le dispositif permettent de voir l'influence de la distance inter-électrodes et de la surface des électrodes.

V.2. Essais sur le terrain

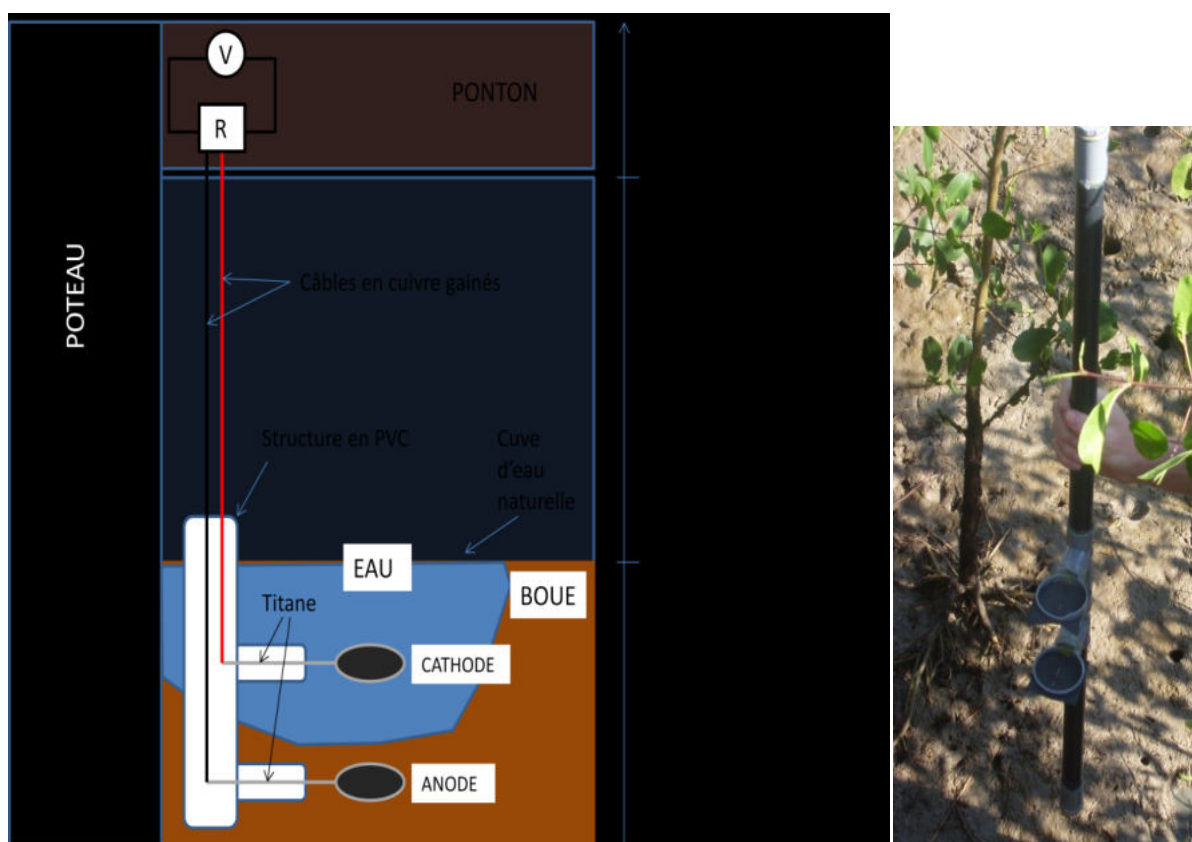


Figure V-2 : Schéma du dispositif de PACM benthique placé sur le terrain (à gauche). À droite, photographie du dispositif et de la mangrove.

Un site de mangrove est sélectionné pour pouvoir installer des PACM benthiques. Il s'agit de la mangrove du port du Larivot (Cayenne). Son intérêt réside dans les infrastructures du port comme les pontons passant au-dessus de la mangrove, offrant des points d'accroche pour le dispositif et une possibilité de faire des mesures électriques régulières sans s'enfoncer

dans la vase. De plus, cette mangrove d'estuaire est régulièrement inondée dans la journée grâce aux marées.

Trois PACM benthiques sont installées sur le site comme décrit sur la figure V-2, c'est-à-dire attachées au poteau d'un ponton, au pied duquel la présence d'eau est constante. A marée basse, la profondeur de l'eau est de 30 cm alors qu'à marée haute, elle est d'environ 2 m. Des 3 piles installées sur le terrain, seule une a fonctionné au-delà de 2 jours. En effet, le fort courant lors de la marée haute et la présence de branchages et d'objets divers dans l'eau ont causé la destruction de 2 montages sur 3 lors des 2 premières journées alors que la 3^{ème} pile a résisté 10 jours. Ce sont les résultats de cette pile qui sont présentés ici.

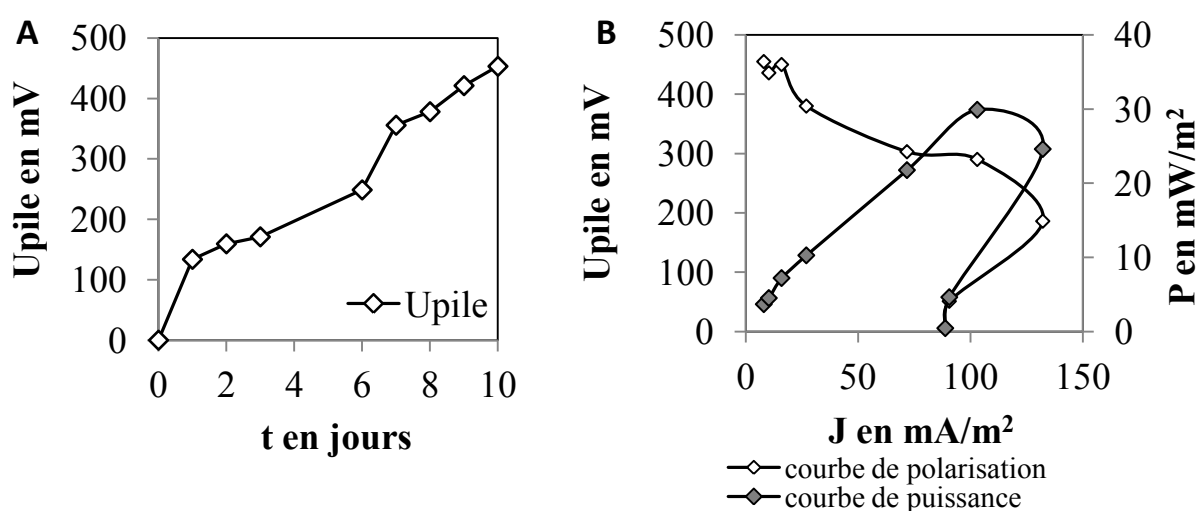


Figure V-3 : A : suivi de la tension de la pile microbienne installée sur le terrain. B : courbes de polarisation et de puissance obtenues à 7 jours.

La surface projetée des électrodes est de 72,25 cm² et la distance inter-électrode de 12 cm. Les mesures de tension quotidiennes permettent de suivre l'établissement de la différence de potentiel entre les 2 électrodes de la pile lorsqu'elle est connectée à une résistance de 1 kΩ. Ainsi, après 10 jours sur le terrain, la pile affiche une tension de 450 mV (figure V-3A). La courbe de polarisation de la pile est obtenue à 7 jours en faisant varier manuellement les résistances externes à l'aide d'une boîte de résistances à décades. La date de manipulation a été choisie en fonction des possibilités d'accès sur le terrain et pendant l'augmentation de la tension. La puissance maximale débitée par la pile après 7 jours de fonctionnement est de 30 mW/m² (figure V-3B). La résistance interne de la pile est estimée à 500 Ω, en se basant sur la

valeur de la résistance correspondant au sommet de la courbe de puissance. La densité de courant maximale est de 130 mA/m².

Ces résultats obtenus sur le terrain montrent qu'un apport naturel de réactifs au niveau de l'anode et de la cathode est possible. L'aération naturelle de l'eau et la présence de déchets organiques continuellement apportés par la marée permettent d'alimenter la pile, contrairement aux montages à trois électrodes qui nécessitaient un apport en combustible régulier.

V.3. Essais en laboratoire

Compte tenu des résultats intéressants du terrain, il est apparu judicieux de reproduire cette expérience en laboratoire. L'objectif principal est de confirmer les observations faites sur le terrain et d'approfondir l'étude sur les PACM benthiques basées sur un milieu de mangrove. En effet, au laboratoire, les problèmes inhérents au terrain (marées, courants marins, accès limité, ...) sont éliminés et l'utilisation du potentiostat permet d'effectuer des mesures électriques en continu et donc de mieux caractériser les piles.

V.3.1. Mise en place des PACM

Quatre PACM sont fabriquées suivant le dispositif de la figure V-1 puis placées dans une même cellule en verre, contenant 70 litres de milieu Larivot (figure V-4). Les piles L1, L2, L3 et L4, dont les caractéristiques sont données dans le tableau V-1, sont connectées chacune à une résistance externe de 1 kΩ. L1 et L2 sont des doublons ayant les mêmes caractéristiques que celle mise en place sur le terrain, L3 a une surface d'électrode plus petite et L4 une distance inter-électrode plus courte.

Tableau V-1 : paramètres des PACM benthiques utilisées.

Code PACM	L1	L2	L3	L4
Surface projetée de l'anode en cm ²	72,25	72,25	56,25	72,25
Distance inter-électrode en cm	12	12	12	5

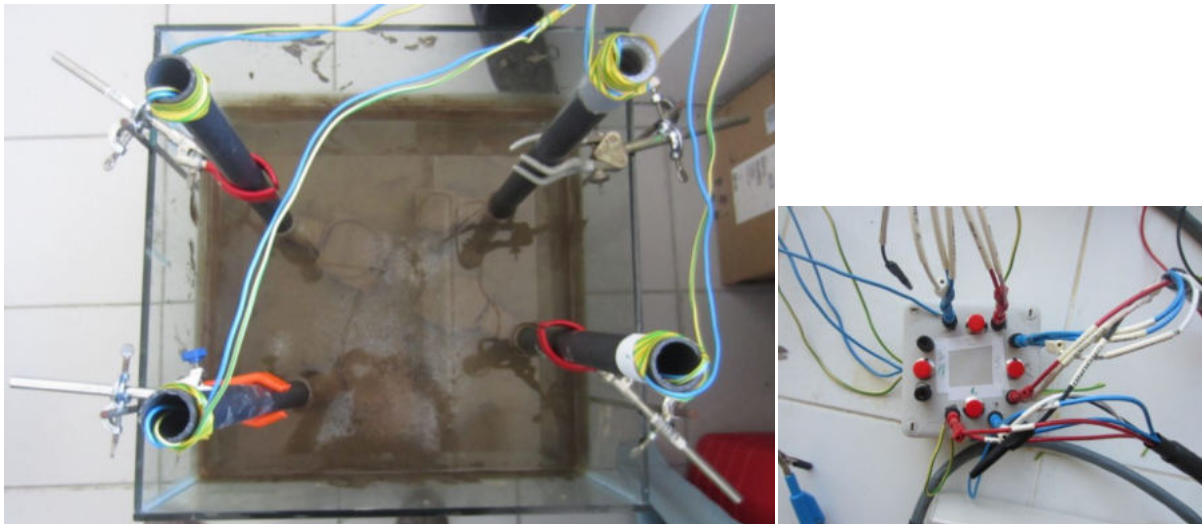


Figure V-4 : A gauche, 4 PACM benthiques placées dans un contenant en verre rempli avec 70 litres de milieu. Les électrodes visibles sur la photo sont les cathodes placées dans l'eau surnageante. A droite, chaque pile est connectée à une résistance de 1000 ohms placée dans un boîtier. Le circuit peut être ouvert grâce à un bouton poussoir (en rouge sur la photo).

V.3.2. Caractérisation des PACM

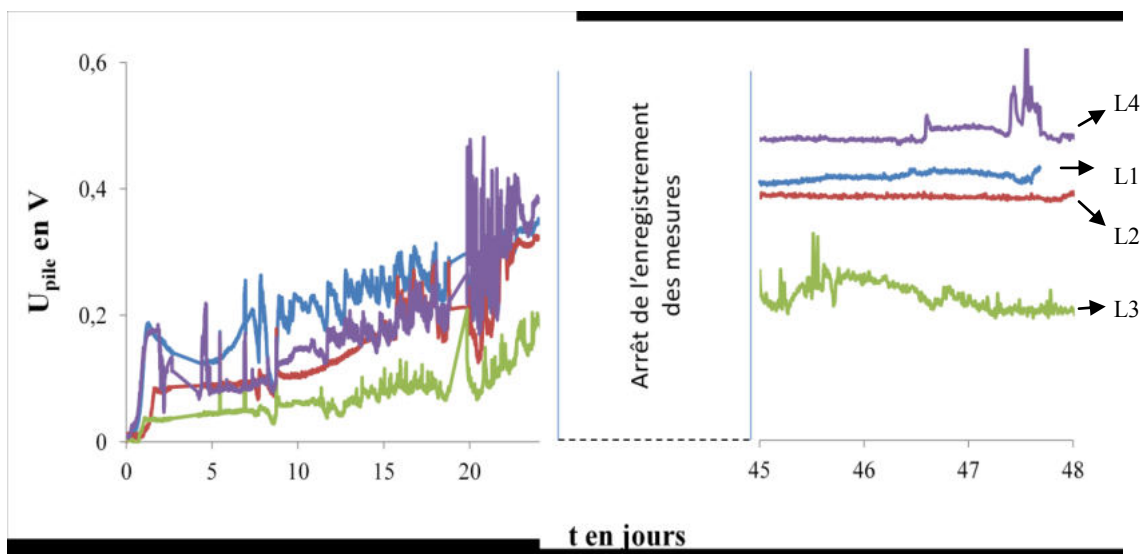


Figure V-5 : Suivi de U_{pile} en fonction du temps des PACM de laboratoire L1, L2, L3 et L4.

Pendant une vingtaine de jours, la tension U_{pile} augmente significativement jusqu'à atteindre un palier correspondant à une valeur maximale (figure V-5). La phase d'augmentation peut être attribuée au développement des biofilms EA sur les électrodes et à la mise en place des mécanismes d'oxydo-réduction. De nombreuses perturbations sont observées sur les graphes pendant cette phase d'augmentation de la tension. Leurs origines exactes ne sont pas identifiées, toutefois un cycle quotidien s'observe pour la période entre 10

et 26 jours. Il semble que les cycles jour-nuit aient donc une influence sur les paramètres de la pile, celle-ci étant plus importante lors de la phase d'évolution de la tension et donc par conséquent de la mise en place des biofilms sur les électrodes. Ces perturbations ne sont quasiment plus perceptibles pendant le palier de tension.

L'augmentation des U_{pile} a pu être générée sans ajout d'acétate ou d'un autre combustible dans le milieu ; seule la matière organique présente dans la mangrove a été utilisée pour générer du courant. Cette situation diffère des expériences précédentes en polarisation continue ou en PACM à simple compartiment. La surface des électrodes ainsi que le volume du milieu sont plus importants dans cette expérimentation. Peut-être ont-ils une influence sur les résultats et le comportement des biofilms.

Après 40 jours de fonctionnement, les piles de laboratoires affichent toujours une tension maximale, démontrant une certaine durabilité, alors que la matière organique n'est pas renouvelée et le milieu non brassé. Une PACM sur le terrain devrait donc pouvoir durer aussi longtemps et probablement plus encore

La comparaison des piles L1 et L2 (doublons) montre une différence d'évolution pendant la phase d'augmentation, qui est minime une fois les paliers atteints (figure V-5). U_{pile} est alors de 400 mV pour L1 et de 375 mV pour L2 à leur palier respectif (tableau V-2). Ces tensions sont inférieures à celles obtenues avec la pile sur le terrain ayant pourtant les mêmes paramètres de surface d'électrode et de distance inter-électrode. Pour rappel, sur le terrain, U_{pile} après seulement 10 jours prenait la valeur de 450 mV.

Tableau V-2 : Données caractéristiques de fonctionnement des PACM L1, L2, L3 et L4 connectées à une résistance externe de 1 k Ω .

Code PACM	L1	L2	L3	L4
U_{pile} en mV (palier)	400 ± 5	375 ± 5	220 ± 20	470 ± 20
J_{pile} en mA/m ²	$56,9 \pm 0,8$	$51,6 \pm 0,3$	$125,8 \pm 1,7$	$65,1 \pm 2,7$
$P_{1k\Omega}$ en mW/m ²	$22,6 \pm 0,7$	$19,2 \pm 0,2$	$89,1 \pm 2,4$	$30,7 \pm 2,8$

La pile L4, avec une distance inter-électrode plus petite, permet d'atteindre la tension maximale la plus élevée, soit 470 mV (tableau V-2). Cette tension est du même ordre de grandeur que celle enregistrée avec la pile sur le terrain après 10 jours. Diminuer l'écart entre l'anode et la cathode semble augmenter U_{pile} . Ceci peut s'expliquer par la diminution de la résistance interne de la pile grâce à des échanges ioniques facilités lorsque la distance est plus courte entre les électrodes. Dans le cas de la pile sur le terrain, les échanges ioniques et les réactions d'oxydo-réduction sont certainement favorisés par le renouvellement constant du milieu grâce aux phénomènes de marées entre autres. Dans le cas des piles de laboratoire, l'absence d'agitation du milieu au niveau des sédiments en particulier ralentit la diffusion des réactifs.

U_{pile} pour la pile L3 est la plus faible avec $220 \text{ mV} \pm 20 \text{ mV}$. Cependant, cette pile a une surface d'anode inférieure à L1, L2 et L4. En calculant selon la loi d'Ohms le courant I_{pile} et en le rapportant à la surface projetée anodique, la densité de courant J_{pile} des 4 piles est comparée. A $1 \text{ k}\Omega$, L3 avec 126 mA/m^2 est plus efficace que les 3 autres piles L1, L2 et L4 dont les anodes ont la même superficie, avec respectivement 56, 52 et 65 mA/m^2 (tableau V-2). Les performances de la pile L3, en tenant compte de la surface anodique, sont très intéressantes si on les compare aux piles benthiques de la littérature. En effet, avec 126 mA/m^2 et 89 mW/m^2 , elles se situent au-dessus des standards enregistrés, soient 28 mW/m^2 et 104 mA/m^2 (cf. chapitre I, la PACM benthique). La pile L3 est donc plus efficace que les autres, si l'on tient compte de la surface anodique.

Les densités de courant et de puissance sont des outils courants dans le domaine des PACM à cause de la grande variété d'architectures existant dans la littérature. Ils permettent de comparer les performances des piles d'une étude à l'autre et d'uniformiser le langage. Cependant, pour la suite de cette étude, nous nous concentrerons sur les performances brutes des piles, c'est-à-dire le courant et la puissance exprimés respectivement en mA et en mW. Dans ce chapitre, en effet, l'application des piles pour alimenter un appareillage sera mise en avant et cette démarche nous semble la plus adaptée à une approche industrielle.

Les courbes de polarisation et de puissance des 4 piles pendant leur phase de stabilité sont représentées sur la figure V-6, sans tenir compte de la surface des électrodes. Toutes les piles ont une tension en circuit ouvert U_{CO} qui tend vers l'intervalle 650 - 750 mV. Cet ordre de grandeur correspond à celui généralement trouvé dans la littérature sur les PACM benthiques. Les puissances maximales P_{max} confirment la hiérarchie observée pour les piles,

sans tenir compte des surfaces d'électrodes. La plus élevée est celle de L4 avec 0,23 mW et la plus faible celle de L3 avec 0,08 mW. Les doublons L1 et L2 ont des puissances intermédiaires de 0,15 mW et 0,16 mW. Les résistances internes calculées à partir de la pente dans la région linéaire des courbes de polarisation sont respectivement pour L1, L2, L3 et L4 : 700 Ω , 680 Ω , 1730 Ω et 510 Ω . R_{int} de L4 est bien du même ordre de grandeur que R_{int} de la pile du terrain. Ces résultats confirment qu'en diminuant la distance inter-électrode au laboratoire, il est possible de se rapprocher des performances du terrain.

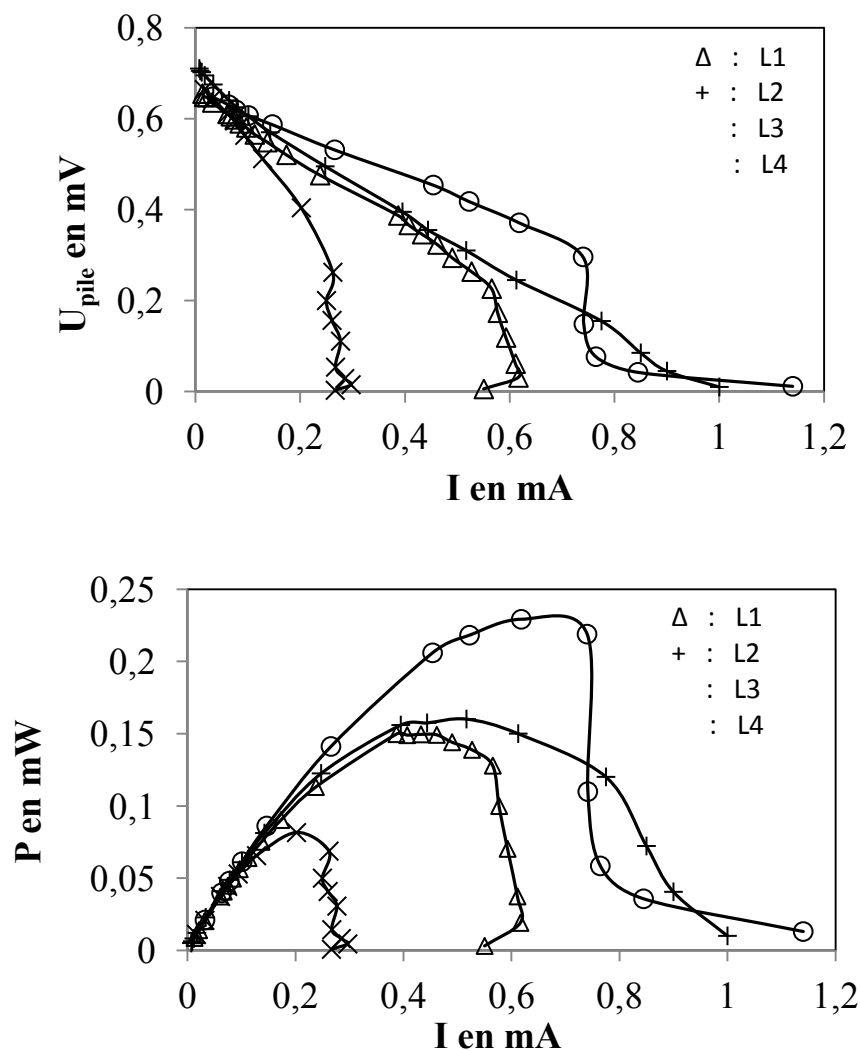


Figure V-6 : courbes de polarisation (en haut) et courbes de puissance (en bas) des PACM L1, L2, L3 et L4.

En conclusion, il est possible de retrouver au laboratoire les performances de la PACM benthique placée sur le terrain. Cependant, cette dernière au moment de sa caractérisation n'avait pas encore atteint ses performances maximales alors que les piles de laboratoire ont atteint les leurs.

V.4. 4. Caractérisation des biofilms par microscopie électronique à balayage

Une analyse du biofilm formé sur les électrodes de carbone a été effectuée par microscopie électronique à balayage. Des images de la biocathode (figure V-7) et de la bioanode (figure V-8) ont été complétées par une micro-analyse chimique par EDX (figure V-9).

Dans le cas de la biocathode, les images MEB ont été prises en mode environnemental. Sur les images, on observe que le biofilm recouvre partiellement les fibres de carbone et que des bactéries en forme de bâtonnets sont présentes sur les fibres de carbone et à l'intérieur de la substance composant le biofilm.

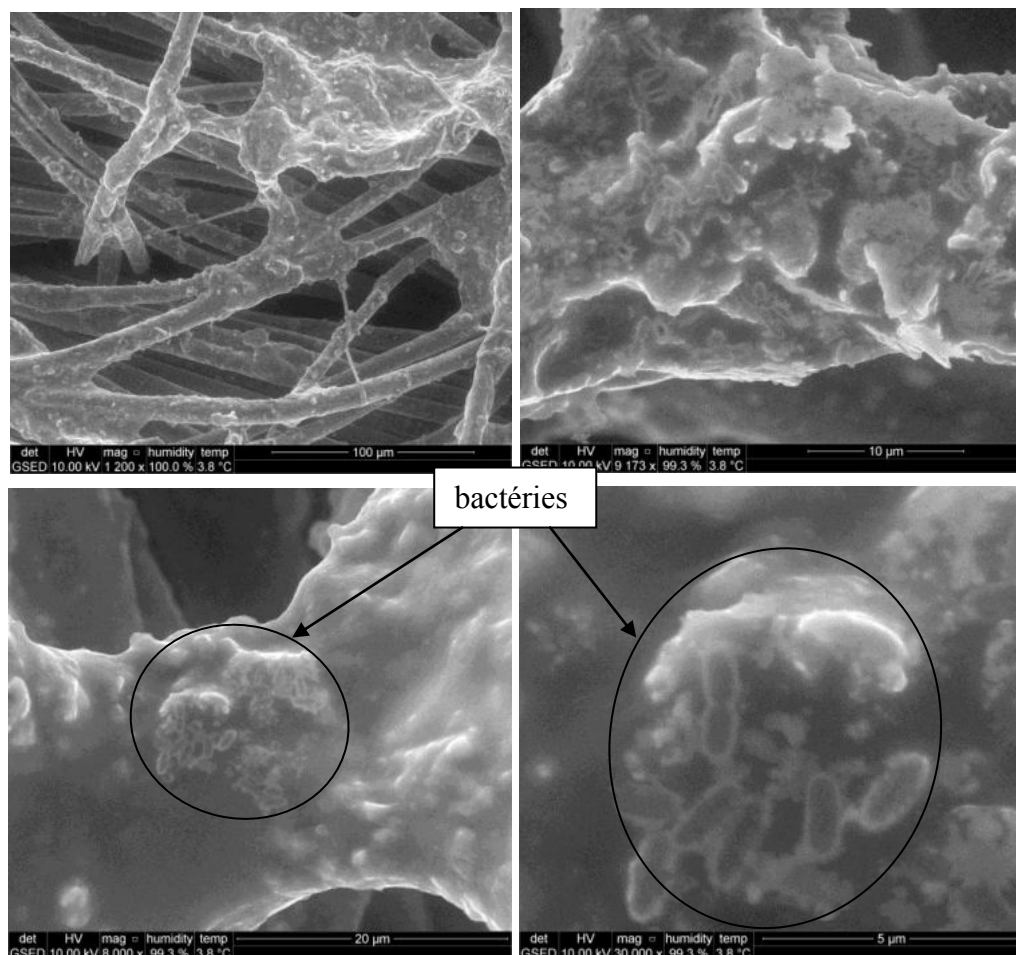


Figure V-7 : Images MEB en mode environnemental de la biocathode d'une PACM benthique à divers grossissements.

En ce qui concerne la bioanode, il est plus compliqué d'observer des microorganismes présents dans le biofilm, car le tissu de carbone est entièrement recouvert par de la boue de

mangrove. Néanmoins, nous avons tout de même réussi à observer la présence de nombreuses bactéries sur des fibres de carbone grâce à une utilisation en mode haut vide ce qui a eu pour effet d'assécher complètement la boue de mangrove.

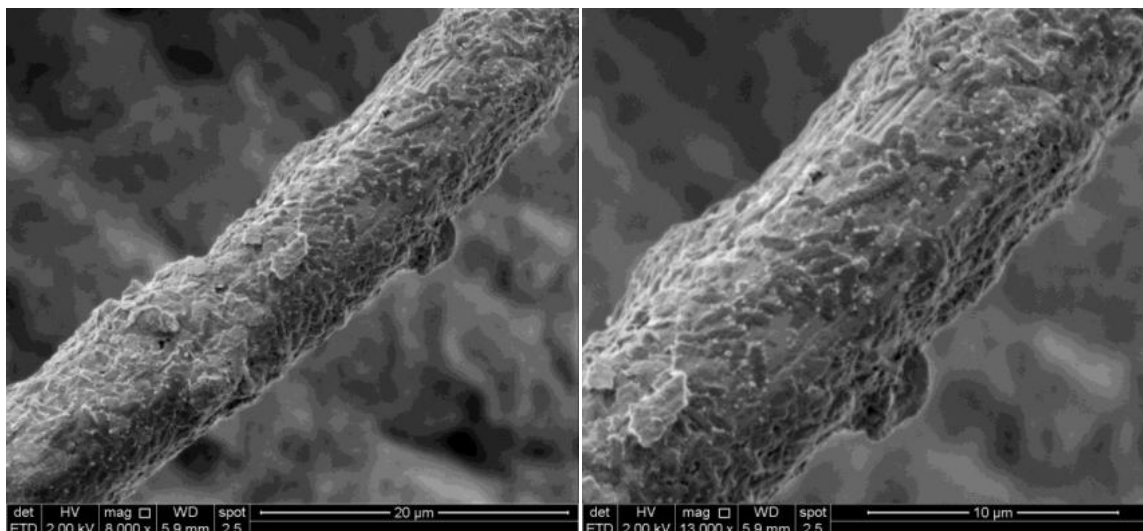


Figure V-8 : Images MEB en mode haut vide de la bioanode d'une PACM benthique

Les analyses EDX réalisées sur les bioanodes et les biocathode révèlent les mêmes éléments chimiques. La substance composant le biofilm est composée d'alumino-silicates et de fer provenant des sédiments, de sodium, de chlore et de potassium qui constituent les sels minéraux en milieu marin, de carbone et d'oxygène provenant des molécules organiques et des microorganismes présents dans le biofilm.

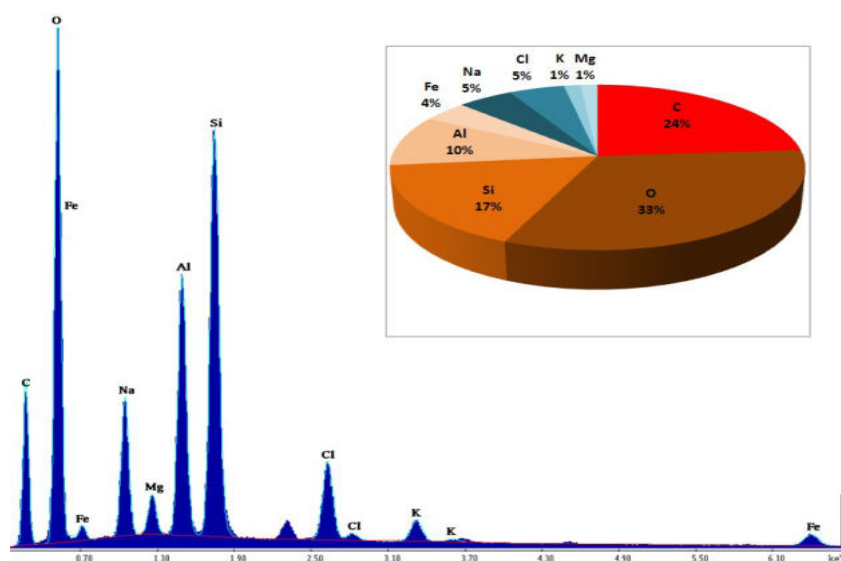


Figure V-9 : Spectre EDX et composition chimique associé du biofilm composant un échantillon de biocathode.

V.5. Association de PACM en parallèle et en série

Afin d'augmenter les caractéristiques de tension ou de courant, les PACM en laboratoire sont connectées soit en parallèle, soit en série. Le branchement des appareils électriques en parallèle ou en série permet de modifier l'intensité dans le premier cas, et la tension dans le second.

V.5.1. Association en parallèle

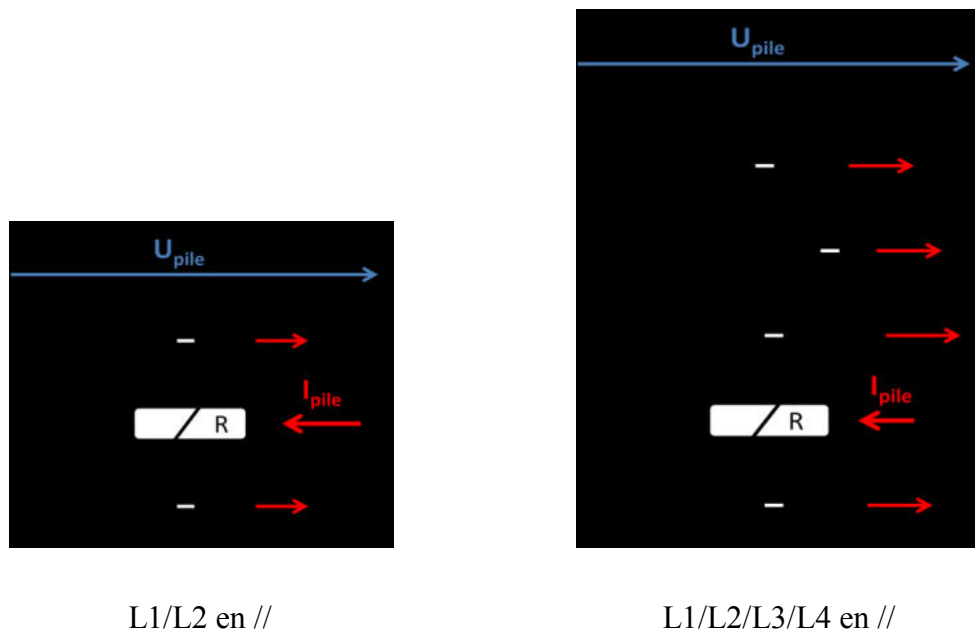


Figure V-10 : Schémas électriques des combinaisons en parallèle effectuées avec les PACM L1, L2, L3 et L4. Les anodes correspondent aux bornes négatives des générateurs et les cathodes les bornes positives. La flèche sur la résistance R indique que sa valeur peut être modulée.

Lorsque des dispositifs électriques de type générateur sont connectés en parallèle, les courants fournis par ces générateurs se cumulent. Dans notre étude, les piles L1 et L2 sont connectées en parallèle puis les piles L3 et L4 sont additionnées au montage également en parallèle. Techniquement, toutes les anodes sont connectées à une des bornes de la résistance R_{ext} et toutes les cathodes sont connectées à l'autre borne (figure V-10). Ainsi I_{pile} enregistrée dans le circuit correspond à la somme de tous les courants qui traversent chaque pile. L'avantage de ce type de branchement est donc qu'il permet d'augmenter l'intensité totale du courant. La puissance est alors plus grande pour une tension donnée. De plus, lorsqu'un générateur (pile) est hors service, les autres peuvent tout de même fonctionner (contrairement au branchement en série). Toutefois, l'inconvénient de ce montage est que le générateur ayant la plus faible tension l'impose à tous les autres.

Les premiers montages sont ceux en parallèle avec les PACM L1 et L2 tout d'abord puis la combinaison des 4 piles de L1 à L4. Les piles en parallèle ont d'abord été branchées à une résistance de 1000 Ω , puis une fois le plateau de tension obtenu, l'ensemble a été caractérisé en faisant varier les résistances.

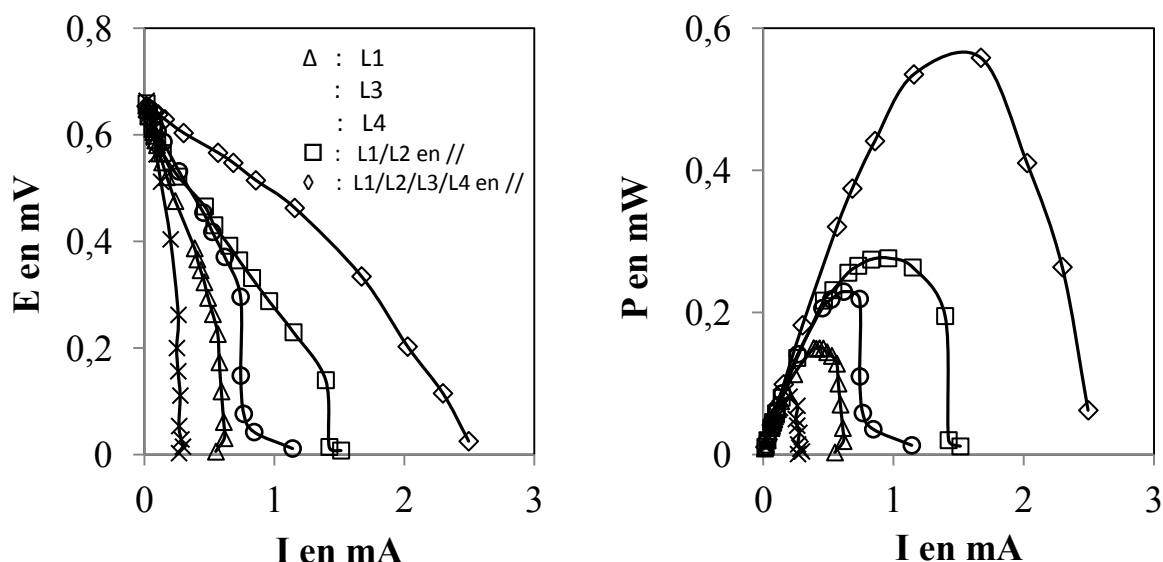


Figure V-11 : Courbes de polarisation (à gauche) et courbes de puissance (à droite) des PACM seules L1, L3, L4 et des combinaisons de PACM en parallèle L1/L2 et L1/L2/L3/L4.

La combinaison en parallèle des doublons L1 et L2 implique 2 piles qui ont des caractéristiques similaires. Leur association a permis de doubler la puissance maximale par rapport à celle d'une seule des PACM, avec U_{pile} équivalent à celle d'une seule pile, soit environ 300 mV (figure V-11 & tableau V-3). L'augmentation de la puissance est liée à l'augmentation du courant, qui, à P_{max} , est la somme des courants des piles L1 et L2 également dans leurs conditions maximales. La résistance interne des piles en série a été divisée par 2,3 environ, ce qui correspond au schéma classique des circuits en parallèle.

En rajoutant les piles L3 et L4 en parallèle dans le circuit, la somme des courants à P_{max} des 4 piles est égale à 1,79 mA, soit approximativement l' $I_{P_{max}}$ des 4 piles en parallèles, 1,67 mA. La différence entre les 2 valeurs est liée au fait qu'il est difficile d'accéder précisément aux caractéristiques d'une pile. Elles dépendent du nombre de points obtenus pour réaliser la courbe de puissance mais en particulier dans le cas des PACM à la vitesse d'exécution de la polarisation. En effet, les paliers de tension peuvent prendre plusieurs heures avant d'arriver à leur valeur définitive. En relevant la tension 30 minutes après le changement de résistance on

s'assure de se situer sur l'asymptote du palier mais également de pouvoir réaliser la courbe de puissance dans le délai raisonnable d'une journée.

L'augmentation de l'intensité induit l'augmentation de la puissance libérée qui passe donc de 0,25 mW pour la meilleure pile avant mise en parallèle, soit L4, à 0,56 mW pour les 4 piles en parallèle. R_{int} est encore plus faible avec 4 piles en parallèle.

Tableau V-3 : Caractéristiques à la puissance maximale des PACM seules ou en parallèle.

Pile	L1	L2	L3	L4	L1/L2 en //	L1/L2/L3/L4 en //
P_{max} en mW	0,15	0,16	0,08	0,23	0,28	0,56
U_{Pmax} en mV	320	310	400	370	290	330
I_{Pmax} en mA	0,46	0,52	0,20	0,61	0,96	1,67
R_{int} en Ω	700	680	1730	510	300	200

V.5.2. Association en série

Les appareils en série sont placés les uns derrière les autres, et sont traversés par le même courant (figure V-12). Dans ce type de circuit, les tensions des générateurs s'additionnent. Les inconvénients de ce type d'association sont :

- le générateur ayant l'intensité la plus faible l'impose à tous les autres. Si les piles n'ont pas toutes la même intensité, la perte de puissance peut être importante car certaines ne seront pas utilisées au maximum de leur capacité.
- les résistances internes des générateurs s'ajoutent les unes aux autres et peuvent réduire l'intensité du courant au fur et à mesure que le nombre de générateurs augmente.
- si un des générateurs est hors service, c'est tout l'ensemble du circuit qui ne fonctionnera plus.

Par ailleurs, l'addition des tensions dans le cas des piles électrochimiques, comme c'est le cas pour les PACM benthiques, n'est possible en série que si les électrodes ne sont pas dans le même contenant, c'est-à-dire sans séparation entre les 2 piles.

Le montage en série des piles L1 et L2 a donc été effectué après avoir écarté la pile L1 du contenant principal et ainsi évité les échanges ioniques inter-piles (figure V-13). Elle est

alors placée seule dans un seau de 5 litres. Les conséquences du transfert de la pile L1 vers un volume inférieur sont étudiées au préalable.

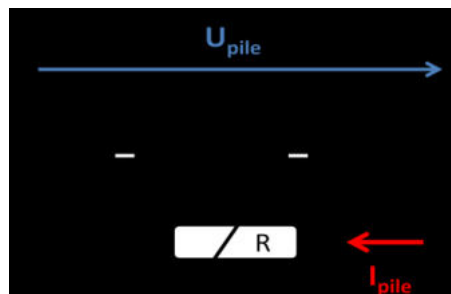


Figure V-12 : Schéma électrique de la combinaison en série effectuée avec les PACM L1 et L2. La flèche indique que la valeur de la résistance peut être modulée.

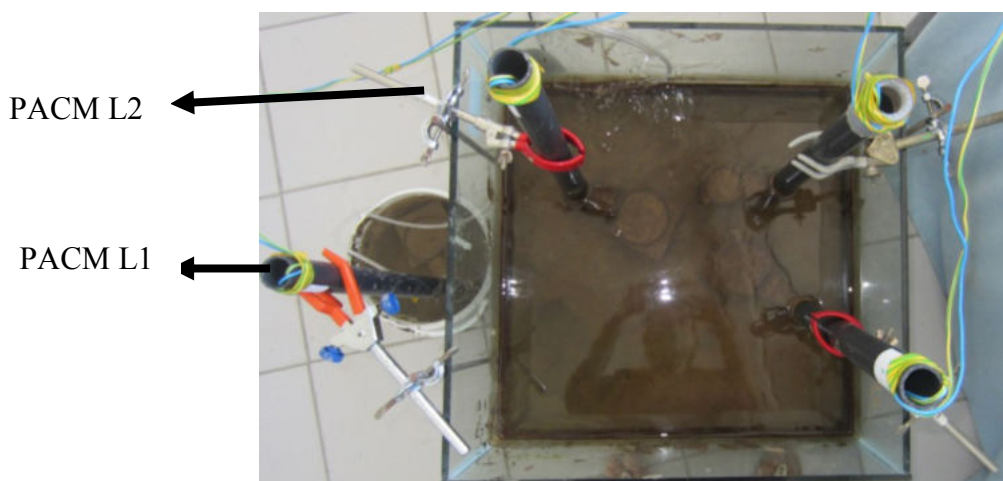


Figure V-13 : Situation des PACM L1 et L2 pendant la mise en série.

V.5.1. Influence du transfert et du volume sur les PACM

Les piles L1 et L2 sont chacune connectées individuellement à une résistance de $1\text{ k}\Omega$ afin de leur permettre de retrouver une valeur de U_{pile} stable après le transfert de L1 (figure V-14). Les 2 piles sont perturbées suite au retrait de L1 du volume de 70 litres. En effet, durant l'opération, la boue a été remuée et une oxygénation de cette partie anaérobie du réacteur a dû se produire. Cependant, quasiment avec la même évolution étalée sur une période de 4 jours, U_{pile} de L2 revient à une valeur proche de sa valeur avant transfert soit 400 mV alors que L1 a connu une diminution significative de sa valeur de tension. U_{pile} de L1 vaut 300 mV au lieu de 400 mV avant le transfert. En conclusion, le transfert a eu une incidence passagère sur les piles les perturbant fortement mais n'empêchant le retour à la normal pour L2. Le changement

de volume, d'un grand contenant à un plus petit, a entraîné la diminution des performances de L1.

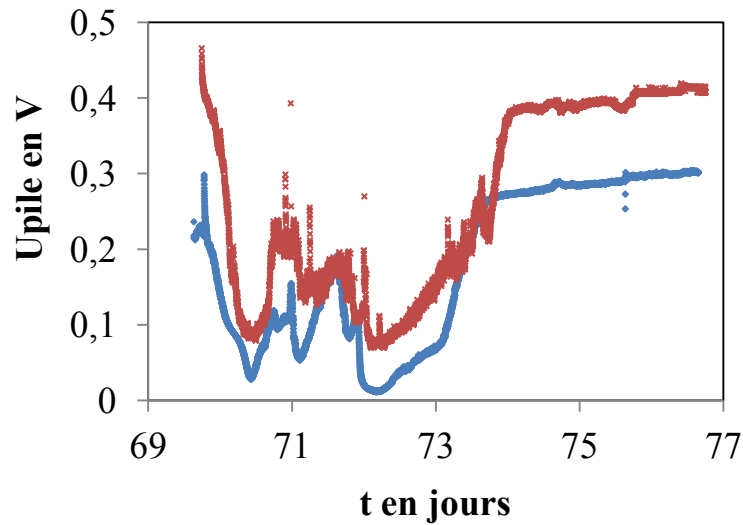


Figure V-14 : U_{pile} des piles L1 et L2 en fonction du temps après transfert de L1 dans un autre contenant.

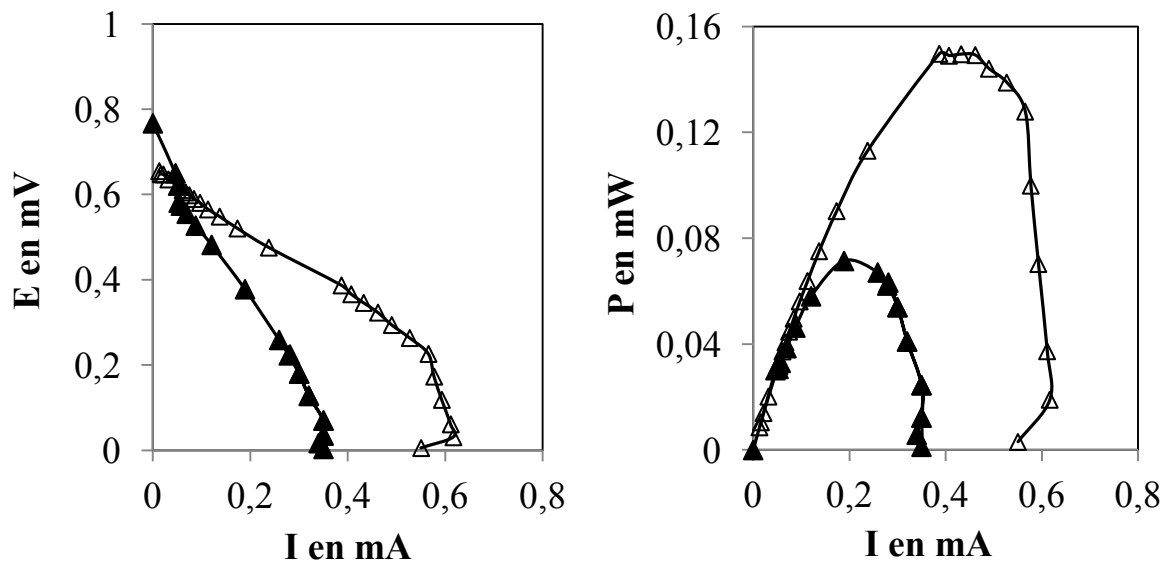


Figure V-15 : Courbes de polarisation (à gauche) et courbes de puissance à droite de la PACM L1 avant transfert dans le seau (formes vides) et après transfert (formes pleines).

Malgré cette perte de performance, nous avons tout de même souhaité continuer l'étude sur les piles en série. Afin de montrer, la modification de tension apportée par l'association de 2 piles, L1 est alors de nouveau caractérisée et les raisonnements se feront en prenant en compte sa courbe de polarisation et sa courbe de puissance après le transfert dans son nouveau

contenant. L1 a une puissance maximale et un courant généré plus faibles que dans l'ancien contenant (figure V-15).

V.5.2. Association en série de L1 et L2

Contrairement au montage en parallèle où les piles L1 et L2 avaient des caractéristiques semblables, dans ce cas, les performances de la combinaison en série vont être limitées par celles de la pile la moins efficace soit L1.

Tableau V-4 : Caractéristiques à la puissance maximale des PACM seules ou en série.

Pile	L1 après transfert	L2	L1/L2 en série
P_{max} en mW	0,07	0,16	0,20
U_{Pmax} en mV	370	310	625
I_{Pmax} en mA	0,19	0,52	0,31
R_{int} en Ω	1620	680	2120

Après la mise en série et une fois un plateau de tension obtenu, les courbes de polarisation et de puissance sont réalisées pour l'ensemble L1/L2 en série (figure V-16). U_{CO} , la tension en circuit ouvert a augmenté de façon significative car elle correspond à l'addition des 2 tensions des PACM élémentaires, soit environ 1,4 V. Cette augmentation de la tension est significative pour une alimentation d'appareils électriques. Une association de plusieurs PACM benthiques pourrait par conséquent permettre d'atteindre un voltage intéressant pour recharger une micro-batterie par exemple.

Avec un montage en série, le courant des piles aurait dû correspondre à l'intensité de la pile la moins performante. Or ce n'est pas le cas ici. L'intensité I_{Pmax} correspond à une valeur intermédiaire entre les 2 piles L1 et L2 (tableau V-4). Une caractérisation erronée de la pile L1 pourrait expliquer cet écart. Toutefois, P_{max} des piles en série se rapproche de la somme des P_{max} de L1 et L2, et la tension du circuit en série de la somme des tensions de L1 et L2. La résistance interne est également augmentée.

L'utilisation de la combinaison en série de 2 PACM benthiques a permis de cumuler les tensions des piles élémentaires mais la puissance totale a été fortement influencée par le courant le plus faible des 2 piles.

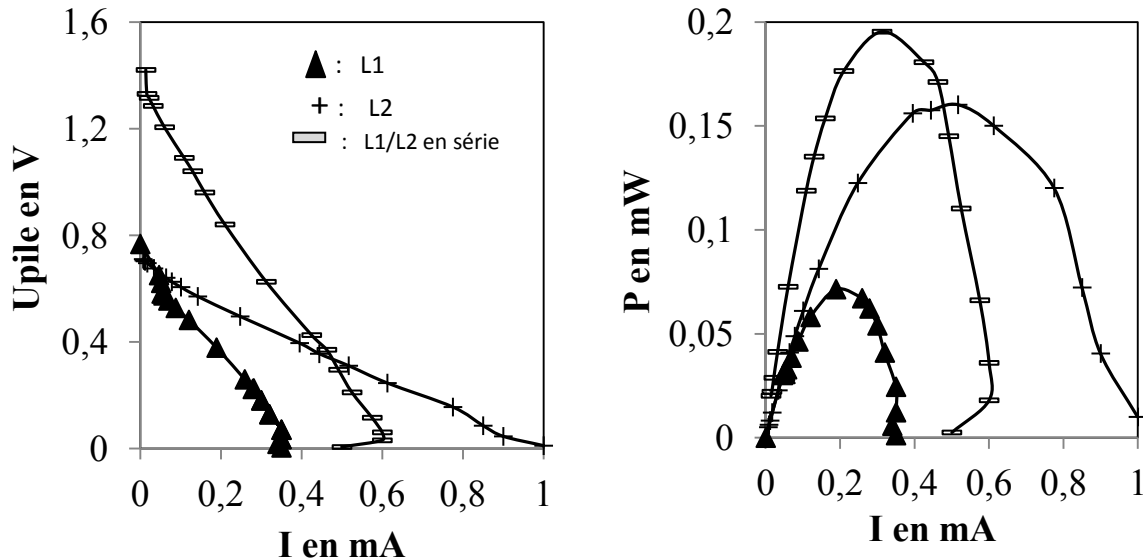


Figure V-16 : Courbes de polarisation (à gauche) et courbes de puissance (à droite) des PACM L1 (seau) et L2 et de leur combinaison en série.

V.5.3. Bilan

Les montages en série ou en parallèle ont permis d'obtenir des sources d'énergie plus importantes que celle constituée par une seule PACM. L'association en parallèle a permis d'augmenter le courant et la puissance, également en augmentant le nombre de PACM associées. Toutefois les performances obtenues restent difficilement exploitables pour pouvoir alimenter un système électrique classique. Le montage en série avec 2 piles a permis d'obtenir une tension de 1,4 V en circuit ouvert qui laisse envisager la possibilité de faire fonctionner un dispositif à faible tension de seuil. Seul le courant et la puissance restent limitants. Tous ces résultats nous orientent vers la possibilité de constituer des montages alliant à la fois piles en parallèle et piles en série afin d'accéder aux paramètres d'alimentation caractéristiques de petits dispositifs électriques.

V.6. Conclusion et discussion

L'étude présentée dans ce chapitre a permis de mettre en avant la possibilité d'obtenir une PACM complètement autonome à partir du milieu sélectionné. En effet, les piles mises en place au laboratoire ou sur le terrain n'ont pas nécessité l'apport de matière organique comme

cela était le cas dans les précédents chapitres de cette thèse. Cette différence, importante pour une future exploitation de ces piles, pourrait s'expliquer par le fait que le dispositif benthique est complètement intégré à un environnement en minimisant aux maximums les obstacles ou les perturbations. En effet, dans le cas du montage à trois électrodes, le potentiel de l'électrode est imposé et oriente les processus électrochimiques et le métabolisme des bactéries. Dans le cas des PACM à compartiment unique, l'utilisation d'une membrane échangeuse de proton et d'une cathode à air servent de substituant à la séparation naturelle existant entre les microorganismes du sol et ceux de l'eau surnageante. L'hypothèse porte sur le fait qu'ici la PACM benthique s'adapte parfaitement à l'environnement aquatique dans lequel elle est placée. Autrement dit, les processus naturellement mis en œuvre par les bactéries du milieu étudié, ici la mangrove, se produisent naturellement sur les électrodes de carbone, sans qu'il y ait de sélectivité au niveau des microorganismes ou de potentiels inadéquats.

De plus, les performances obtenues grâce aux PACM en laboratoire ont été durables dans le temps, ceci sans renouvellement du milieu. Actuellement, des PACM benthiques sont encore connectées dans le laboratoire et affichent des tensions de l'ordre de 300 – 400 mV depuis 4 mois.

Les puissances enregistrées pour les PACM de laboratoire et de terrain ont été de l'ordre de 30 mW/m². Une PACM avec une surface d'électrode plus petite a permis d'obtenir une puissance de 89 mW/m². Les puissances maximales enregistrées vont de 0,08 mW à 0,23 mW. La distance inter-électrodes et la surface des électrodes ont été comparées et il en ressort que plus la distance est courte (ici 5 cm) et que plus la surface d'électrode est grande (ici 72,25 cm²), plus grandes sont les performances de la PACM. D'autre part, un volume de milieu plus grand a également permis d'obtenir des piles avec des caractéristiques (lorsque $R_{\text{ext}} = 1 \text{ k}\Omega$) plus importantes.

Les essais sur le terrain ont connu plusieurs échecs compte tenu des fortes marées et des forts courants et de la présence de nombreux déchets (végétaux) dans le milieu sélectionné. Cependant, 10 jours ont suffi à démontrer que des performances intéressantes étaient possibles. Le succès et la longévité des piles de laboratoire invitent à retenter l'expérience sur le terrain qui devrait une fois les obstacles techniques contournés permettre d'obtenir une puissance supérieure à celle du laboratoire, plus rapidement et durablement.

Les associations en série et en parallèle ont permis d'obtenir des puissances, des courants et des tensions caractéristiques plus importantes que pour les piles individuelles. Une combinaison en parallèle avec un grand nombre d'unités serait pertinente, notamment sur le terrain où le volume n'est pas restreint. Par ailleurs, au laboratoire, un montage électrique alliant piles en série et piles en parallèle pourrait permettre d'atteindre les caractéristiques seuils de dispositifs électriques classiques.

Les biofilms d'anodes et de cathodes issus des PACM benthiques du terrain et du laboratoire ont fait l'objet d'analyses par DGGE. Il en ressort que les profils obtenus sont des profils complexes avec des bandes très nombreuses, parfois très proches et d'intensités relative très diverses. Ces informations révèlent que la communauté bactérienne qui compose ces biofilms est très riche et que de nombreuses espèces bactériennes en concentration variable et plus ou moins proches en séquence y cohabitent. En comparant les profils anodiques et cathodiques du laboratoire et du terrain, la tendance est que les profils DGGE cathodiques se ressemblent moins entre eux que les profils anodiques. Les communautés bactériennes des cathodes semblent plus complexes que celles des anodes.

La complexité de ces biofilms a empêché la réussite de l'identification des espèces bactériennes composant ces biofilms. Dans la majorité des cas, il s'agissait d'un mélange de séquences ADN appartenant à plusieurs espèces bactériennes. Des études sont actuellement menées au laboratoire afin d'améliorer la séparation des séquences d'ADN ou encore de simplifier les biofilms récoltés avant analyse.

Conclusion Générale et Perspectives

Cette thèse peut être considérée comme un travail exploratoire dont la plupart des objectifs principaux ont été atteints. Elle constitue aujourd'hui le point de départ de nombreuses autres études sur le sujet des biofilms EA en Guyane. Ce paragraphe dresse le bilan des principaux résultats ainsi que les perspectives de travaux associées.

Un des résultats les plus importants a été de déterminer, à l'aide d'une méthode électrochimique classique, la chronoampérométrie, la présence de bactéries EA dans 3 types de zones humides de la Guyane : la mangrove, la crique et l'arrière-plage. Une procédure basée sur des études chronoampérométriques et voltammétriques a permis d'améliorer les performances obtenues avec les électrodes modifiées par adhésion des biofilms EA, avec des densités de courant passant de 100 mA/m^2 à 12 A/m^2 et des rendements faradiques de 5 % à 25 %. La surface spécifique des électrodes de travail et le milieu électrolytique ont également été deux facteurs importants dans l'augmentation des performances. Toutefois, toutes les limitations physico-chimiques comme la température, le pH, etc..., n'ont pas été étudiées, ce qui laisse supposer que des performances encore plus importantes sont à venir.

Les études d'identification des espèces bactériennes et la DGGE ont permis d'établir un premier catalogue de consortia bactériens. Des espèces actuellement connues pour être EA comme la *Geobacter metallireducens* ont d'ores et déjà été répertoriées mais de nombreuses autres espèces restent encore non identifiées et leurs rôles dans les mécanismes d'électroactivité n'ont pas encore été définis.

En termes d'applications des biofilms EA, l'utilisation du milieu mangrove en PACM, a montré que cette technologie pouvait trouver des sources de bactéries EA adaptées à son fonctionnement. La PACM à compartiment unique, grâce à son système membrane cationique – cathode à air a permis d'obtenir des puissances maximales de l'ordre de 180 mW/m^2 et des densités de courant de l'ordre de $1,5 \text{ A/m}^2$. Les bioanodes, formées par l'adhésion des biofilms EA issus de la flore endogène de la mangrove, ont montré des performances de plus en plus efficaces au cours du temps, à travers une diminution de la résistance interne et une augmentation de la puissance maximale et de la densité de courant de la pile.

La PACM benthique a permis grâce à des volumes d'électrolyte plus importants et des surfaces d'électrodes plus grandes d'obtenir des systèmes indépendants en termes de combustible. Un prototype placé sur le terrain a permis d'obtenir une tension de l'ordre de 450 mV et une puissance de 30 mW/m^2 après seulement 10 jours. Des avaries ont limité la

longévité de l'expérience mais c'est un résultat très intéressant en ce qui concerne la valorisation de ces biofilms EA pour la suite. En laboratoire, les PACM benthiques ont permis de montrer que la surface des électrodes et la distance inter-électrode ont une influence sur les résultats en puissance et en courant. A l'aide d'association en série et en parallèle, les puissances obtenues ont pu être augmentées dans les 2 cas. Une combinaison de PACM en série et en parallèle semble être intéressante pour obtenir un dispositif capable d'alimenter des appareils électriques avec de petites tensions d'entrée de l'ordre de 2 V.

Un autre objectif était de faire le parallèle entre les biofilms EA formés en cellule électrochimique avec les systèmes à trois électrodes et les biofilms EA obtenus en pile. Ce lien n'a pas pu être établi au travers des performances électrochimiques puisque les densités de courant possibles en cellule ne se sont pas retrouvées en pile. Toutefois, une comparaison est faite ici entre les 2 architectures de biopiles étudiées :

- L'apport de combustible s'est avéré inutile dans les cas des PACM benthiques : des conditions adéquates de surface d'électrode et de volume ainsi qu'un système entièrement basé sur le métabolisme des bactéries pourraient en être les causes ;

- Les puissances générées ont été plus importantes avec l'utilisation de la PACM à compartiment unique constituée d'une membrane cationique et d'une cathode à air. Toutefois le coût de cette pile est beaucoup plus important que celui de la pile benthique du fait des présences du platine et de la membrane échangeuse de protons ;

- La PACM benthique a permis d'obtenir des temps de génération de courant supérieurs à 3 mois sans renouvellement des réactifs et sans diminution des performances. Les PACM à cathode à air nécessitent un apport régulier en substrat pour pouvoir fonctionner. Les études en cellules électrochimiques ont montré qu'au bout d'une centaine de jours, le courant fourni déclinait dans le milieu nourri à l'acétate, si celui-ci n'était pas renouvelé.

Autrement dit, un système plus économique et moins contraignant a pu être mis en place à travers la PACM benthique. Cependant, son intérêt réside dans une application sur le terrain compte tenu des grands volumes utilisés, même si ces caractéristiques peuvent être étudiées au laboratoire.

Cette thèse a lancé un nouvel axe de recherche du laboratoire : les biofilms EA et les PACM. Elle a conduit à l'acquisition de plusieurs technologies utiles à l'étude des biofilms et des biopiles (microscope à épifluorescence, microscope électronique à balayage environnemental,...). Cela a entraîné également le développement de la technologie DGGE au

laboratoire grâce à l'accompagnement du LEMIRE (CEA Cadarache) un des partenaires ANR du projet.

A l'issue de ces résultats, les perspectives apparaissent nombreuses.

Tout d'abord, les limites des systèmes étudiées n'ont pas encore été atteintes. On le constate à travers les valeurs de rendements faradiques faibles qui indiquent que tous les électrons disponibles ne sont pas récupérés par les électrodes. Beaucoup de paramètres et de facteurs restent à étudier. Ainsi, le ratio volume de l'électrolyte/surface de l'électrode de travail doit être optimisé, la surface de l'électrode de travail doit être adaptée, le renouvellement du milieu pourrait permettre la longévité du biofilm EA dans le cas des cellules électrochimiques notamment.

L'architecture du matériau d'électrode constitue en particulier un point intéressant d'amélioration des performances. Augmenter la surface spécifique du matériau a permis d'améliorer le contact entre bactéries EA et électrodes. D'autres structures, comme le feutre de carbone, les mousses de carbone, des pailles de carbone devraient être testées afin d'étudier l'adhésion du biofilm sur ces matériaux et les performances qui en résultent. D'autres matériaux également peuvent être envisagés. Au laboratoire, nous avons travaillé sur le carbone et l'acier 254 SMO mais nous avons également envisagé d'autres matériaux comme le 304 L et le 316L avec divers revêtements (étude en partenariat avec le CEA de Saclay).

La recherche d'environnements, sources de bactéries EA, doit continuer et ne pas se limiter aux environnements naturels. En effet, ces milieux ont été choisis car il constituerait un vivier de bactéries non encore connues pour une éventuelle utilisation en PACM. L'utilisation de milieu comme les eaux usées domestiques ou industrielles doit également constituer une piste d'exploration. En effet, ces sources continuellement en renouvellement permettraient d'allier production d'énergie et traitement de déchets, deux problématiques cruciales de notre société actuelle. Plusieurs stages au laboratoire ont permis de lancer les recherches sur ces points à travers : la formation de biofilms EA à partir d'eaux usées provenant d'une station d'épuration ou encore l'utilisation de déchets de scierie en tant que combustible pour une bioanode. Ces études sont encore à leur phase initiale et devraient constituer le point de départ pour des recherches plus poussées dans un avenir proche grâce à une thèse.

Plusieurs méthodes d'identification et d'étude des biofilms EA ont été mises en place au laboratoire. Pour autant, d'autres méthodologies peuvent encore être utilisées pour compléter l'étude qui est faite actuellement des biofilms EA. En particulier, en microbiologie, d'autres outils que la DGGE peuvent permettre d'en savoir plus sur la composition des biofilm EA formés sur nos électrodes. Une thèse sur l'identification et l'étude microbiologique des biofilms EA a commencé au laboratoire et devrait permettre d'approfondir cet aspect important de l'étude des biofilms EA commencé au cours de cette thèse. Ses objectifs seront entre autres d'étudier grâce à une meilleure connaissance des consortia bactériens, les mécanismes de transfert électronique mis en jeu.

En conclusion, cette thèse a constitué une expérience enrichissante pour toute une équipe, de par sa pluridisciplinarité mais également par son côté novateur. En effet, des physiciens, des chimistes, des biologistes, des microbiologistes se sont retrouvés pour pouvoir échanger et discuter sur ces travaux, demandant une grande ouverture d'esprit. D'autre part, cette technologie s'est réellement développée à partir de l'an 2000 et beaucoup de points et de verrous restent inexplorés et infranchis. A travers ces 3 années de thèse, l'équipe Biopiles a tenté d'apporter sa contribution à travers la connaissance d'un nouveau milieu source de bactéries EA. Les informations obtenues pourront intéresser à la fois le domaine des biofilms EA et des biopiles mais également le domaine des milieux tropicaux à travers un autre regard sur la mangrove notamment. A l'échelle de la Guyane également, les décideurs et les entrepreneurs qui s'inscrivent dans la démarche d'une production énergétique couplé au traitement des déchets pourront y trouver un intérêt pour définir leurs futures orientations régionales.

Bibliographie

- [1] L. Huguet, Caractérisation biogéochimique et potentiel de méthylation du mercure de biofilms en milieu tropical (retenue de Petit Saut et estuaire du Sinnamary, Guyane Française), Thèse de Doctorat (2009).
- [2] M.E. Davey, G.A. O'toole, Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64 (2000) 847-867.
- [3] R.M. Donlan, Biofilms : Microbial Life on Surfaces, *Emerging Infectious Diseases* 8 (2002) 881-890; 881.
- [4] A. De Almeida Cournet, Etude de la catalyse microbienne de la réduction électrochimique du dioxygène, Thèse de doctorat (2010) 152 p.
- [5] M. Simões, L.C. Simões, M.J. Vieira, A review of current and emergent biofilm control strategies, *LWT - Food Science and Technology* 43 (2010) 573-583.
- [6] J.D. Bryers, B.D. Ratner, Bioinspired implant materials befuddle bacteria, *ASM News* 70 (2004) 232-237.
- [7] A.J. Bai, V.R. Rai, Bacterial Quorum Sensing and Food Industry, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 10 (2011) 183-193.
- [8] B. Erable, N.M. Duteanu, M.M. Ghangrekar, C. Dumas, K. Scott, Application of electro-active biofilms, *Biofouling* 26 (2010) 57-71; 57.
- [9] F. Groen, Energetically Autonomous Robots, *Intelligent Autonomous Systems* 8 (2004) 128.
- [10] D.R. Lovley, Bug juice : harvesting electricity with microorganisms, *Nat. Rev. Microbiol.* 4 (2006) 497-508.
- [11] D.R. Lovley, T. Ueki, T. Zhang, N.S. Malvankar, P.M. Shrestha, K.A. Flanagan, et al., *Advances in Microbial Physiology*, vol. Volume 59, Academic Press,.
- [12] D.R. Lovley, K.P. Nevin, Electricity production with electricigens, *Bioenergy* (ASM Press, Herndon, VA) (2008) 295-306.
- [13] B.E. Logan, B. Hamelers, R. Rozendal, U. Schröder, J. Keller, S. Freguia, et al., Microbial fuel cells : Methodology and Technology, *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 5181-5192.
- [14] L. Huang, J.M. Regan, X. Quan, Electron transfer mechanisms, new applications and performance of biocathode microbial fuel cells, *Bioresource Technology* (2010).
- [15] T.H. Pham, P. Aelterman, W. Verstraete, Bioanode performance in bioelectrochemical systems : recent improvements and prospects, *Trends Biotechnol.* 27 (2009) 168-178.

- [16] I.S. Chang, H. Moon, O. Bretschger, J.K. Jang, H.I. Park, K.H. Nealson, et al., Electrochemically active bacteria (EAB) and mediator-less microbial fuel cells, *J. Microbiol. Biotechnol.* 16 (2006) 163-177.
- [17] M. Rosenbaum, F. Aulenta, M. Villano, L.T. Angenent, Cathodes as electron donors for microbial metabolism: Which extracellular electron transfer mechanisms are involved? *Bioresource Technology* 102 (2011) 324-333.
- [18] Y.A. Gorby, e. al, Electrically conductive bacterial nanowires produced by *Shewanella oneidensis* strain MR-1 and other microorganisms, *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (2006) 11358-11363.
- [19] E. Marsili, D.B. Baron, I.D. Shikhare, D. Coursolle, J.A. Gralnick, D.R. Bond, *Shewanella* secretes flavins that mediate extracellular electron transfer, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (2008) 3968.
- [20] M. Lanthier, K.B. Gregory, D.R. Lovley, Growth with high planktonic biomass in *Shewanella oneidensis* fuel cells, *FEMS Microbiol. Lett.* 278 (2008) 29-35.
- [21] T.H. Pham, N. Boon, P. Aelterman, P. Clauwaert, L. De Schampelaire, L. Vanhaecke, et al., Metabolites produced by *Pseudomonas* sp. enable a Gram-positive bacterium to achieve extracellular electron transfer, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77 (2008) 1119-1129.
- [22] B.E. Logan, J.M. Regan, Electricity-producing bacterial communities in microbial fuel cells, *Trends Biotechnol.* 14 (2006) 512-518.
- [23] A. Okamoto, K. Hashimoto, R. Nakamura, Long-range electron conduction of *Shewanella* biofilms mediated by outer membrane C-type cytochromes, *Bioelectrochemistry* 85 (2012) 61-65.
- [24] S.K. Chaudhuri, D.R. Lovley, Electricity generation by direct oxidation of glucose in mediatorless microbial fuel cells, *Nat. Biotechnol.* (2003).
- [25] D.R. Bond, D.E. Holmes, L.M. Tender, D.R. Lovley, Electrode-Reducing Microorganisms That Harvest Energy from Marine Sediments, *Science* 295 (2002) 483-485.
- [26] K.B. Gregory, D.R. Bond, D.R. Lovley, Graphite electrodes as electron donors for anaerobic respiration, *Environ. Microbiol.* 6 (2004) 596-604.
- [27] D.R. Bond, D.R. Lovley, Evidence for involvement of an electron shuttle in electricity generation by *Geothrix fermentans*, *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (2005) 2186-2189.
- [28] C.A. Pham, S.J. Jung, N.T. Phung, J. Lee, I.S. Chang, B.H. Kim, et al., A novel electrochemically active and Fe (III)-reducing bacterium phylogenetically related to *Aeromonas hydrophila*, isolated from a microbial fuel cell, *FEMS Microbiol. Lett.* 223 (2003) 129-134.

- [29] D.E. Holmes, D.R. Bond, D.R. Lovley, Electron transfer by *Desulfobulbus propionicus* to Fe (III) and graphite electrodes, *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (2004) 1234-1237.
- [30] H.S. Park, B.H. Kim, H.S. Kim, H.J. Kim, G.T. Kim, M. Kim, et al., A Novel Electrochemically Active and Fe(III)-reducing Bacterium Phylogenetically Related to *Clostridium butyricum* Isolated from a Microbial Fuel Cell, *Anaerobe* 7 (2001) 297-306.
- [31] L. Zhang, S. Zhou, L. Zhuang, W. Li, J. Zhang, N. Lu, et al., Microbial fuel cell based on *Klebsiella pneumoniae* biofilm, *Electrochemistry communications* 10 (2008) 1641-1643.
- [32] R.G. Compton, S.J. Perkin, D.P. Gamblin, J. Davis, F. Marken, A.N. Padden, et al., *Clostridium isatidis* colonised carbon electrodes: voltammetric evidence for direct solid state redox processes, *New J.Chem.* 24 (2000) 179-181.
- [33] M. Liu, Y. Yuan, L. Zhang, L. Zhuang, S. Zhou, J. Ni, Bioelectricity generation by a Gram-positive *Corynebacterium* sp. strain MFC03 under alkaline condition in microbial fuel cells, *Bioresour. Technol.* 101 (2010) 1807-1811.
- [34] P. Aelterman, K. Rabaey, H.T. Pham, N. Boon, W. Verstraete, Continuous electricity generation at high voltages and currents using stacked microbial fuel cells, *Environmental Science and Technology* 40 (2006) 3388-3394; 3388.
- [35] C. Milliken, H. May, Sustained generation of electricity by the spore-forming, Gram-positive, *Desulfitobacterium hafniense* strain DCB2, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73 (2007) 1180-1189.
- [36] D. Xing, Y. Zuo, S. Cheng, J.M. Regan, B.E. Logan, Electricity generation by *Rhodopseudomonas palustris* DX-1, *Environ. Sci. Technol.* 42 (2008) 4146-4151.
- [37] Y. Zuo, D. Xing, J.M. Regan, B.E. Logan, Isolation of the exoelectrogenic bacterium *Ochrobactrum anthropi* YZ-1 by using a U-tube microbial fuel cell, *Appl. Environ. Microbiol.* 74 (2008) 3130-3137.
- [38] M. Malki, A.L. De Lacey, N. Rodríguez, R. Amils, V.M. Fernandez, Preferential use of an anode as an electron acceptor by an acidophilic bacterium in the presence of oxygen, *Appl. Environ. Microbiol.* 74 (2008) 4472-4476.
- [39] S.M. Strycharz, T.L. Woodard, J.P. Johnson, K.P. Nevin, R.A. Sanford, F.E. Löffler, et al., Graphite electrode as a sole electron donor for reductive dechlorination of tetrachlorethene by *Geobacter lovleyi*, *Appl. Environ. Microbiol.* 74 (2008) 5943-5947.
- [40] A. Cournet, M.L. Délia, A. Bergel, C. Roques, M. Bergel, Electrochemical reduction of oxygen catalyzed by a wide range of bacteria including Gram-positive, *Electrochemistry Communications* 12 (2010) 505-508.
- [41] E. Lojou, M. Durand, A. Dolla, P. Bianco, Hydrogenase Activity Control at *Desulfovibrio vulgaris* Cell-Coated Carbon Electrodes: Biochemical and Chemical Factors Influencing the Mediated Bioelectrocatalysis, *Electroanalysis* 14 (2002) 913-922.

- [42] S. Cheng, D. Xing, D.F. Call, B.E. Logan, Direct biological conversion of electrical current into methane by electromethanogenesis, *Environ. Sci. Technol.* 43 (2009) 3953-3958.
- [43] D. Park, J.G. Zeikus, Utilization of Electrically Reduced Neutral Red by *Actinobacillus succinogenes*: Physiological Function of Neutral Red in Membrane-Driven Fumarate Reduction and Energy Conservation, *J. Bacteriol.* 181 (1999) 2403-2410.
- [44] J.C. Thrash, J.I. Van Trump, K.A. Weber, E. Miller, L.A. Achenbach, J.D. Coates, Electrochemical stimulation of microbial perchlorate reduction, *Environ. Sci. Technol.* 41 (2007) 1740-1746.
- [45] B. Erable, I. Vandecastelaere, M. Faimali, M. Delia, L. Etcheverry, P. Vandamme, et al., Marine aerobic biofilm as biocathode catalyst, *Bioelectrochemistry* 78 (2010) 51-56.
- [46] K. Rabaey, S.T. Read, P. Clauwaert, S. Freguia, P.L. Bond, L.L. Blackall, et al., Cathodic oxygen reduction catalyzed by bacteria in microbial fuel cells, *The ISME journal* 2 (2008) 519-527.
- [47] S. Freguia, S. Tsujimura, K. Kano, Electron transfer pathways in microbial oxygen biocathodes, *Electrochim. Acta* (2009).
- [48] C. Dumas, R. Basseguy, A. Bergel, Microbial electrocatalysis with *Geobacter sulfurreducens* biofilm on stainless steel cathodes, *Electrochimica Acta* 53 (2008) 2494-2500.
- [49] K.B. Gregory, D.R. Lovley, Remediation and recovery of uranium from contaminated subsurface environments with electrodes, *Environ. Sci. Technol.* 39 (2005) 8943-8947.
- [50] D.R. Bond, D.R. Lovley, Electricity Production by *Geobacter sulfurreducens* Attached to Electrodes, *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (2003) 1548-1555.
- [51] Y. Qiao, C.M. Li, S.J. Bao, Z. Lu, Y. Hong, Direct electrochemistry and electrocatalytic mechanism of evolved *Escherichia coli* cells in microbial fuel cells, *Chemical Communications* (2008) 1290-1292.
- [52] T. Zhang, C. Cui, S. Chen, H. Yang, P. Shen, The direct electrocatalysis of *Escherichia coli* through electroactivated excretion in microbial fuel cell, *Electrochemistry Communications* 10 (2008) 293-297.
- [53] H. Von Canstein, J. Ogawa, S. Shimizu, J.R. Lloyd, Secretion of flavins by *Shewanella* species and their role in extracellular electron transfer, *Appl. Environ. Microbiol.* 74 (2008) 615-623.
- [54] O. Bretschger, A. Obraztsova, C.A. Sturm, I.S. Chang, Y.A. Gorby, S.B. Reed, et al., Current production and metal oxide reduction by *Shewanella oneidensis* MR-1 wild type and mutants, *Appl. Environ. Microbiol.* 73 (2007) 7003-7012.
- [55] K. Rabaey, N. Boon, M. Höfte, W. Verstraete, Microbial phenazine production enhances electron transfer in biofuel cells, *Environ. Sci. Technol.* 39 (2005) 3401-3408.

- [56] V.R. Nimje, C.Y. Chen, C.C. Chen, J.S. Jean, A.S. Reddy, C.W. Fan, et al., Stable and high energy generation by a strain of *Bacillus subtilis* in a microbial fuel cell, *J. Power Sources* 190 (2009) 258-263.
- [57] M.C. Potter, Electrical effects accompanying the decomposition of organic compounds, *Proceedings of the Royal Society of London. Series B* 84 (1911) 206-279; 260.
- [58] H.J. Kim, M.S. Hyun, I.S. Chang, B.H. Kim, A microbial fuel cell type lactate biosensor using a metal-reducing bacterium, *Shewanella putrefaciens*, *Journal of Microbiology and Biotechnology* 9 (1999) 365-367.
- [59] W. Habermann, E.H. Pommer, Biological fuel cells with sulphide storage capacity, *Applied Microbiology and Biotechnology* 35 (1991) 128-133.
- [60] C.E. Reimers, L.M. Tender, S. Fertig, W. Wang, Harvesting energy from the marine sediment - water interface, *Environmental Science and Technology* 35 (2001) 192-195.
- [61] L.M. Tender, C.E. Reimers, H.A. Stecher, D.E. Holmes, D.R. Bond, D.A. Lowy, et al., Harnessing microbially generated power on the seafloor, *Nat Biotech* 20 (2002) 821-825.
- [62] K. Rabaey, W. Verstraete, Microbial fuel cells : novel biotechnology for energy generation, *Trends Biotechnol.* 23 (2005) 291-298.
- [63] R.A. Bullen, T.C. Arnot, J.B. Lakeman, F.C. Walsh, Biofuel cells and their development, *Biosens. Bioelectron.* 21 (2006) 2015-2045.
- [64] P. Clauwaert, P. Aelterman, T. Pham, L. De Schamphelaire, M. Carballa, K. Rabaey, et al., Minimizing losses in bio-electrochemical systems: the road to applications, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 79 (2008) 901-913.
- [65] H. Rismani-Yazdi, S.M. Carver, A.D. Christy, O.H. Tuovinen, Cathodic limitations in microbial fuel cells: An overview, *J. Power Sources* 180 (2008) 683-694.
- [66] P. Liang, X. Huang, M. Fan, X. Cao, C. Wang, Composition and distribution of internal resistance in three types of microbial fuel cells, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77 (2007) 551-558.
- [67] O. Lefebvre, Z. Tan, S. Kharkwal, H.Y. Ng, Effect of increasing anodic NaCl concentration on microbial fuel cell performance, *Bioresour. Technol.* 112 (2012) 336-340.
- [68] M. Kim, Y. Lee, Optimization of culture conditions and electricity generation using *Geobacter sulfurreducens* in a dual-chambered microbial fuel-cell, *Int J Hydrogen Energy* 35 (2010) 13028-13034.
- [69] C. Dumas, R. Basseguy, A. Bergel, DSA to grow electrochemically active biofilms of *Geobacter sulfurreducens*, *Electrochim. Acta* 53 (2008) 3200-3209.

- [70] A.A. Carmona-Martínez, F. Harnisch, U. Kuhlicke, T.R. Neu, U. Schröder, Electron transfer and biofilm formation of *Shewanella putrefaciens* as function of anode potential, *Bioelectrochemistry*.
- [71] H.J. Kim, H.S. Park, M.S. Hyun, I.S. Chang, M. Kim, B.H. Kim, A mediator-less microbial fuel cell using a metal reducing bacterium, *Shewanella putrefaciens*, *Enzyme and Microbial Technology* 30 (2002) 145-152.
- [72] B.H. Kim, H.J. Kim, M.S. Hyun, D.H. Park, Direct electrode reaction of Fe (III)-reducing bacterium, *Shewanella putrefaciens*, *J. Microbiol. Biotechnol.* 9 (1999) 127-131.
- [73] T.?. Pham, K. Rabaey, P. Aelterman, P. Clauwaert, L. De Schamphelaire, N. Boon, et al., Microbial Fuel Cells in Relation to Conventional Anaerobic Digestion Technology, *Engineering in Life Sciences* 6 (2006) 285-292.
- [74] D.E. Holmes, D.R. Bond, R.A. O'Neil, C.E. Reimers, L.R. Tender, D.R. Lovley, Microbial communities associated with electrodes harvesting electricity from a variety of aquatic sediments, *Microb. Ecol.* 48 (2004) 13-178-190.
- [75] M.E. Nielsen, C.E. Reimers, H.A. Stecher, Enhanced Power from Chambered Benthic Microbial Fuel Cells, *Environmental Science & Technology* 41 (2007) 7895-7900.
- [76] Y. Gong, S.E. Radachowsky, M. Wolf, M.E. Nielsen, P.R. Girguis, C.E. Reimers, Benthic microbial fuel cell as direct power source for an acoustic modem and seawater oxygen/temperature sensor system, *Environmental Science and Technology* 45 (2011) 5047-5053.
- [77] L. De Schamphelaire, P. Boeckx, W. Verstraete, Evaluation of biocathodes in freshwater and brackish sediment microbial fuel cells, *Applied Microbiology and Biotechnology* 87 (2010) 1675-1687.
- [78] S.W. Hong, I.S. Chang, Y.S. Choi, B.H. Kim, T.H. Chung, Responses from freshwater sediment during electricity generation using microbial fuel cells, *Bioprocess and Biosystems Engineering* 32 (2009) 389-395.
- [79] S. Parot, M. Délia, A. Bergel, Forming electrochemically active biofilms from garden compost under chronoamperometry, *Bioresour. Technol.* 99 (2008) 4809-4816.
- [80] B. Cercado-Quezada, M. Delia, A. Bergel, Testing various food-industry wastes for electricity production in microbial fuel cell, *Bioresour. Technol.* 101 (2010) 2748-2754.
- [81] D. Prasad, T.K. Sivaram, S. Berchmans, V. Yegnaraman, Microbial fuel cell constructed with a micro-organism isolated from sugar industry effluent, *J. Power Sources* 160 (2006) 991-996.
- [82] P. Kaewkannetra, W. Chiwes, T.Y. Chiu, Treatment of cassava mill wastewater and production of electricity through microbial fuel cell technology, *Fuel* 90 (2011) 2746-2750.

- [83] Y. Ahn, B.E. Logan, Effectiveness of domestic wastewater treatment using microbial fuel cells at ambient and mesophilic temperatures, *Bioresour. Technol.* 101 (2010) 469-475.
- [84] J. Nam, H. Kim, K. Lim, H. Shin, Effects of organic loading rates on the continuous electricity generation from fermented wastewater using a single-chamber microbial fuel cell, *Bioresour. Technol.* 101 (2010) S33-S37.
- [85] Q. Wen, Y. Wu, D. Cao, L. Zhao, Q. Sun, Electricity generation and modeling of microbial fuel cell from continuous beer brewery wastewater, *Bioresource Technology* 100 (2009) 4171-4175.
- [86] D. Pant, G. Van Bogaert, L. Diels, K. Vanbroekhoven, A review of the substrates used in microbial fuel cells (MFCs) for sustainable energy production, *Bioresource Technology* 101 (2010) 1533-1543.
- [87] S. Freguia, E.H. Teh, N. Boon, K.M. Leung, J. Keller, K. Rabaey, Microbial fuel cells operating on mixed fatty acids, *Bioresource Technology* 101 (2010) 1233-1238; 1233.
- [88] T. Catal, Y. Fan, K. Li, H. Bermek, H. Liu, Utilization of mixed monosaccharides for power generation in microbial fuel cells, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 86 (2011) 570-574.
- [89] T. Catal, K. Li, H. Bermek, H. Liu, Electricity production from twelve monosaccharides using microbial fuel cells, *J. Power Sources* 175 (2008) 196-200.
- [90] Z. Du, H. Li, T. Gu, A state of the art review on microbial fuel cells : a promising technology for wastewater treatment and bioenergy, *Biotechnol. Adv.* 25 (2007) 464-482.
- [91] E. Herrero-Hernandez, T.J. Smith, R. Akid, Electricity generation from wastewaters with starch as carbon source using a mediatorless microbial fuel cell, *Biosensors and Bioelectronics* In press, Accepted manuscript (2012).
- [92] T. Catal, D. Cysneiros, V. O'Flaherty, D. Leech, Electricity generation in single-chamber microbial fuel cells using a carbon source sampled from anaerobic reactors utilizing grass silage, *Bioresource Technology* 102 (2011) 404-410.
- [93] Z. Ren, L.M. Steinberg, J.M. Regan, Electricity production and microbial biofilm characterization in cellulose-fed microbial fuel cells, *Water Science and Technology* 58 (2008) 617-622; 617.
- [94] Z. Ren, T.E. Ward, J.M. Regan, Electricity production from cellulose in a microbial fuel cell using a defined binary culture, *Environmental Science and Technology* 41 (2007) 4781-4786; 4781.
- [95] F. Rezaei, T.L. Richard, B.E. Logan, Analysis of chitin particle size on maximum power generation, power longevity, and Coulombic efficiency in solid-substrate microbial fuel cells, *Journal of Power Sources* 192 (2009) 304-309.

- [96] F. Rezaei, T.L. Richard, R.A. Brennan, B.E. Logan, Substrate-enhanced microbial fuel cells for improved remote power generation from sediment-based systems, *Environmental Science and Technology* 41 (2007) 4053-4058.
- [97] S.H.A. Hassan, S. Oh, Power generation from cellulose using mixed and pure cultures of cellulose-degrading bacteria in a microbial fuel cell, *Enzyme Microb. Technol.* In press, Accepted manuscript (2012).
- [98] M. Zhou, M. Chi, J. Luo, H. He, T. Jin, An overview of electrode materials in microbial fuel cells, *Journal of Power Sources* 196 (2011) 4427-4435.
- [99] Y. Liu, F. Harnisch, K. Fricke, U. Schröder, V. Climent, J.M. Feliu, The study of electrochemically active microbial biofilms on different carbon-based anode materials in microbial fuel cells, *Biosensors and Bioelectronics* 25 (2010) 2167-2171; 2167.
- [100] S.D. Minteer, P. Atanassov, H.R. Luckarift, G.R. Johnson, New materials for biological fuel cells, *Materials Today* 15 (2012) 166-173.
- [101] J.R. Kim, H.C. Boghani, N. Amini, K. Aguey-Zinsou, I. Michie, R.M. Dinsdale, et al., Porous anodes with helical flow pathways in bioelectrochemical systems: The effects of fluid dynamics and operating regimes, *J. Power Sources* 213 (2012) 382-390.
- [102] C. Dumas, A. Mollica, D. FÃ©ron, R. Basseguy, L. Etcheverry, A. Bergel, Checking graphite and stainless anodes with an experimental model of marine microbial fuel cell, *Bioresource Technology* 99 (2008) 8887-8894.
- [103] Y. Liu, F. Harnisch, K. Fricke, R. Sietmann, U. Schröder, Improvement of the anodic boelectrocatalytic activity of mixed culture biofilms by a simple consecutive electrochemical selection procedure, *Biosens. Bioelectron.* 24 (2008) 1006-1011; 1006.
- [104] S.K. Chaudhuri, D.R. Lovley, Electricity generation by direct oxidation of glucose in mediatorless microbial fuel cells, *Nat. Biotechnol.* 21 (2003) 1229-1232.
- [105] B. Logan, S. Cheng, V. Watson, G. Estadt, Graphite fiber brush anodes for increased power production in air-cathode microbial fuel cells, *Environ. Sci. Technol.* 41 (2007) 3341-3346.
- [106] J. Liu, Y. Qiao, C.X. Guo, S. Lim, H. Song, C.M. Li, Graphene/carbon cloth anode for high-performance mediatorless microbial fuel cells, *Bioresour. Technol.* 114 (2012) 275-280.
- [107] K. Rabaey, P. Clauwaert, P. Aelterman, W. Verstraete, Tubular microbial fuel cells for efficient electricity generation, *Environmental Science and Technology* 39 (2005) 8077-8082.
- [108] J.R. Kim, B. Min, B.E. Logan, Evaluation of procedures to acclimate a microbial fuel cell for electricity production, *Biotechnological products and process engineering* 68 (2005) 23-30; 23.

- [109] S. Srikanth, E. Marsili, M.C. Flickinger, D.R. Bond, Electrochemical characterization of *Geobacter sulfurreducens* cells immobilized on graphite paper electrodes, *Biotechnol. Bioeng.* 99 (2008) 1065-1073.
- [110] P. Aelterman, M. Versichele, M. Marzorati, N. Boon, W. Verstraete, Loading rate and external resistance control the electricity generation of microbial fuel cells with different three-dimensional anodes, *Bioresour. Technol.* 99 (2008) 8895-8902.
- [111] B.R. Ringeisen, R. Ray, B. Little, A miniature microbial fuel cell operating with an aerobic anode chamber, *J. Power Sources* 165 (2007) 591-597.
- [112] Z. He, S.D. Minteer, L.T. Angenent, Electricity generation from artificial wastewater using an upflow microbial fuel cell, *Environ. Sci. Technol.* 39 (2005) 5262-5267.
- [113] Y. Qiao, C.M. Li, S.J. Bao, Q.L. Bao, Carbon nanotube/polyaniline composite as anode material for microbial fuel cells, *J. Power Sources* 170 (2007) 79-84.
- [114] T. Sharma, A.L. Mohana Reddy, T. Chandra, S. Ramaprabhu, Development of carbon nanotubes and nanofluids based microbial fuel cell, *Int J Hydrogen Energy* 33 (2008) 6749-6754.
- [115] Y. Zou, C. Xiang, L. Yang, L.X. Sun, F. Xu, Z. Cao, A mediatorless microbial fuel cell using polypyrrole coated carbon nanotubes composite as anode material, *Int J Hydrogen Energy* 33 (2008) 4856-4862.
- [116] H.Y. Tsai, C.C. Wu, C.Y. Lee, E.P. Shih, Microbial fuel cell performance of multiwall carbon nanotubes on carbon cloth as electrodes, *J. Power Sources* 194 (2009) 199-205.
- [117] G. Lepage, F.O. Albernaz, G. Perrier, G. Merlin, Characterization of a microbial fuel cell with reticulated carbon foam electrodes, *Bioresour. Technol.*
- [118] K. Watanabe, Recent developments in microbial fuel cell technologies for sustainable bioenergy, *Journal of bioscience and bioengineering* 106 (2008) 528-536.
- [119] S. Cheng, H. Liu, B.E. Logan, Power densities using different cathode catalysts (Pt and CoTMPP) and polymer binders (Nafion and PTFE) in single chamber microbial fuel cells, *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 364-369.
- [120] F. Zhao, F. Harnisch, U. Schröder, F. Scholz, P. Bogdanoff, I. Herrmann, Application of pyrolysed iron (II) phthalocyanine and CoTMPP based oxygen reduction catalysts as cathode materials in microbial fuel cells, *Electrochemistry communications* 7 (2005) 1405-1410.
- [121] J.M. Morris, S. Jin, J. Wang, C. Zhu, M.A. Urynowicz, Lead dioxide as an alternative catalyst to platinum in microbial fuel cells, *Electrochemistry communications* 9 (2007) 1730-1734.

- [122] L. Zhang, C. Liu, L. Zhuang, W. Li, S. Zhou, J. Zhang, Manganese dioxide as an alternative cathodic catalyst to platinum in microbial fuel cells, *Biosensors and Bioelectronics* 24 (2009) 2825-2829.
- [123] X. Li, B. Hu, S. Suib, Y. Lei, B. Li, Manganese dioxide as a new cathode catalyst in microbial fuel cells, *J. Power Sources* 195 (2010) 2586-2591.
- [124] I. Roche, K. Katuri, K. Scott, A microbial fuel cell using manganese oxide oxygen reduction catalysts, *J. Appl. Electrochem.* 40 (2010) 13-21.
- [125] L. Deng, M. Zhou, C. Liu, L. Liu, C. Liu, S. Dong, Development of high performance of Co/Fe/N/CNT nanocatalyst for oxygen reduction in microbial fuel cells, *Talanta* 81 (2010) 444-448.
- [126] Q. Wen, S. Wang, J. Yan, L. Cong, Z. Pan, Y. Ren, et al., MnO₂–graphene hybrid as an alternative cathodic catalyst to platinum in microbial fuel cells, *J. Power Sources* 216 (2012) 187-191.
- [127] S. Li, Y. Hu, Q. Xu, J. Sun, B. Hou, Y. Zhang, Iron- and nitrogen-functionalized graphene as a non-precious metal catalyst for enhanced oxygen reduction in an air-cathode microbial fuel cell, *J. Power Sources* 213 (2012) 265-269.
- [128] S. Chen, Y. Chen, G. He, S. He, U. Schröder, H. Hou, Stainless steel mesh supported nitrogen-doped carbon nanofibers for binder-free cathode in microbial fuel cells, *Biosensors and Bioelectronics* 34 (2012) 282-285.
- [129] Y. Chen, Z. Lv, J. Xu, D. Peng, Y. Liu, J. Chen, et al., Stainless steel mesh coated with MnO₂/carbon nanotube and polymethylphenyl siloxane as low-cost and high-performance microbial fuel cell cathode materials, *J. Power Sources* 201 (2012) 136-141.
- [130] O. Lefebvre, Z. Tang, M.P.H. Fung, D.H.C. Chua, I.S. Chang, H.Y. Ng, Electrical performance of low cost cathodes prepared by plasma sputtering deposition in microbial fuel cells, *Biosensors and Bioelectronics* 31 (2012) 164-169.
- [131] Y. Zhang, G. Mo, X. Li, J. Ye, Iron tetrasulfophthalocyanine functionalized graphene as a platinum-free cathodic catalyst for efficient oxygen reduction in microbial fuel cells, *J. Power Sources* 197 (2012) 93-96.
- [132] X. Zhang, S. Cheng, P. Liang, X. Huang, B.E. Logan, Scalable air cathode microbial fuel cells using glass fiber separators, plastic mesh supporters, and graphite fiber brush anodes, *Bioresour. Technol.* 102 (2011) 372-375.
- [133] L. Zhuang, Y. Yuan, Y. Wang, S. Zhou, Long-term Evaluation of a 10-Liter Serpentine-type Microbial Fuel Cell Stack Treating Brewery Wastewater, *Bioresour. Technol.*
- [134] A. Dekker, A.T. Heijne, M. Saakes, H.V.M. Hamelers, C.J.N. Buisman, Analysis and improvement of a scaled-up and stacked microbial fuel cell, *Environ. Sci. Technol.* 43 (2009) 9038-9042.

[135] C. Dumas, A. Mollica, D. Féron, R. Basséguy, L. Etcheverry, A. Bergel, Marine microbial fuel cell: Use of stainless steel electrodes as anode and cathode materials, *Electrochimica Acta* 53 (2007) 468-473.

[136] N. Ryckelynck, H.A. Stecher Iii, C.E. Reimers, Understanding the anodic mechanism of a seafloor fuel cell: Interactions between geochemistry and microbial activity, *Biogeochemistry* 76 (2005) 113-139.

[137] L.M. Tender, S.A. Gray, E. Groveman, D.A. Lowy, P. Kauffman, J. Melhado, et al., The first demonstration of a microbial fuel cell as a viable power supply: Powering a meteorological buoy, *Journal of Power Sources* 179 (2008) 571-575.

[138] J.J. Guzman, K.G. Cooke, M.O. Gay, S.E. Radachowsky, P.R. Girguis, M.A. Chiu, Benthic Microbial Fuel Cells: Long-Term Power Sources for Wireless Marine Sensor Networks, *Anglais* 7666 (2010) 1 vol.

[139] D.A. Lowy, L.M. Tender, J.G. Zeikus, D.H. Park, D.R. Lovley, Harvesting energy from the marine sediment–water interface II: kinetic activity of anode materials, *Biosensors and Bioelectronics* 21 (2006) 2058-2063.

[140] L. De Schamphelaire, K. Rabaey, P. Boeckx, N. Boon, W. Verstraete, Outlook for benefits of sediment microbial fuel cells with two bio-electrodes, *Microbial Biotechnology* 1 (2008) 446-462.

[141] K. Scott, I. Cotlarciure, D. Hall, J.B. Lakeman, D. Browning, Power from marine sediment fuel cells : the influence of anode material, *Journal of Applied Electrochemistry* 38 (2008) 1313-1319; 1313.

[142] C.E. Reimers, P. Girguis, H.A. Stecher Iii, L.M. Tender, N. Ryckelynck, P. Whaling, Microbial fuel cell energy from an ocean cold seep, *Geobiology* 4 (2006) 123-136.

[143] M.E. Nielsen, C.E. Reimers, H.K. White, S. Sharma, P.R. Girguis, Sustainable energy from deep ocean cold seeps, *Energy and Environmental Science* 1 (2008) 584-593.

[144] M.E. Nielsen, D.M. Wu, P.R. Girguis, C.E. Reimers, Influence of Substrate on Electron Transfer Mechanisms in Chambered Benthic Microbial Fuel Cells, *Environmental Science & Technology* 43 (2009) 8671-8677.

[145] Z. He, H. Shao, L.T. Angenent, Increased power production from a sediment microbial fuel cell with a rotating cathode, *Biosensors and Bioelectronics* 22 (2007) 3252-3255.

[146] T.S. Song, Z.S. Yan, Z.W. Zhao, H.L. Jiang, Removal of organic matter in freshwater sediment by microbial fuel cells at various external resistances, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 85 (2010) 1489-1493.

[147] G. Martins, L. Peixoto, D.C. Ribeiro, P. Parpot, A.G. Brito, R. Nogueira, Towards implementation of a benthic microbial fuel cell in lake Furnas (Azores) : Phylogenetic affiliation and electrochemical activity of sediment bacteria, *Bioelectrochemistry* (2010).

- [148] P.R. Girguis, M.E. Nielsen, I. Figueroa, Harnessing energy from marine productivity using bioelectrochemical systems, *Current Opinion in Biotechnology* 21 (2010) 252-258.
- [149] C. Donovan, A. Dewan, D. Heo, H. Beyenal, Batteryless, wireless sensor powered by a sediment microbial fuel cell, *Environmental Science and Technology* 42 (2008) 8591-8596.
- [150] C. Donovan, A. Dewan, H. Peng, D. Heo, H. Beyenal, Power management system for a 2.5 W remote sensor powered by a sediment microbial fuel cell, *Journal of Power Sources* 196 (2011) 1171-1177.
- [151] B.H. Kim, H.S. Park, H.J. Kim, G.T. Kim, I.S. Chang, J. Lee, et al., Enrichment of microbial community generating electricity using a fuel-cell-type electrochemical cell, *Applied Microbiology and Biotechnology* 63 (2004) 672-681; 672.
- [152] K. Rabaey, G. Lissens, S.D. Siciliano, W. Verstraete, A microbial fuel cell capable of converting glucose to electricity at high rate and efficiency, *Biotechnol. Lett.* 25 (2003) 1531-1535; 1531.
- [153] S. Dulon, S. Parot, M. Delia, A. Bergel, Electroactive biofilms: New means for electrochemistry, *J. Appl. Electrochem.* 37 (2007) 173-179.
- [154] S. Parot, M. Délia, A. Bergel, Acetate to enhance electrochemical activity of biofilms from garden compost, *Electrochim. Acta* 53 (2008) 2737-2742.
- [155] S. Parot, I. Vandecandelaere, A. Cournet, M. Délia, P. Vandamme, M. Bergé, et al., Catalysis of the electrochemical reduction of oxygen by bacteria isolated from electroactive biofilms formed in seawater, *Bioresource Technology* 102 (2011) 304-311.
- [156] B. Erable, M. Roncato, W. Achouak, A. Bergel, Sampling natural biofilms : a new route to build efficient microbial anodes, *Environmental Science and Technology* 43 (2009) 3194-3199.
- [157] B. Erable, A. Bergel, First air-tolerant effective stainless steel microbial anode obtained from a natural marine biofilm, *Bioresour. Technol.* 100 (2009) 3302-3307.
- [158] C.M. Cordas, L.T. Guerra, C. Xavier, J.J.G. Moura, Electroactive biofilms of sulphate reducing bacteria, *Electrochim. Acta* 54 (2008) 29-34.
- [159] I. Vandecandelaere, O. Nercessian, M. Faimali, E. Segart, A. Mollica, W. Achouak, et al., Bacterial diversity of the cultivable fraction of a marine electroactive biofilm, *Bioelectrochemistry* (2009) 5.
- [160] O. Lefebvre, Y. Shen, Z. Tan, A. Uzabiaga, I.S. Chang, H.Y. Ng, A comparison of membranes and enrichment strategies for microbial fuel cells, *Bioresource Technology* 102 (2011) 6291-6294.
- [161] J. Amouroux, Genèse et devenir des mangroves. L'exemple de la Guyane, (2003).

- [162] C. Marchand, Origine et devenir de la matière organique des sédiments de mangrove de Guyane française - Précurseurs, environnement de dépôt, processus de décomposition et relation avec les métaux lourds, (2003) 286.
- [163] J.-. de Granville, G. Cremers, M. Hoff, Les formations végétales des zones humides de Guyane, (1991) 1-8.
- [164] M.A. Allison, M.T. Lee, A.S. Ogston, R.C. Aller, Origin of Amazon mudbanks along the northeastern coast of South America, *Marine Geology* 163 (2000) 241-256.
- [165] L. Cadamuro, F. Fromard, Structure et Dynamique des écosystèmes inondables (forêt marécageuse, mangrove) du bassin du Sinnamary (Guyane Française), Thesis Doctorat (1999) 250.
- [166] S. Parot, Biofilms électroactifs: formation, caractérisation et mécanismes, (2007).
- [167] J.P. Busalmen, A. Esteve-Nunez, J.m. Feliu, Whole cell eletrochemistry of electricity-producing microorganisms evidence an adaptation for optimal exocellular electron transport, *Environ. Sci. Technol.* 42 (2008) 2445-2450; 2445.
- [168] C.I. Torres, R. Krajmalnik-Brown, P. Parameswaran, A.K. Marcus, G. Wanger, Y.A. Gorby, et al., Selecting anode-respiring bacteria based on anode potential : phylogenetic, electrochemical and microscopic characterization, *Environ. Sci. Technol.* 43 (2009) 9519-9524.
- [169] D.A. Finkelstein, L.M. Tender, J.G. Zeikus, Effect of electrode potential on electrode-reducing microbiota, *Environmental Science & Technology* 40 (2006) 6990-6995; 6990.
- [170] X. Zhu, M.D. Yates, B.E. Logan, Set potential regulation reveals additional oxidation peaks of *Geobacter sulfurreducens* anodic biofilms, *Electrochemistry Communications* 22 (2012) 116-119.
- [171] Y. Sharma, B. Li, The variation of power generation with organic substrates in single-chamber microbial fuel cells (SCMFCs), *Bioresour. Technol.* 101 (2010) 1844-1850.
- [172] A. Cournet, M. Bergé, C. Roques, A. Bergel, M. Délia, Electrochemical reduction of oxygen catalyzed by *Pseudomonas aeruginosa*, *Electrochim. Acta* 55 (2010) 4902-4908.
- [173] K.P. Nevin, D.R. Lovley, Lack of production of electron-shuttling compounds or solubilization of Fe (III) during reduction of insoluble Fe (III) oxide by *Geobacter metallireducens*, *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (2000) 2248-2251.
- [174] D.P. Lies, M.E. Hernandez, A. Kappler, R.E. Mielke, J.A. Gralnick, D.K. Newman, *Shewanella oneidensis* MR-1 uses overlapping pathways for iron reduction at a distance and by direct contact under conditions relevant for biofilms, *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (2005) 4414-4426.

[175] P.D. Kiely, G. Rader, J.M. Regan, B.E. Logan, Long-term cathode performance and the microbial communities that develop in microbial fuel cells fed different fermentation endproducts, *Bioresour. Technol.* 102 (2011) 361-366.

[176] P. Parameswaran, H. Zhang, C.I. Torres, B.E. Rittmann, R. Krajmalnik-Brown, Microbial community structure in a biofilm anode fed with a fermentable substrate: the significance of hydrogen scavengers, *Biotechnol. Bioeng.* 105 (2010) 69-78.

[177] P. Salvin, C. Roos, F. Robert, Tropical mangrove sediments as a natural inoculum for efficient electroactive biofilms, *Bioresour. Technol.* 120 (2012) 45-51.

[178] Z. He, Y. Huang, A.K. Manohar, F. Mansfeld, Effect of electrolyte pH on the rate of the anodic and cathodic reactions in an air-cathode microbial fuel cell, *Bioelectrochemistry* 74 (2008) 78-82.

[179] Y. Yuan, B. Zhao, S. Zhou, S. Zhong, L. Zhuang, Electrocatalytic activity of anodic biofilm responses to pH changes in microbial fuel cells, *Bioresource Technology* 102 (2011) 6887-6891.

[180] L. Zhang, X. Zhu, J. Li, Q. Liao, D. Ye, Biofilm formation and electricity generation of a microbial fuel cell started up under different external resistances, *Journal of Power Sources* 196 (2011) 6029-6035.

Table des figures

Figure I-1 : Processus d'adhésion irréversible du biofilm sur un substrat solide, adapté de Bryers et al. [6].	10
Figure I-2 : Mécanisme de transfert électronique par l'oxydation abiotique de sous-produit de la fermentation bactérienne. Cette image est extraite de l'article de Erable et al. [8].	15
Figure I-3 : Mécanismes de transfert électronique mis en jeu par les bactéries des biofilms EA, schéma adapté de la revue de Pham et al. [15]. Les modèles A décrivent : (i) le transfert indirect par des médiateurs externes ajoutés, (ii) le transfert indirect par les médiateurs produits par les bactéries, (iii) le transfert électronique direct par un cytochrome de la membrane externe, (iv) le transfert direct par l'action d'un pili. Les modèles B décrivent des hypothèses de mécanismes : (i) le transfert indirect d'espèces non EA par des médiateurs produits par des bactéries EA, (ii) le transfert direct par une couche composée de plusieurs cytochromes, (iii) le transfert de cellule à cellule par les pili.	16
Figure I-4 : Frise chronologique de la pile à combustible microbienne. Les références correspondant aux numéros sur la figure sont les suivantes : (1) [57] ; (2) ; (3) ; (4) [59] ; (5) [58] ; (6) [60] ; (7) [25] ; (8) [61].	21
Figure I-5 : 1 ^{er} dispositif permettant d'établir le lien entre bactérie et électricité par M.C. Potter et al. en 1911 [57].	21
Figure I-6 : première PACM benthique de Reimers et al., 2001 [60].	22
Figure I-7 : Histogramme présentant le nombre de publications scientifiques avec le mot-clé PACM. entre 1999 et 2011 (Source des résultats : base de données Scopus – Mai 2012).	23
Figure I-8: Schéma conventionnel de la pile à combustible microbienne. Il s'agit d'une pile à deux compartiments avec l'association d'une bioanode et d'une cathode abiotique.	24
Figure I-9 : Courbes de polarisation et de puissance théoriques d'une PACM.	26
Figure I-10 : Echanges électroniques mis en place par une bactérie EA capable de récupérer des électrons issus de l'oxydation de l'acétate (CH_3COO^-) et une électrode accepteur d'électrons, en fonction du potentiel de cette électrode et des autres accepteurs d'électrons présents dans le réacteur.	40
Figure I-11 : image composée à partir de clichés du satellite NOAA et du radar J-ERS présentant le phénomène de dispersion des sédiments amazonien le long des côtes du plateau des trois Guyanes par le courant sud équatorial. Les flèches représentent le sens du courant sud équatorial et des flux de sédiments. Les zones jaunes et rouges illustrent celles riches en sédiments.	42
Figure II-1 : Cartographie de la Guyane Française et localisation géographique des sites de prélèvement. Données sources : données cartographiques © 2012 Google – agrandissements des zones.	47
Figure II-2 : Cellules électrochimiques en verre de forme demi-sphérique (A) ou cylindrique (B).	48

Figure II-3 : Electrodes utilisées dans le système à trois électrodes. Electrodes de travail en tissu de carbone avec tige de connexion en titane (a), en graphite (b) ou en acier inoxydable (c). Electrode de référence au calomel saturé (d).	49
Figure II-4 : Photographies MEB des trois matériaux d'électrode utilisés pour former des biofilms EA.	50
Figure II-5 : Schéma simplifié de la chronoampérométrie à potentiel constant (CPC) appliqué par un potentiostat à un système à trois électrodes. La différence de potentiel est mesurée entre l'électrode de travail et l'électrode de référence et modulée par le potentiostat grâce à un jeu d'amplificateurs opérationnels pour correspondre à la valeur souhaitée. Le courant-réponse est enregistré entre l'électrode de travail et l'électrode auxiliaire.	52
Figure II-6 : Schéma de la PACM à compartiment unique.	53
Figure II-7 : Photographie et légende de la PACM à compartiment unique.	54
Figure II-8 : photographie du microscope électronique à balayage environnemental du L3MA.	57
Figure II-9 : Schéma explicatif du principe physique de la microscopie électronique à balayage.	58
Figure II-10 : exemple de DGGE obtenues lors d'une analyse de 5 biofilms EA issus des milieux Larivot et Guatemala.	62
Figure III-1 : Influence du potentiel sur la densité de courant enregistrée pour des électrodes en tissu de carbone immergées dans le milieu Guatemala. Les valeurs moyennes de J correspondent à 2 ou 3 réplicats pour chaque potentiel.	67
Figure III-2 : Influence du potentiel sur le J_{moyen} après que les électrodes soient restées 10 minutes, 1 heure et 3 jours plongées dans le milieu Guatemala.	68
Figure III-3 : Influence de l'ajout d'acétate de sodium dans le milieu Guatemala en fonction du potentiel de l'électrode de travail.	69
Figure III-4 : Influence de l'oxygène de l'air sur les électrodes à -0,2 V/ECS et immergées dans les milieux Guatemala et Larivot.	70
Figure III-5 : Influence de l'aération sur le profil électrochimique des électrodes en tissu de carbone polarisées à -0,2 V/ECS et immergées dans le milieu Guatemala. La vitesse de balayage a été de 10 mV/s.	71
Figure III-6 : Influence du biofilm EA adhérent à l'électrode de travail dans le cas du milieu Guatemala.	74
Figure III-7 : influence du milieu sur la génération du courant lorsque les électrodes de travail sont en graphite et polarisées à -0,2 V/ECS. Δ : Guatemala ; + : Kourou ; $\square$ Gabriel ; $\circ$: Mahury ; $\times$: Larivot.	76
Figure III-8 : Influence du matériau de l'électrode de travail sur le courant généré à partir du milieu Guatemala.	77
Figure III-9 : Evolution du biofilm sur la surface d'une électrode en acier inox 254SMO après 1 jour, 4 jours, 10 jours et 17 jours d'immersion dans un milieu Guatemala. Grossissement x20 - fluorochrome acridine orange.	78
Figure III-10 : Bactéries en forme de bâtonnets et substance blanchâtre à la surface d'une électrode en acier inox254 SMO après 4 jours d'immersion dans un milieu Guatemala. Grossissement x40 – fluorochrome acridine orange	79

Figure III-11 : Photographies d'électrodes en tissu de carbone polarisées à -0,2 V/ECS ou non polarisées après immersion de 4 jours (A) et de 8 jours (B) dans un milieu Guatemala. Les zones colorées en vert correspondent à la coloration à l'acridine orange. Les fibres de carbone apparaissent en jaune. Grossissement x20 – système Apotome®.....	80
Figure III-12 : Florilège d'images MEB obtenues à partir du biofilm formé sur une électrode de travail en tissu de carbone sous polarisation. De A à D, diatomées incrustées dans le biofilm ; E : agrégats entre deux fibres de carbone ; F : fils reliant plusieurs régions du biofilm ; G : présence de bactéries sur une fibre de carbone.	81
Figure III-13 : Analyse EDX d'un échantillon de biofilm formé sur une électrode en tissu de carbone et les pourcentages des éléments chimiques détectés.	82
Figure III-14 : Photographies MEB d'une électrode en tissu de carbone après immersion pendant 3 jours, 8 jours et 11 jours. Colonne de gauche : images obtenues grâce au détecteur BSED ; Colonne de droite : images après traitement pour renforcer le contraste.....	84
Figure III-15 : chronoampérogrammes réalisés sur les milieux Mahury (□) et Kourou (◇). Chaque pic de densité de courant suit un ajout d'acétate dans le milieu, le premier ayant été apporté au temps initial. Les autres ajouts correspondent exactement au démarrage d'un nouveau pic de densité de courant.....	85
Figure III-16 : Evolution de la densité de courant maximale (J_{max}), de la densité de courant mesurée 20 minutes après un ajout d'acétate (J_{20} minutes après l'ajout) et du rendement faradique en fonction des ajouts d'acétate pour les milieux Mahury et Kourou.....	86
Figure III-17 : Expériences similaires (A et B) présentant l'influence d'un ajout régulier de substrat sur la génération du courant. Les ajouts d'acétate ont été effectués différemment en fréquence et en concentration selon les expériences. Les concentrations d'acétate sont symbolisées comme suit : 20 mM (Δ), 30 mM (○) ou 40 mM (□). Les électrodes de travail sont en tissu de carbone et polarisées à -0,2 V/ECS.	89
Figure III-18 : Chronoampérogrammes obtenus d'électrodes de travail en acier inoxydable 254 SMO plongées dans des milieux Guatemala préalablement filtrés selon deux protocoles différents.....	91
Figure III-19 : Chronoampérogrammes obtenus à partir d'électrodes de travail en tissu de carbone polarisées à -0,2 V/ECS et de filtrat du milieu Guatemala. Les flèches à bout losange indiquent les volumes de sédiments ajoutés dans les milieux.....	92
Figure III-20 : Schéma des protocoles d'inoculation des bactéries d'un biofilm EA préformé. Les électrodes de travail sont en tissu de carbone et elles sont polarisées à -0,2 V/ECS.	93
Figure III-21 : Formation d'un biofilm de 2 ^{ème} génération à partir d'un biofilm EA préformé selon le protocole A (figure III-20) dans un filtrat Guatemala stérile. * : 10 mM d'acétate de sodium ; ** : 20 mM d'acétate de sodium.	95
Figure III-22 : Formation d'un biofilm de 2 ^{ème} génération à partir d'un biofilm EA préformé selon le protocole B (figure III-20) dans un filtrat Guatemala stérile.....	95
Figure III-23 : Influence des vitesses de balayage sur l'hysteresis du voltammogramme d'une électrode de travail en tissu de carbone immergée dans un milieu Guatemala et polarisée à -0,2 V/ECS. Les potentiels extrêmes du balayage sont -0,8 V/ECS et 0,3 V/ECS.	97
Figure III-24 : électrode de travail en tissu de carbone polarisée à -0,2 V/ECS dans un milieu Guatemala nourri à l'acétate. Des voltammétries cycliques sont réalisées quotidiennement et sont repérables sur le graphe par des traits verticaux. Les + indiquent les jours où les	

voltammogrammes présentés dans la figure III-25 ont été réalisées. Les Δ indiquent les ajouts d'acétate (10 mM).	98
Figure III-25 : voltammogrammes réalisés lors de la chronoampérométrie de la figure III-23. La vitesse de balayage est de 3 mV/s. Les flèches indiquent le sens du balayage en potentiel. Le rectangle en trait discontinu correspond à la zone qui a été zoomée dans le graphe de droite.	99
Figure III-26 : Influence du milieu sur la signature électrochimique de l'électrode à t_0 . A : l'électrode de travail est immergée dans une solution saline avec ou sans acétate; B : l'électrode de travail est immergée dans le milieu Guatemala avec ou sans acétate .	100
Figure III-27 : Suivi de la signature électrochimique (CV) d'une électrode en tissu de carbone immergée dans un milieu Guatemala. Les jours 0 et 2 correspondent à des moments où de l'acétate n'avait pas encore été ajouté dans le milieu. Les jours 7, 19 et 26 correspondent à des moments où la densité de courant est revenue à 0 A/m ² après que tout l'acétate ait été consommé dans le milieu.	101
Figure IV-1 : U_{pile} , E_a et E_c de la PACM n°1 en fonction du temps. a : modification de la valeur de R_{ext} à 10000 Ω ; b : la valeur de R_{ext} redevient 1000 Ω ; c : ajout de 10 mM d'acétate de sodium dans le compartiment anodique.	111
Figure IV-2 : influence du choix de la membrane dans les piles n°2 et n°3, cationique et anionique respectivement.	112
Figure IV-3 : courbes de polarisation et de puissance à 28 jours des piles n°2 et n°3	113
Figure IV-4 : Courbes de polarisation anodiques et cathodiques des piles n° 2 et n° 3 après 28 jours de fonctionnement.	114
Figure IV-5 : courbes de puissance obtenues après 28 jours et 42 jours de fonctionnement de la pile n°2.	115
Figure IV-6 : courbes de polarisation anodiques et cathodiques de la pile n°2 après 28 jours (trait gris) et 42 jours (trait noir) de fonctionnement.	116
Figure IV-7 : Influence du biofilm de la bioanode de la PACM n°2 sur le fonctionnement de la PACM n°4 dont l'anolyte est stérile. Les losanges indiquent les ajouts d'acétate dans le milieu. La concentration en acétate est indiquée à côté de chaque losange. - - > indiquent les jours de réalisation des polarisations linéaires de la pile à 7 jours, 14 jours et 21 jours.	116
Figure IV-8 : Evolution des courbes de polarisation (A) et de puissance (B) de la pile n°4 au cours du temps et comparaison avec les courbes de la pile n°2 après 42 jours (en gris).	117
Figure IV-9 : Image MEB réalisé du biofilm sur la bioanode de la pile n°4 (A) et analyses EDX et pourcentages des éléments chimiques le constituant (B).	119
Figure IV-10 : Photographies MEB des bactéries recouvrant la bioanode de la pile n°4.	119
Figure IV-11 : Photographie du collecteur en titane après plusieurs jours de fonctionnement de la PACM n°4. Des dépôts solides blancs d'oxyde de sodium sont mis en évidence par les flèches et les cercles rouges.	120
Figure IV-12 : Cartographies EDX d'une région du collecteur en titane sur lequel s'est déposé un solide. A : Image MEB d'une maille du collecteur en titane sur lequel un dépôt solide est observé. B,C,D : Cartographies EDX correspondant à l'image A avec l'identification des éléments chimiques oxygène (B), sodium (C) et titane (D) la composant.	120

Figure V-1 : Schéma de la PACM benthique et de son support en PVC dans un milieu eau-sédiment.	125
Figure V-2 : Schéma du dispositif de PACM benthique placé sur le terrain (à gauche). A droite, photographie du dispositif et de la mangrove.	126
Figure V-3 : A : suivi de la tension de la pile microbienne installée sur le terrain. B : courbes de polarisation et de puissance obtenues à 7 jours.	127
Figure V-4 : A gauche, 4 PACM benthiques placées dans un contenant en verre rempli avec 70 litres de milieu. Les électrodes visibles sur la photo sont les cathodes placées dans l'eau surnageante. A droite, chaque pile est connectée à une résistance de 1000 ohms placée dans un boîtier. Le circuit peut être ouvert grâce à un bouton poussoir (en rouge sur la photo). ..	129
Figure V-5 : Suivi de U_{pile} en fonction du temps des PACM de laboratoire L1, L2, L3 et L4.	129
Figure V-6 : courbes de polarisation (en haut) et courbes de puissance (en bas) des PACM L1, L2, L3 et L4.	132
Figure V-7 : Images MEB en mode environnemental de la biocathode d'une PACM benthique à divers grossissements.	133
Figure V-8 : Images MEB en mode haut vide de la bioanode d'une PACM benthique	134
Figure V-9 : Spectre EDX et composition chimique associé du biofilm composant un échantillon de biocathode.	134
Figure V-10 : Schémas électriques des combinaisons en parallèle effectuées avec les PACM L1, L2, L3 et L4. Les anodes correspondent aux bornes négatives des générateurs et les cathodes les bornes positives. La flèche sur la résistance R indique que sa valeur peut être modulée.	135
Figure V-11 : Courbes de polarisation (à gauche) et courbes de puissance (à droite) des PACM seules L1, L3, L4 et des combinaisons de PACM en parallèle L1/L2 et L1/L2/L3/L4.	136
Figure V-12 : Schéma électrique de la combinaison en série effectuée avec les PACM L1 et L2. La flèche indique que la valeur de la résistance peut être modulée.	138
Figure V-13 : Situation des PACM L1 et L2 pendant la mise en série.	138
Figure V-14 : U_{pile} des piles L1 et L2 en fonction du temps après transfert de L1 dans un autre contenant.	139
Figure V-15 : Courbes de polarisation (à gauche) et courbes de puissance à droite de la PACM L1 avant transfert dans le seau (formes vides) et après transfert (formes pleines).	139
Figure V-16 : Courbes de polarisation (à gauche) et courbes de puissance (à droite) des PACM L1 (seau) et L2 et de leur combinaison en série.	141

Liste des tableaux

Tableau I-1 : Facteurs environnementaux et microbiologiques influençant l'attachement microbien et la structure du biofilm	11
Tableau I-2 : Bactéries EA capables de catalyser une oxydation sur une bioanode. MEnd = médiateur endogène ; MEx : médiateur exogène.	18
Tableau I-3 : Bactéries EA capables de catalyser une réduction à la cathode. MEnd = médiateur endogène ; MEx = médiateur exogène.	19
Tableau I-4 : Bactéries EA capables de catalyser soit une oxydation soit une réduction sur les électrodes. MEnd = médiateur endogène.	20
Tableau I-5 : Récapitulatif des géométries d'anodes en carbone ou en graphite utilisées dans les PACM (liste non exhaustive), inspiré et complété à partir de Zhou et al. [98]. N/A indique qu'aucune information n'a été trouvée.	31
Tableau I-6 : Liste des catalyseurs autres que le platine utilisés pour les cathodes abiotiques dans les PACM, inspiré et complété à partir de Zhou et al. [98]	32
Tableau I-7 : facteurs limitants de la PACM benthique et solutions envisagées.	36
Tableau III-1 : Données expérimentales principales reflétant l'influence du biofilm EA adhérent à l'électrode sur la génération du courant. 1 : électrode initiale ; 2 : électrode initiale modifiée dans le nouveau milieu ; 3 : électrode propre introduite dans le milieu initial évolué. * : aucun substrat (acétate) ajouté pendant les 4 premiers jours.	73
Tableau III-2 : Principaux résultats illustrant l'influence du matériau sur la génération du courant.	77
Tableau III-3 : Tableau récapitulatif des espèces bactériennes identifiées dans les biofilms EA au cours de la thèse.	103
Tableau IV-1 : Paramètres des piles testées au cours de la thèse et présentées dans ce document.	110
Tableau IV-2 : Principaux résultats des courbes de polarisation et de puissance de la PACM n°2 à 42 jours et de la PACM n°4 à 7 jours, 14 jours et 21 jours.	117
Tableau V-1 : paramètres des PACM benthiques utilisées.	128
Tableau V-2 : Données caractéristiques de fonctionnement des PACM L1, L2, L3 et L4 connectées à une résistance externe de 1 k Ω	130
Tableau V-3 : Caractéristiques à la puissance maximale des PACM seules ou en parallèle.	137
Tableau V-4 : Caractéristiques à la puissance maximale des PACM seules ou en série.	140