



Université  
de Toulouse

# THÈSE

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

**Délivré par :**

Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse)

**Discipline ou spécialité :**

Génie des Procédés et de l'Environnement

---

**Présentée et soutenue par :**

Mme ELISE BLANCHET

le vendredi 1 avril 2016

**Titre :**

CONCEPTION D'UN PROCÉDE D'ELECTROSYNTHÈSE MICROBIENNE

---

**Ecole doctorale :**

Mécanique, Energétique, Génie civil, Procédés (MEGeP)

**Unité de recherche :**

Laboratoire de Génie Chimique (L.G.C.)

**Directeur(s) de Thèse :**

M. ALAIN BERGEL

M. BENJAMIN ERABLE

**Rapporteurs :**

M. NICOLAS BERNET, INRA NARBONNE

M. PIERRE FONTANILLE, UNIVERSITE BLAISE PASCAL

**Membre(s) du jury :**

Mme CAROLE MOLINA-JOUE, INSA TOULOUSE, Président

M. ALAIN BERGEL, INP TOULOUSE, Membre

M. BENJAMIN ERABLE, CNRS TOULOUSE, Membre

Mme KARINE SERVAT, UNIVERSITE DE POITIERS, Membre

# Conception d'un procédé d'électrosynthèse microbienne

## Design of a microbial electrosynthesis cell

### RESUME

---

L'électrosynthèse microbienne est une technologie innovante qui permet de convertir le dioxyde de carbone en molécules organiques en utilisant une cathode comme source d'électrons de la réduction microbienne du CO<sub>2</sub>. Le procédé «Biorare» propose de coupler l'électrosynthèse microbienne avec l'oxydation de déchets à l'anode afin d'augmenter le rendement énergétique du procédé. Il devient ainsi possible de traiter un effluent à l'anode et de valoriser du CO<sub>2</sub> à la cathode.

La thèse a eu pour objectif d'améliorer les performances de la bioanode et de la biocathode séparément, afin de réaliser in fine un prototype de procédé «Biorare» à l'échelle du laboratoire. Parmi plusieurs types de déchets testés, les boues biologiques se sont avérées bien adaptées pour une utilisation à l'anode en assurant des densités de courant jusqu'à 10 A/m<sup>2</sup>. Toutefois, ces performances étant peu reproductibles, nous avons choisi d'exploiter des biodéchets, dont le gisement représente plus de 22 millions de tonnes en France et la valorisation est aujourd'hui obligatoire. Leur utilisation brute n'a pas permis de dépasser 1 A/m<sup>2</sup> mais une méthode innovante de formation des bioanodes a permis d'augmenter les densités de courant jusqu'à 7 A/m<sup>2</sup>, de façon reproductible et dans des conditions extrapolables.

Les travaux sur les biocathodes ont révélé que l'hydrogène est un intermédiaire réactionnel clé pour le transfert d'électrons de la cathode vers les microorganismes qui réduisent le CO<sub>2</sub>. Cela a conduit à découpler le procédé initial en deux étapes : l'hydrogène est produit dans une cellule d'électrolyse microbienne qui oxyde les biodéchets et, en aval, un bioréacteur gaz-liquide utilise l'hydrogène pour convertir le CO<sub>2</sub> en acétate, éthanol, formiate, ou butyrate, suivant les systèmes microbiens. Cette stratégie permet d'augmenter les performances d'un facteur 24 avec une vitesse de production d'acétate de 376 mg/L/j et des concentrations jusqu'à 11 g/L.

**Mots-clés** : électrosynthèse microbienne, biofilm, bioanodes, biocathodes, valorisation de CO<sub>2</sub>, hydrogène.

### ABSTRACT

---

Microbial electrosynthesis is an innovative technology to produce organic molecules from CO<sub>2</sub>, using a cathode as electron source for the microbial reduction of CO<sub>2</sub>. The Biorare process intends to associate the microbial electrosynthesis with the oxidation of organic wastes at the anode, in order to increase the energetic yield of the process. The system allows thus both the treatment of polluted effluents at the anode and CO<sub>2</sub> valorization to organic molecules at the cathode.

The purpose of the PhD work was to improve the bioanode and biocathode performance separately, to finally design a Biorare prototype at laboratory scale. Among the various wastes tested, biological sludge was a good substrate, which led to current densities up to 10 A/m<sup>2</sup>. However, the performance was not reproducible and it was decided to use food wastes, which constitute an abundant resource of 22 million tons in France that must be valorized. The use of raw food waste did not allow exceeding 1 A/m<sup>2</sup>, but a new method for bioanode formation improved the current density up to 7 A/m<sup>2</sup> in a reproducible and close-to-industrial way.

The study on biocathodes revealed hydrogen as a key intermediate in electron transfer from the cathode to the microbial cells that reduce CO<sub>2</sub>. This led to dissociate the initial process into two steps: hydrogen is produced in a microbial electrolysis cell that oxidizes food wastes and, downstream, a gas-liquid bioreactor uses hydrogen to convert CO<sub>2</sub> to acetate, ethanol, formate or butyrate, depending on the microbial system. This strategy allowed increasing the performance by a factor 24 with a maximal acetate production rate of 376 mg/L/j and concentrations up to 11 g/L.

**Keywords**: Microbial electrosynthesis, biofilm, bioanodes, biocathodes, CO<sub>2</sub> conversion, hydrogen.



# Remerciements



## Remerciements

Les travaux présentés dans ce mémoire ont été effectués au Laboratoire de Génie Chimique (LGC) au sein du département "Bioprocédés et Systèmes Microbiens" de l'Institut National Polytechnique de Toulouse (INPT).

Tout d'abord j'adresse mes sincères remerciements à mes directeurs de thèse : Alain Bergel et Benjamin Erable. Merci Alain pour m'avoir confiée ce sujet innovant et encouragée à faire cette thèse (oui, tu avais raison, c'était une bonne idée :). Merci Benjamin pour tes conseils et pour l'intérêt que tu as porté à ce travail. Merci à vous deux pour m'avoir encadrée et soutenue au cours de ce projet, ainsi que pour toute l'aide apportée dans la rédaction de ce mémoire et de nos publications. Je n'oublie pas non plus l'aide de Régine Basséguy sur la partie impédance. Merci pour ton dynamisme, ta gentillesse et ton sens de l'autodérision qui font de toi une personne admirable. Je remercie aussi Marie-Line Délia pour son aide avec *Geobacter* que je n'ai pas eu le temps d'apprivoiser, pour sa gentillesse et ses bons conseils. Merci aussi beaucoup à Luc Etcheverry pour son aide sur la partie technique, pour les prélèvements de boues à ses risques et périls et pour sa bonne humeur contagieuse.

Je tiens à remercier tous les membres du jury qui ont accepté d'examiner ces travaux : Merci à Nicolas Bernet et Pierre Fontanille d'avoir été les rapporteurs de ma thèse. Merci à Carole Molina Jouve et Karine Servat d'avoir accepté le rôle d'examinatrice. Un merci particulier à Théodore Bouchez, coordinateur du projet Biorare, pour nos échanges scientifiques stimulants. Merci aussi à Alain Huyard, ingénieur chez Suez-Environnement et partenaire du projet Biorare, d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse.

J'adresse mes remerciements à l'ensemble des personnes qui ont contribué à la réalisation de ces travaux : Tous les membres du projet ANR Biorare pour les discussions scientifiques et la bonne ambiance pendant et en dehors des réunions, Marie-Line de Solan pour les images MEB, Marie Morère pour l'aide avec l'HPLC, Frédéric Da Costa pour le dessin technique et l'atelier du LGC pour la construction du pilote, J.C Rémigy et J.C Rouch pour le module membranaire, Jocelyne Barale, Amélie Teste, Claudine Lorenzon, Jean-Luc Labeyrie et Danielle Bouscary pour leur aide administrative.

Merci à mes collègues du laboratoire qui ont rendu ces trois années au LGC très sympathiques. Je vous dois mon goût pour le Lindt, mon éternelle jeunesse, pleins de discussions intéressantes (ou pas), des ragots, et surtout beaucoup de rigolades : Ingrid, Célestine, Manon, Yan, François, Freddy, Mickaël (qui a démarré le projet Biorare au LGC), Pierre, Paul, Rémi, Emma, Lorena, Vincent, Sandra, Coline, Mylène, Juan, Poe, Silvia, Bia, Jemina, Nadège, Pedro, Colin, Alae, Sitha, Carmen, Jihane, Raphaël, Mehran, Stéphanie, Claudia, Paco... Merci pour votre soutien.

Merci aussi à mes amis : Les toulousains (INSA et autres belles rencontres), avec une mention spéciale aux Gonzes et aux Clairett's qui m'ont hébergée au début, et un grand merci à Gwen d'avoir passé mon CV à Claire qui l'a transmis à Alain ! « Il n'y a pas de hasard. Il n'y a que des rendez-vous », et j'y étais grâce à vous 3. Merci aussi aux anciens collègues de Paris (véoliens) que je n'arrive pas à voir aussi souvent que je voudrais, aux BOGS de New-York et bien sûr aux cocheurs fous et aux potes de Niort (qu'ils soient revenus chez nous dans le 79 ou qu'ils se soient éloignés à Paris, Lyon et jusqu'à Lilongwé ! Merci d'être toujours là et en pleine explosion démographique :)

Pour finir en beauté, je veux remercier ma famille Blanchet/Piet/Belkhodja, mes frères Etienne et Antoine. Mon retour au statut d'étudiante à 31 ans a bien fait rire. Un merci particulier à mes parents Catherine et Jean-Paul pour leur soutien et leur confiance de toujours et à mon Papy Michel, qui est aussi ingénieur-chercheur à sa manière. Et bien sûr, Merci à Zied, mon mari idéal que j'aime depuis déjà 14 ans.

Je remercie ceux que j'ai oubliés de citer et qui me le feront peut-être savoir un jour. J'espère que j'aurai trouvé une bonne excuse d'ici là !



# Sommaire





<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>3</b>
<b>SOMMAIRE .....</b>	<b>7</b>
<b>INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>15</b>
<b>CHAPITRE 1 : BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>23</b>
<b>1 LA BIOANODE.....</b>	<b>26</b>
1.1 UN PEU D'HISTOIRE... ..	26
1.2 LES MECANISMES DE TRANSFERT D'ELECTRONS .....	26
1.3 DIFFERENTS SUBSTRATS A L'ANODE .....	27
1.4 LES TECHNOLOGIES ELECTRO-MICROBIENNES POUR LA VALORISATION DES RESIDUS DE L'ASSAINISSEMENT. ....	28
1.5 VALORISATION DES BIODECHETS .....	29
1.6 LES MATERIAUX SUPPORTS DE BIOANODES .....	31
1.7 LES ELECTRODES TRIDIMENSIONNELLES POUR AUGMENTER LES PERFORMANCES ANODIQUES .....	32
<b>2 CELLULES D'ELECTROLYSE MICROBIENNE (CEM) .....</b>	<b>34</b>
2.1 PRINCIPES DE BASE.....	34
2.2 CONDUCTIVITE DES ELECTROLYTES .....	35
2.3 ELECTROLYSEURS MICROBIENS : SIMPLE OU DOUBLE COMPARTIMENTS ?.....	36
2.4 LES DIFFERENTES CONFIGURATIONS DE REACTEURS .....	36
2.5 LES ETUDES EN CEM A DIFFERENTES ECHELLES.....	37
<b>3 LA CATHODE, SIEGE DE L'ELECTROSYNTHESE MICROBIENNE .....</b>	<b>38</b>
3.1 GENERALITES SUR L'ELECTROSYNTHESE MICROBIENNE .....	38
3.2 INTERETS ET CHALLENGES DU PROCEDE D'ELECTROSYNTHESE MICROBIENNE.....	39
3.3 LES MOLECULES PRODUITES GRACE A L'ELECTROSYNTHESE MICROBIENNE A PARTIR DE CO <sub>2</sub> .....	40
3.4 MECANISMES BIOLOGIQUES DE FIXATION DU CO <sub>2</sub> .....	41
3.5 CONSIDERATIONS THERMODYNAMIQUES .....	43
3.6 DEVELOPPEMENT DU PROCEDE D'ELECTROSYNTHESE MICROBIENNE.....	45
3.7 DEVELOPPEMENT DU PROCEDE BIORARE.....	46
<b>4 SYNTHESE DE MOLECULES ORGANIQUES A PARTIR DE DIOXYDE DE CARBONE ET D'HYDROGENE.....</b>	<b>47</b>
4.1 LES MICROORGANISMES HOMOACETOGENES .....	47
4.2 UTILISATION D'ACETOGENES POUR LA PRODUCTION DE MOLECULES ORGANIQUES A PARTIR DE CO <sub>2</sub> .....	49
4.3 UTILISATION DE CULTURES MIXTES POUR LA PRODUCTION DE MOLECULES ORGANIQUES A PARTIR DE CO <sub>2</sub> .....	52
<b>CHAPITRE 2 : MATERIELS ET METHODES.....</b>	<b>55</b>
<b>1 SOURCES DE MICROORGANISMES .....</b>	<b>57</b>
1.1 COMPARTIMENT ANODIQUE .....	57
1.2 COMPARTIMENT CATHODIQUE OU CONTACTEURS GAZ-LIQUIDE .....	57
<b>2 MILIEUX ET SUBSTRATS.....</b>	<b>58</b>

2.1	MILIEUX SYNTHETIQUES .....	58
2.2	MILIEUX « REELS ».....	59
<b>3</b>	<b>DISPOSITIFS EXPERIMENTAUX.....</b>	<b>60</b>
3.1	LES ELECTRODES .....	60
3.2	REACTEURS ELECTROCHIMIQUES « STANDARDS » .....	61
3.3	REACTEURS ELECTROCHIMIQUES MODIFIES.....	62
3.4	ELECTROLYSEUR MICROBIEN SANS MEMBRANE.....	63
3.5	ELECTROLYSEUR MICROBIEN AVEC MEMBRANE.....	64
3.6	CONTACTEURS GAZ-LIQUIDE (CGL).....	65
<b>4</b>	<b>TECHNIQUE D'ANALYSES .....</b>	<b>68</b>
4.1	TECHNIQUES ELECTROCHIMIQUES .....	68
4.2	TECHNIQUES D'ANALYSES CHIMIQUES ET BIOCHIMIQUES.....	69
4.3	OBSERVATIONS MICROSCOPIQUES DES ELECTRODES.....	71
4.4	ANALYSE DES POPULATIONS MICROBIENNES PAR PYROSEQUENÇAGE .....	73

### CHAPITRE 3 : PERFORMANCES ELECTROCHIMIQUES DE BIOANODES FORMEES A PARTIR DE DIFFERENTS TYPES DE DECHETS .....

<b>1</b>	<b>OBJECTIFS ET DESCRIPTION DES DECHETS MIS EN OEUVRE .....</b>	<b>79</b>
<b>2</b>	<b>TESTS PRELIMINAIRES AVEC LES DIFFERENTS DECHETS .....</b>	<b>81</b>
<b>3</b>	<b>MISE AU POINT D'UNE METHODE POUR AMELIORER LA REPRODUCTIBILITE ET LES PERFORMANCES ANODIQUES .....</b>	<b>83</b>
3.1	FORMATION DE BIOANODES A PARTIR D'UN INOCULUM DE BOUES BIOLOGIQUES EPAISSIES HYDROLYSEES .....	84
3.2	FORMATION DE BIOANODES A PARTIR D'UN INOCULUM DE BOUES ACTIVEES .....	85
<b>4</b>	<b>PASSAGE DES CONDITIONS MODELES DE LABORATOIRE VERS DES CONDITIONS SE RAPPROCHANT DE CELLES DES STATIONS D'EPURATION .....</b>	<b>89</b>
4.1	INTRODUCTION.....	89
4.2	PUBLICATION 1 : COMPARAISON D'UN MILIEU DE DILUTION SYNTHETIQUE AVEC UN MILIEU DE DILUTION CONSTITUE D'EAUX USEES POUR LA FORMATION DE BIOANODES : APPLICATION AU TRAITEMENT DE BIODECHETS. ....	90
4.3	RESULTATS COMPLEMENTAIRES : POPULATIONS MICROBIENNES DANS LES REACTEURS ALIMENTES EN BIODECHETS COMPAREES AUX POPULATIONS MICROBIENNES SELECTIONNEES SUR ACETATE.....	111
<b>5</b>	<b>TAUX DE TRAITEMENT DU BIODECHET.....</b>	<b>113</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSIONS DU CHAPITRE 3.....</b>	<b>115</b>

### CHAPITRE 4 : COMPARAISON DE STRUCTURES 2D ET 3D D'ELECTRODES EN FIBRES DE CARBONE.....

<b>1</b>	<b>OBJECTIFS .....</b>	<b>119</b>
<b>2</b>	<b>BILAN SUR LES TRAVAUX REALISES AU LGC AVANT LA THESE AVEC LE TISSU ET LE FEUTRE DE CARBONE.....</b>	<b>120</b>
<b>3</b>	<b>COMPARAISON DU TISSU DE CARBONE ET DU FEUTRE DE CARBONE COMME MATERIAU SUPPORT DE LA FORMATION DE BIOANODES.....</b>	<b>121</b>
3.1	PUBLICATION 2 : LES MEMES PERFORMANCES ELECTROCATALYTIQUES SONT OBTENUES POUR UNE BIOELECTRODE ALIMENTEE EN BIODECHETS, QU'ELLE SOIT FORMEE SUR DU TISSU DE CARBONE 2D OU DU FEUTRE DE CARBONE 3D .....	122

3.2	COMMENTAIRES SUR LA PUBLICATION 2 .....	131
3.3	COMPARAISON DES POPULATIONS MICROBIENNES DES BIOFILMS FORMES SUR TISSU OU FEUTRE DE CARBONE .....	134
<b>4</b>	<b>CONCLUSIONS DU CHAPITRE 4 :</b> .....	<b>138</b>

## **CHAPITRE 5 : L'ELECTROSYNTHESE MICROBIENNE ET LES REACTIONS CATHODIQUES ..... 141**

<b>1</b>	<b>OBJECTIFS</b> .....	<b>143</b>
<b>2</b>	<b>ELECTRODE REVERSIBLE POUR LA FORMATION D'UN BIOFILM CATHODIQUE DE REDUCTION DU CO<sub>2</sub></b> .....	<b>143</b>
2.1	ELECTRODE REVERSIBLE POUR LA REDUCTION D'OXYGENE A LA CATHODE (PUBLICATION 3) .....	144
2.2	ELECTRODE REVERSIBLE FORMEE EN MILIEU « TERREAU » POUR LA REDUCTION DU CO <sub>2</sub> .....	144
2.3	ELECTRODE REVERSIBLE FORMEE A PARTIR D'UN INOCULUM PROVENANT DE BOUES POUR LA REDUCTION DU FUMARATE ET DU CO <sub>2</sub> .....	148
<b>3</b>	<b>MISE EN ŒUVRE DE <i>GEOBACTER SULFURREDUCTENS</i></b> .....	<b>155</b>
<b>4</b>	<b>PUBLICATION 4 : IMPORTANCE DE L'INTERMEDIAIRE HYDROGENE POUR LA REDUCTION MICROBIENNE DU CO<sub>2</sub> PAR LE PROCEDE D'ELECTROSYNTHESE MICROBIENNE.</b> .....	<b>159</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSIONS DU CHAPITRE 5</b> .....	<b>185</b>

## **CHAPITRE 6 : DEVELOPPEMENT D'UNE CELLULE D'ELECTROLYSE MICROBIENNE ..... 187**

<b>1</b>	<b>CELLULE D'ELECTROLYSE MICROBIENNE SANS MEMBRANE</b> .....	<b>189</b>
1.1	ELECTROLYSEUR MICROBIEN SANS MEMBRANE : PREMIERS ESSAIS .....	190
1.2	ELECTROLYSEUR MICROBIEN SANS MEMBRANE : INFLUENCE DE LA CONDUCTIVITE .....	193
<b>2</b>	<b>DIMENSIONNEMENT D'UN PROTOTYPE D'ELECTROLYSEUR MICROBIEN AVEC MEMBRANE</b> .....	<b>196</b>
2.1	ARCHITECTURE DU REACTEUR.....	196
2.2	ALIMENTATION EN ANOLYTE .....	197
2.3	PRODUCTION D'HYDROGENE.....	197
2.4	SURFACE DE L'ANODE .....	198
2.5	VOLUME DU COMPARTIMENT ANODIQUE .....	198
2.6	CHOIX DU CATHOLYTE ET DE LA MEMBRANE DE SEPARATION .....	200
2.7	VOLUME DU COMPARTIMENT CATHODIQUE.....	203
2.8	BILAN SUR LE DIMENSIONNEMENT .....	204
<b>3</b>	<b>TESTS AVEC LE PROTOTYPE D'ELECTROLYSEUR MICROBIEN AVEC MEMBRANE</b> .....	<b>206</b>
3.1	PREMIERE CONFIGURATION (MEMBRANE DE MICROFILTRATION / CATHOLYTE : EAU COURANTE) .....	206
3.2	DEUXIEME CONFIGURATION (MEMBRANE CATIONIQUE / SOLUTION PHOSPHATE 0.4M).....	211
<b>4</b>	<b>SYNTHESE DES RESULTATS ET BILAN SUR L'ELECTROLYSEUR MICROBIEN</b> .....	<b>220</b>
4.1	DESIGN CONVENTIONNEL : CEM SANS MEMBRANE .....	220
4.2	DESIGN OPTIMISE : CEM AVEC MEMBRANE DE MICROFILTRATION (CATHOLYTE : EAU POTABLE).....	220
4.3	DESIGN OPTIMISE : CEM AVEC MEMBRANE CATIONIQUE (CATHOLYTE : SOLUTION PHOSPHATE 0.4M).....	221
4.4	BILAN .....	221

<b>CHAPITRE 7 : SYNTHÈSE DE MOLECULES ORGANIQUES A PARTIR DE DIOXYDE DE CARBONE ET D'HYDROGENE .....</b>	<b>225</b>
<b>1 OPTIMISATION DES CONTACTEURS GAZ-LIQUIDE (CGL) .....</b>	<b>227</b>
1.1 VERSION 1.0.....	230
1.2 VERSION 1.1.....	233
1.3 VERSION 1.2.....	233
1.4 VERSION 2.0.....	236
1.5 BILAN : .....	237
<b>2 CATALYSE MICROBIENNE HETEROGENE .....</b>	<b>238</b>
2.1 PRINCIPE GENERAL DE L'INVENTION.....	238
2.2 PUBLICATION 5 : CATALYSE MICROBIENNE HETEROGENE POUR L'HYDROGENATION DU CO <sub>2</sub> .....	238
<b>3 COMMENT COMPARER LES RESULTATS OBTENUS EN CGL A CEUX DE L'ELECTROSYNTHESE MICROBIENNE ?.....</b>	<b>249</b>
<b>4 BILAN SUR LES ESSAIS EN CONTACTEURS GAZ-LIQUIDE .....</b>	<b>250</b>
<b>CONCLUSIONS GENERALES .....</b>	<b>253</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>259</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>283</b>





# Introduction générale





L'énergie, les carburants et les molécules de base pour les industries chimiques sont aujourd'hui presque exclusivement produits à partir de pétrole, pilier de notre économie. Le modèle de développement économique actuel basé sur des ressources finies amorce une transition vers un modèle plus durable.

Les objectifs de l'Union Européenne pour 2020 sont la réduction de 20% de la consommation d'énergie primaire, l'augmentation de 20% de la part des énergies renouvelables, la réduction de 20% des rejets de gaz à effet de serre (comparé à 1990) et l'augmentation de 10% de la part des biocarburants<sup>1</sup>.

La production de molécules chimiques à partir de ressources renouvelables devra jouer un rôle important pour réduire notre impact environnemental et diminuer notre dépendance aux ressources fossiles. La pertinence environnementale des produits biosourcés dépend toutefois en grande partie de la nature de la ressource mobilisée, qui peut avoir des conséquences tant pour la production alimentaire que pour le niveau d'émissions de gaz à effet de serre. Dans ce cadre, l'utilisation de déchets issus de l'assainissement, comme les boues de station d'épuration ou les biodéchets, est particulièrement intéressante car elle conduit à des effets de substitution important de ressources fossiles et ces déchets sont disponibles à un coût réduit.

Les boues issues du traitement d'effluents urbains ou industriels sont actuellement dirigées principalement vers trois filières d'élimination et de valorisation, à savoir, la valorisation agricole par épandage (60%), la mise en décharges, aujourd'hui requalifiées en centres d'enfouissement techniques (20 à 25%) et l'incinération (15 à 20%). Des alternatives ont été développées ces dernières années pour traiter les boues par oxydation physique (généralement thermique), chimique (ozonolyse, chaulage, ...) ou biologique. Toutefois, ces traitements onéreux sont aussi responsables du rejet atmosphérique d'importantes quantités de dioxyde de carbone et autres polluants gazeux.

En France, les projets de recherche se multiplient pour associer au traitement des déchets la récupération de la valeur intrinsèque de toutes les fractions de leur matière organique, soit sous forme d'énergie avec la production de méthane ou d'hydrogène (projets ANR Symbiose et InGEcoH en 2008, projet Autoferm en 2013), soit la valorisation agronomique (projet ANR Diva en 2010) soit sous forme de molécules chimiques d'intérêt comme l'éthanol (Rabelo et al., 2011), les lipides (Cescut et al., 2014; Fontanille et al., 2012), ou les biomatériaux comme les polymères (projet ANR Valoria en 2008) (Grousseau et al., 2014; Cavaillé et al., 2013).

La valorisation de la matière en intégrant le recyclage des déchets et des sous-produits, avec une empreinte écologique positive pour produire des molécules, des matériaux et de l'énergie, définit le concept de bioraffinerie. Ce concept s'étend désormais aux industries de l'assainissement (Liguori et al., 2013; Li and Yu, 2011), et change peu à peu le paradigme pour la conception des stations d'épuration.

C'est dans ce contexte que s'inscrit le projet BIORARE « Bioélectrosynthèse pour le raffinage des déchets résiduels », financé par l'ANR au titre du Programme Investissements d'Avenir AAP Biotechnologies et Bioressources. Le projet s'appuie sur une technologie de rupture : l'électrosynthèse microbienne. Il a

---

<sup>1</sup> COM(2007) 2 du 10/01/2007 « Limiter le réchauffement de la planète à 2 degrés Celsius : Route à suivre à l'horizon 2020 et au-delà », <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=COM:2007:0002:FIN:FR:PDF>

récemment été montré que certains microorganismes, dit électroactifs, sont capables d'utiliser une cathode comme donneur d'électrons pour assurer la réduction du dioxyde de carbone en molécules organiques. Cette découverte ouvre la porte à un rêve technologique que l'on pensait inaccessible : la production directe de carburants et de molécules organiques à partir seulement de  $\text{CO}_2$  et d'électricité d'origine renouvelable. L'électrosynthèse microbienne offre la possibilité de réguler le potentiel de la cathode, ouvrant ainsi de nouvelles perspectives pour orienter les processus métaboliques microbiens.

Le projet BIORARE propose de développer un procédé qui associe l'électrosynthèse microbienne côté cathode à l'oxydation de la matière organique contenue dans les déchets côté anode. L'oxydation et la réduction sont possibles grâce à au développement de biofilms électroactifs qui recouvrent la surface des électrodes et jouent le rôle de catalyseur des réactions électrochimiques. La Figure 1 présente le schéma du procédé Biorare initialement envisagé pour l'électrosynthèse microbienne.

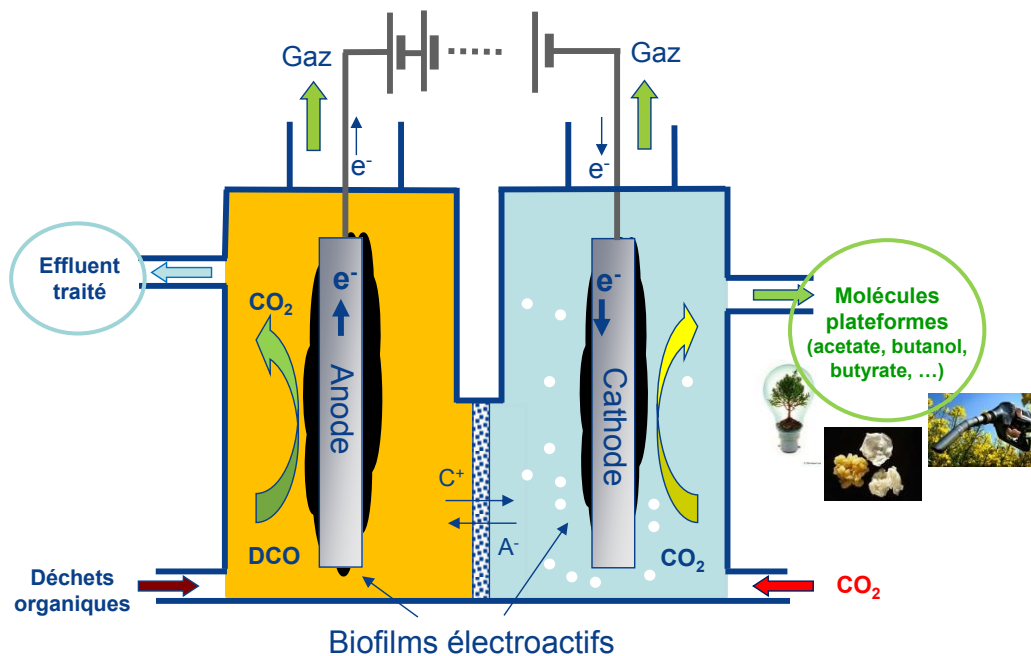


Figure 1 : Schéma du procédé initial Biorare.

Ce procédé constitue une technologie extrêmement prometteuse pour la bioraffinerie de déchets organiques car l'oxydation des flux contaminés de déchets à l'anode peut être physiquement dissociée de la synthèse des produits biosourcés à la cathode, ce qui facilite grandement la récupération et la purification des molécules synthétisées, et permet de répondre à certaines contraintes réglementaires.

Le concept de l'électrosynthèse microbienne n'a que quelques années. En s'appuyant sur des recherches scientifiques, techniques, environnementales et économiques, l'objectif du projet BIORARE est d'identifier les composants clés ainsi que les spécifications associées pour l'élaboration d'une stratégie de développement industriel ultérieure. Le but est ainsi d'établir un cahier des charges détaillé pour l'application de l'électrosynthèse microbienne à la bioraffinerie des déchets organiques.

A la croisée entre l'électrochimie et les bioprocédés, les travaux menés dans le cadre de cette thèse couvrent la tâche 2 du projet BIORARE : « Comprendre et optimiser les performances bioélectrochimiques ». L'objectif de ces recherches est l'obtention d'un système capable d'oxyder efficacement la matière organique à l'anode tout en produisant des molécules à la cathode à l'aide d'un minimum d'énergie électrique apportée.

Ce mémoire de thèse est divisé en sept chapitres. Dans le chapitre 1 est présenté l'état de l'art nécessaire pour appréhender les différents éléments du procédé Biorare. Le chapitre 2 regroupe le matériel et les protocoles utilisés pour les expériences. Les chapitres 3 à 7 traitent de l'ensemble des résultats obtenus.

Ils s'appuient sur 5 articles scientifiques (3 publiés, 2 soumis) :

- 1- "Comparison of synthetic medium and wastewater used as dilution medium to design scalable microbial anodes: Application to food waste treatment", publié dans le journal "Bioresource Technology"
- 2- "Two-dimensional carbon cloth and three-dimensional carbon felt perform similarly to form bioanode fed with food waste", soumis pour publication dans le journal "Electrochemistry Communications"
- 3- "Protons accumulation during anodic phase turned to advantage for oxygen reduction during cathodic phase in reversible bioelectrodes", publié dans le journal "Bioresource Technology"
- 4- "Importance of the hydrogen route in up-scaling electrosynthesis for microbial CO<sub>2</sub> reduction", publié dans le journal "Energy & Environmental Science"
- 5- "Heterogeneous Microbial Catalysis for CO<sub>2</sub> Hydrogenation" soumis pour publication dans le journal "Angewandte Chemie"

Les chapitres 3 et 4 concernent l'utilisation de différents déchets à l'anode et l'influence des conditions opératoires sur la formation et les performances de la bioanode. Le chapitre 5 porte sur la formation d'une biocathode et les réactions associées dans le compartiment cathodique. Ce chapitre aboutit à une nouvelle configuration du procédé d'électrosynthèse microbienne : il est proposé de découpler le procédé initial en deux étapes : l'intermédiaire réactionnel hydrogène est produit dans une cellule d'électrolyse microbienne qui oxyde les biodéchets et, en aval, un contacteur gaz-liquide utilise l'hydrogène pour convertir le CO<sub>2</sub> en molécules organiques (Figure 2).

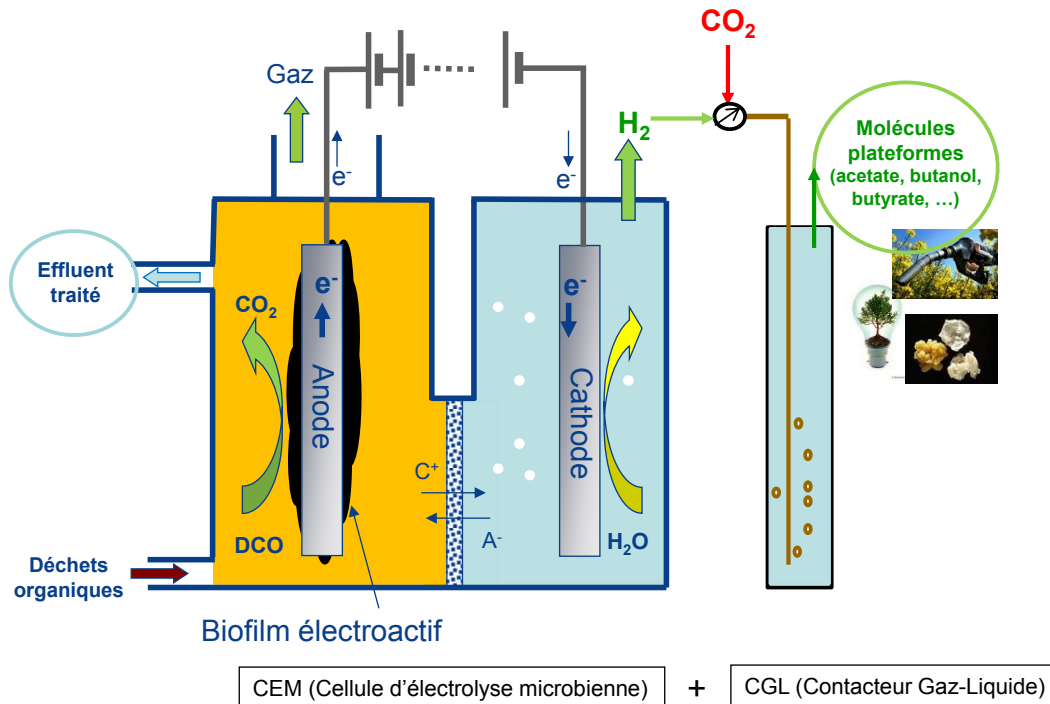


Figure 2 : Schéma du nouveau procédé Biorare proposé : découplage du procédé initial en 2 étapes constitué d'une cellule d'électrolyse microbienne associée à un contacteur gaz-liquide en aval.

Finalement, cette nouvelle configuration en deux étapes est examinée dans les chapitres 6 et 7. Le chapitre 6 présente les résultats obtenus en cellule d'électrolyse microbienne sans membrane ainsi que la conception et les premiers essais d'une cellule d'électrolyse microbienne avec membrane à l'échelle d'un prototype de laboratoire. Dans le chapitre 7 sont présentés les résultats obtenus avec différentes versions de contacteurs gaz-liquide alimentés en  $H_2$  et  $CO_2$ , avec une identification et une quantification des molécules synthétisées par les systèmes microbiens hydrogénotrophes mis en œuvre.





# Chapitre 1 : Bibliographie





Le travail effectué pour le développement du procédé Biorare a balayé de nombreux aspects des technologies électro-microbiennes (TEM), depuis la conception de bioanodes et une incursion dans les mécanismes des biocathodes, jusqu'aux premiers pas vers la conception d'un prototype de laboratoire préfigurant un pilote de grande taille. La bibliographie correspondante couvre donc un champ extrêmement large. De très nombreux auteurs ont proposé des revues sur les TEM, de l'échelle microscopique jusqu'aux différentes applications possibles. Les mécanismes moléculaires des transferts d'électrons entre électrodes et bactéries électroactives sont largement décrits (Kumar et al., 2016; Sydow et al., 2014; Millo, 2012; Rosenbaum et al., 2011; Logan, 2009), même s'ils ne sont pas complètement élucidés. Une revue récente aborde le même sujet chez les levures (Hubenova and Mitov, 2015). Certains auteurs pensent que tous les écosystèmes peuvent potentiellement contenir des bactéries électroactives (Chabert et al., 2015), l'écologie microbienne est donc un angle d'approche souvent privilégié et plusieurs se penchent sur la diversité des espèces électroactives (Logan, 2009) et les communautés microbiennes qui colonisent les électrodes (Dopson et al., 2015; Zhi et al., 2014).

La caractérisation et le design des bioélectrodes constitue également un axe privilégié d'analyse bibliographique (Xie et al., 2015; Rimboud et al., 2014; Ghasemi et al., 2013). Les défis associés au développement concret des TEM en général sont répertoriés dans de nombreux travaux (Butti et al., 2016; Krieg et al., 2014; Torres, 2014; Venkata Mohan et al., 2014b; Wang and Ren, 2013; Rosenbaum and Franks, 2013) avec plusieurs revues dédiées aux problèmes liés aux séparateurs (Daud et al., 2015; Dhar and Lee, 2013). Certaines revues traitent plus spécifiquement d'une technologie, par exemple les piles à combustibles microbiennes (PACM) (Choi, 2015; Corbella et al., 2015; Logan et al., 2015; Venkata Mohan et al., 2014a; Logan et al., 2006), les cellules d'électrolyse microbienne (CEM) (Zhang and Angelidaki, 2014; Zhou et al., 2013) ou les systèmes d'électrosynthèse microbienne (Tremblay and Zhang, 2015; Lovley and Nevin, 2013; Desloover et al., 2012). Le développement des PACM est le plus avancé : des revues récentes sur leur modélisation (Ortiz-Martínez et al., 2015) et sur les circuits électroniques à leur associer pour récupérer l'énergie produite (Wang et al., 2015b) permettent d'envisager une montée en échelle relativement proche. Les applications dans le secteur de l'environnement sont nombreuses et font également l'objet de revues spécifiques comme la bioremédiation des sols (Wang et al., 2015a), la récupération des métaux dans les eaux usées (Nancharaiah et al., 2015; Wang and Ren, 2014), le traitement des eaux usées (Kelly and He, 2014; W.-W. Li et al., 2014) ou encore la désalinisation des eaux (Saeed et al., 2015). Finalement, pour clarifier les nombreuses terminologies employées dans le domaine des TEM et aider à la communication sur le sujet, Schröder et al. (2015) proposent un classement de toutes les technologies basées sur une interface entre microbiologie et électrochimie.

L'état des avancées scientifiques et techniques a été publié dans de très nombreuses revues bibliographiques récentes, suivant de multiples grilles de lecture. Il serait inutile de reprendre le même exercice. L'état de l'art présenté ici est donc loin d'être exhaustif. Il a plutôt été choisi de focaliser l'analyse bibliographique sur les quatre axes qui constituent la trame du travail de thèse :

La bioanode / La cellule d'électrolyse microbienne / La biocathode / La synthèse de molécules organiques à partir de dioxyde de carbone et d'hydrogène.

## 1 La bioanode

### 1.1 Un peu d'histoire...

Dès 1910, Michael Cresse Potter, professeur de botanique à l'Université de Durham (Royaume-Uni), a observé que la bactérie *Escherichia coli* produisait de l'électricité (Potter, 1911). En 1931, Barnet Cohen a repris l'idée de Potter en connectant plusieurs piles microbiennes en séries pour augmenter la tension totale (Cohen, 1931). Au début des années 1980, une équipe du King's College de Londres, dirigée par Peter Bennetto, eut l'idée d'augmenter le rendement des piles microbiennes en recourant à un médiateur qui améliore le transfert des électrons entre les bactéries et l'anode (Bennetto, 1981). Les médiateurs redox typiques sont le 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone (HNQ) (Allen and Bennetto, 1993), le rouge neutre (Park and Zeikus, 2000), le Fe(III)EDTA (Vega and Fernández, 1987).

Cependant, la toxicité et l'instabilité des médiateurs limitent leur utilisation dans les systèmes électro-microbiens. Une avancée récente majeure, qui a conduit à la renaissance de la technologie des piles microbiennes fut la découverte que certains microorganismes peuvent transférer directement les électrons à l'anode (Chaudhuri and Lovley, 2003; Kim et al., 1999). Dans ces études, le substrat utilisé à l'anode est alors le lactate ou le glucose pour les bactéries *Shewanella putrefaciens* ou *Rhodospirillum rubrum*, respectivement mis en œuvre.

### 1.2 Les mécanismes de transfert d'électrons

Le transfert d'électrons entre un microorganisme et une électrode peut être direct ou indirect (Figure 3).

#### 1.2.1 Transfert indirect

De nombreuses bactéries comme *Shewanella oneidensis*, *Pseudomonas alcaliphila*, *Pseudomonas aeruginosa* sont capables de produire leur propre médiateur. Par exemple la pyocyanine (un pigment) a été identifiée comme le responsable de l'activité électrochimique chez *P. aeruginosa* (Rabaey et al., 2004). Pour *S. oneidensis*, la production du médiateur de type quinone (2-amino-3-dicarboxy-1,4-naphthoquinone) permet d'augmenter par un facteur 2 la densité de puissance d'une pile à combustible microbienne (PACM) par rapport à une PACM sans le médiateur (Freguia et al., 2010b).

Le transfert indirect d'électrons peut également s'effectuer via l'oxydation d'un produit issu du métabolisme bactérien. Un exemple est l'hydrogène produit par fermentation chez certaines bactéries et qui est ensuite oxydé à la surface de l'anode (Niessen et al., 2006).

#### 1.2.2 Transfert direct

Le transfert direct d'électrons entre la bactérie et l'électrode se fait par contact direct entre la membrane externe de la bactérie et la surface de l'anode (Bond et al., 2002). L'échange ultime d'électrons entre la cellule et l'électrode est assuré par des protéines membranaires, des cytochromes de type C. Le mécanisme de transfert direct via les cytochromes a été clairement démontré chez *Geobacter sulfurreducens* grâce à des expériences réalisées avec des mutants où le gène codant pour les cytochromes C a été délété ou surexprimé (Lovley, 2006). *G. sulfurreducens* est devenu un

microorganisme modèle pour étudier le mécanisme de transfert direct d'électrons. Son génome est connu et l'équipe américaine du professeur Derek Lovley a acquis de nombreuses connaissances sur ce microorganisme grâce à de précédentes études en biorémédiation.

Plus récemment, en 2005, un nouveau mécanisme de transfert direct a été décrit. Il a lieu via des connexions conductrices extracellulaires appelées pili conducteurs ou « nanowires » (Reguera et al., 2005). Plus de détails sur les mécanismes de transfert sont disponibles dans d'autres thèses réalisées au LGC, comme par exemple celle de Diana Pocaznoi, (2012).

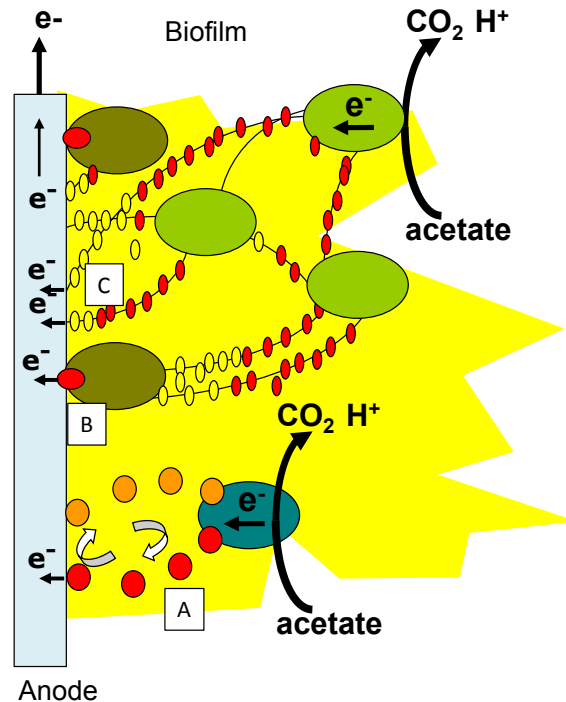


Figure 3 : Schéma des différents mécanismes impliqués dans le transfert d'électrons : (A) Transfert indirect via des médiateurs ou des produits de fermentation ; (B) transfert direct via les cytochromes ; (C) transfert direct via des pili conducteurs. (Schéma d'après Alain Bergel).

### 1.3 Différents substrats à l'anode

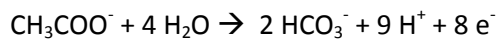
Les microorganismes peuvent oxyder une grande variété de molécules organiques, en produisant de l'énergie utile pour leur croissance et le maintien de leur métabolisme. Le substrat sert de source de carbone et d'énergie. Les combustibles utilisés à l'anode peuvent correspondre à toute sorte de matières organiques des plus simples (glucose, acétate, carbohydrates...) aux plus complexes (cellulose, mélasses...) mais aussi des déchets organiques contenus dans les eaux des stations d'épuration, des déchets agricoles (laiteries, lisiers...), des déchets domestiques et tout type de substrats fermentescibles.

L'efficacité de la conversion biochimique du substrat organique en énergie dépend de sa composition, de ses caractéristiques et de la concentration de ses différents composants. Le substrat influence la composition de la population microbienne qui se développe à l'anode, et également les performances

bioélectrochimiques comme la densité de courant ou le rendement faradique de la bioanode (Chae et al., 2009).

Dans une grande majorité des études relatives aux technologies électro-microbiennes (TEM), l'acétate est le substrat de choix pour la production d'électrons à l'anode (Pisciotta et al., 2012; Torres et al., 2009; Parot et al., 2008; Bond and Lovley, 2003; Bond et al., 2002). L'acétate est un substrat simple et est le produit final de fermentation pour de nombreuses voies métaboliques à partir de sources carbonées plus complexes : fermentation acétique à partir de l'éthanol (production du vinaigre), voie d'Entner-Doudoroff à partir de glucose, l'acidogénèse à partir de matière organique complexe (protéine, saccharides, lipides...).

La réaction anodique d'oxydation de l'acétate correspond à l'équation suivante :



8 moles d'électrons sont produites à partir d'une mole d'acétate. Une acidification locale apparaît à l'anode. Le milieu synthétique utilisé est souvent composé d'une solution tamponnée par des phosphates qui améliore le transport de protons hors du biofilm et limite l'impact de l'acidification sur le biofilm (Rimboud et al., 2014).

Liu et al. (2009) ont montré que l'utilisation d'acétate en tant que substrat à l'anode d'une PACM multiplie les performances d'un facteur 2 comparé à une PACM alimentée par un effluent complexe riche en protéines, contenant de la peptone, de l'extrait de viande et du glucose. L'acétate est également le meilleur substrat pour Chae et al. (2009), lorsqu'il est comparé au butyrate, propionate ou glucose. Le glucose ou encore le lactate sont deux autres substrats classiquement employés pour les études impliquant l'utilisation de systèmes électro-microbiens (Catal et al., 2008; Manohar and Mansfeld, 2009; Rabaey et al., 2003).

Pant et al. (2010) font la liste de différents substrats utilisés à l'anode des PACM : arabitol, cystéine, éthanol, propionate, fumarate, amidon, eaux usées artificielles, etc... Dans la majorité des études, le milieu et la source carbonée utilisée sont synthétiques, c'est-à-dire préparées au laboratoire avec une composition précisément connue. Certaines études s'orientent tout de même vers l'utilisation d'effluents réels bruts à l'anode et se rapprochent ainsi des conditions d'application du procédé. Pant et al. (2010) rapportent l'utilisation d'eaux usées réelles urbaines (boues, biodéchets) ou industrielles (brasserie, chocolaterie, papeterie, porcherie).

#### **1.4 Les technologies électro-microbiennes pour la valorisation des résidus de l'assainissement.**

En dehors de leurs applications potentielles en tant que biocapteurs, les TEM pourraient trouver leurs débouchés dans le traitement et la valorisation des déchets. L'utilisation de PACMs dans le domaine du traitement des eaux usées a été considérée dès 1991 (Habermann and Pommer, 1991). L'utilisation de déchets à l'anode permet d'assurer une double fonction: produire un flux d'électrons tout en intensifiant les procédés de traitement des effluents par accélération de la dégradation de la matière organique. En

dehors de l'abattement de la DCO (Demande Chimique en Oxygène), les TEM peuvent aussi permettre de traiter les nitrates (Yang et al., 2015), les sulfures (Rabaey et al., 2006), ou encore de récupérer le cuivre dans les eaux usées (Cai et al., 2015).

En 2004 dans l'équipe du professeur Bruce Logan, Liu et al. (2004) démontrent la possibilité d'alimenter une PACM avec des eaux usées, obtenant une puissance électrique de 26 mW/m<sup>2</sup> tout en éliminant 80% de la DCO. Les densités de courant obtenues à l'anode alimentée avec un effluent brut réel restent modestes : une densité de courant de 0.18 A/m<sup>2</sup> a été reportée par Rodrigo et al. (2007) avec des eaux usées urbaines, 2 A/m<sup>2</sup> avec des eaux usées de brasserie (Feng et al., 2008), 3 A/m<sup>2</sup> avec des eaux usées de chocolaterie (Patil et al., 2009) et 4-6 A/m<sup>2</sup> avec des effluents papetiers (Ketep et al., 2013).

Jusqu'à présent, les performances reportées pour le traitement d'effluents réels sont inférieures à celles obtenues en utilisant un effluent synthétique et le substrat acétate. L'effort doit être poursuivi pour démontrer la possibilité d'utilisation des TEM en conditions réelles et pour envisager une montée en échelle.

## **1.5 Valorisation des biodéchets**

Dans le cadre du projet Biorare, la technologie est appliquée aux résidus de l'assainissement urbain, tels que les boues primaires, secondaires ou encore les biodéchets, qui ont été sélectionnés pour notre étude. Les biodéchets sont générés en grande quantité et nécessitent d'être traités avant leur rejet (Pant et al., 2013).

### **1.5.1 Définition du biodéchet**

La définition est issue de l'article R. 541-8 du code de l'environnement, le biodéchet est : « Tout déchet non dangereux biodégradable de jardin ou de parc, tout déchet non dangereux alimentaire ou de cuisine issu notamment des ménages, des restaurants, des traiteurs ou des magasins de vente au détail, ainsi que tout déchet comparable provenant des établissements de production ou de transformation de denrées alimentaires ». En France, le gisement de biodéchet s'élèverait à 350 kg/an/habitant (données ADEME 2013).

Avec plus de 7 milliards de repas servis chaque année, le secteur de la restauration est un des plus importants producteurs de biodéchets issus de l'alimentation. Chaque année, en France, le secteur de la restauration (commerciale et collective) produit environ 900 000 tonnes de biodéchets : denrées périmées, rebuts de préparation, reliefs de table... Ce sont ces déchets alimentaires qui sont considérés pour ces travaux de thèse.

### **1.5.2 Références réglementaires**

La loi du 12 juillet 2010, dite loi Grenelle 2, codifiée à l'article L. 541-21-1 du code de l'environnement, prévoit que les personnes qui produisent ou détiennent une quantité importante de biodéchets sont tenues d'en assurer le tri à la source en vue de leur valorisation organique.

L'obligation de tri consiste à ne pas mélanger les déchets organiques avec les autres déchets (emballages par exemple). Cette obligation doit contribuer à l'atteinte de différents objectifs du Grenelle de l'environnement. L'arrêté du 12 juillet 2011 fixe les seuils de production au-delà desquels les émetteurs de tous secteurs confondus (restauration, industries agroalimentaires), sont tenus de trier et valoriser les biodéchets. Le fait de ne pas mettre en place le tri à la source des biodéchets est un délit. La peine encourue est une amende de 75 000 € et une peine d'emprisonnement de deux années.

### 1.5.3 Utilisation de biodéchets à l'anode des TEM

Actuellement, il existe seulement deux modes de valorisation des biodéchets : compostage ou méthanisation. Proposer de nouvelles technologies comme les TEM pour le traitement et la valorisation des biodéchets apparait comme une option intéressante au niveau économique et écologique.

En 2010, plus de 34 millions de tonnes de biodéchets ont été générés aux Etats-Unis, dont seulement 3% furent recyclés, d'après l'agence de protection de l'environnement américaine (Li et al., 2013). Malgré l'intérêt économique que la valorisation des biodéchets représente, peu d'études ont examiné la faisabilité d'utilisation de biodéchets à l'anode des TEM. Ces études sont répertoriées dans le Tableau 1.

**Tableau 1 : Liste des études utilisant des biodéchets pour alimenter la bioanode des TEM (piles à combustible / Microbial Fuel Cell - MFC ou électrolyseurs / Microbial Electrolysis Cell - MEC).**

Food waste type	sCOD (gO <sub>2</sub> /L)	Dilution medium	Inoculum	Bioanode type	Configuration	Performances (A/m <sup>2</sup> )	References
Food processing wastewater (Cereal)	8.9	Synthetic medium	Sludge	Toray carbon paper (22.5 cm <sup>2</sup> )	MFC	0.24	(Oh and Logan, 2005)
Food industry waste (Yoghurt waste)	N/A	Synthetic medium	Anaerobic sludge	Graphite felt (10 cm <sup>2</sup> )	MFC	0.4	(Cercado-Quezada et al., 2010a)
Canteen food waste	12	Tap water	Anaerobic sludge	Graphite plate (70 cm <sup>2</sup> )	MFC	1.6	(Goud et al., 2011)
Food waste from student's cafeteria	27.5	Synthetic medium	Anaerobic sludge	Carbon felt (50 cm <sup>2</sup> )	MFC	0.45	(Choi et al., 2010)
Food waste leachate	12.7	Deionized water	Anaerobic sludge	Carbon felt (21 cm <sup>2</sup> )	MFC	0.1	(Li et al., 2013)
Fermented reconstituted food waste	13	Domestic wastewater	Compost	Carbon felt (10 cm <sup>2</sup> )	MFC	0.065	(Pant et al., 2013)
Food processing wastewater	1.8	No dilution	Acclimated biomass	Graphite fiber brushes	MEC	2	(Tenca et al., 2013)

## 1.6 Les matériaux supports de bioanodes

Les contraintes associées au choix de l'électrode sont les suivantes : les électrodes doivent posséder un matériau de base présentant une bonne conductivité, une bonne stabilité chimique, une bonne tenue mécanique et être bon marché (Zhou et al., 2011).

Les électrodes ne sont pas uniquement des conducteurs de courant, mais jouent aussi le rôle de support pour le développement du biofilm électroactif. Il faut par conséquent une surface biocompatible (Morozan et al., 2007) et présentant des caractéristiques favorables au développement d'un biofilm.

Les matériaux à base de carbone et les métaux non oxydables répondent à ces critères et sont les matériaux les plus utilisés (Figure 4). Ces dernières années, parmi les matériaux à base de carbone, de nombreuses formes ont été testées (Wei et al., 2011). Les plus courantes sont le papier carbone, les plaques ou les tiges de graphite (graphite rod), les tissus de carbone (carbon cloth), les grilles de carbone, les granules de graphite, les granules de charbon actif, le feutre de carbone (carbon felt), ou encore les brosses de graphite (fiber brush).

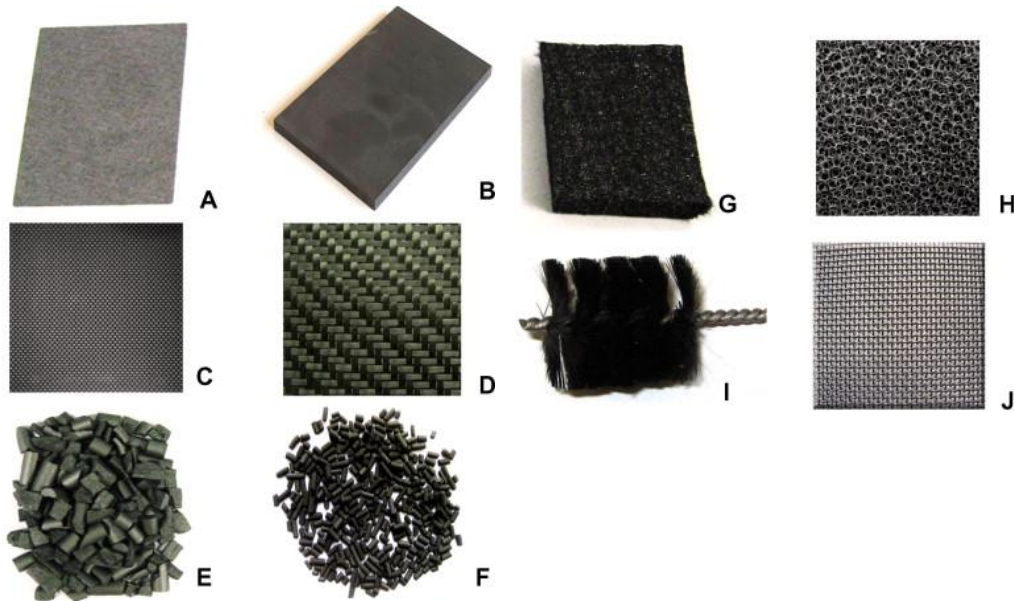


Figure 4 : Photographie des matériaux d'électrode les plus couramment employés : (A) Papier carbone (B) Plaque de graphite (C) Tissu de carbone (D) Grille de carbone (E) Granules de graphite (F) Granules de charbon actif (G) Feutre de carbone (H) Carbone vitreux réticulé (I) Brosse de carbone (J) Grille d'acier inoxydable. Figure tirée de (Wei et al., 2011).

Le Tableau 2 regroupe quelques caractéristiques des matériaux utilisés ainsi que les références de certaines études dans lesquelles le matériau est mis en œuvre en tant que support pour la formation d'une bioanode.



**Tableau 2 : Avantages et inconvénients des différents matériaux utilisés comme support de bioanode et références de quelques travaux dans lesquels le matériau est mis en œuvre.**

Matériau d'anode	Avantages	Inconvénients	Références
Tige de graphite	Conductivité, stabilité chimique, peu onéreux	Faible surface active par rapport au volume	(Patil et al., 2011; Torres et al., 2008)
Brosse de graphite	Grande surface spécifique, facile à produire	Encrassement	(Ahn and Logan, 2010)
Tissu de carbone	Grande porosité	Cher	(Blanchet et al., 2014; Cheng et al., 2006)
Papier carbone	Facile à connecter au collecteur	Fragile, peu durable	(Boghani et al., 2013; Liu et al., 2005)
Feutre de carbone	Large accessibilité pour le substrat et les bactéries	Grande résistance électrique	(Kim et al., 2002; Ringeisen et al., 2007; Ye et al., 2015)
Carbone vitreux réticulé	Bonne conductivité Grande taille de pores (10 « pores per inch »)	Résistance électrique, fragile (cassant)	(He et al., 2005)
Granules de graphite	Grande surface spécifique	Difficulté pour la collecte du courant	(Aelterman et al., 2008; Rabaey et al., 2005; Tran et al., 2010)
Mousse de graphite	Grande surface spécifique	Risque d'encrassement des pores	(Cheng et al., 2006; Morozan et al., 2007)

Certaines études ont comparé les performances anodiques obtenues avec différents matériaux d'anode en conditions similaires. La revue de Rimboud et al. (2014) rapporte la comparaison de tiges de graphite, tiges de carbone polycristallin, tissus de carbone et papier carbone. Ils en concluent qu'une géométrie de surface favorable à la colonisation par le biofilm (disponibilité en surface active, porosité,...) est un paramètre plus important que la nature du matériau carboné lui-même (amorphe, cristallin, pureté...).

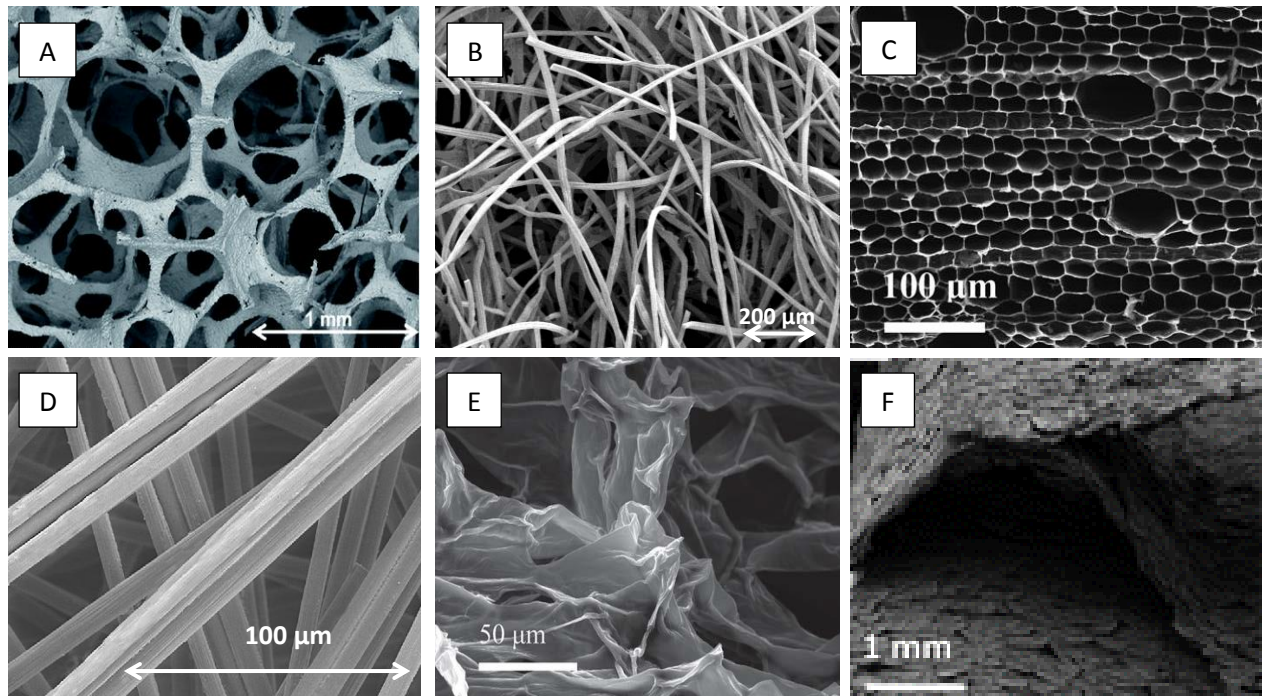
Différentes équipes de recherche se sont intéressées à l'amélioration des performances via l'augmentation de la surface active de l'électrode, c'est-à-dire la surface accessible pour la colonisation par le biofilm. Le remplacement des électrodes planes par des électrodes tridimensionnelles (3D) permet l'augmentation de cette surface active.

### 1.7 Les électrodes tridimensionnelles pour augmenter les performances anodiques

Xie et al. (2011) ont développé une configuration d'électrode 3D qui combine conductivité, biocompatibilité et structure ouverte en enrobant les fibres d'une structure macroporeuse textile par des nanotubes de carbone. Ils ont montré que la densité de courant générée avec ce type d'anode ( $7.2 \text{ A/m}^2$ ) était augmentée d'un facteur 2.6 par rapport à une électrode en tissu de carbone ( $2.8 \text{ A/m}^2$ ). (Logan et al., 2007) améliorèrent les performances obtenues sur papier carbone en utilisant une brosse de graphite en tant qu'électrode ( $1430 \text{ mW/m}^2$  avec la brosse contre  $600 \text{ mW/m}^2$  avec du papier carbone). L'utilisation d'électrodes tridimensionnelles poreuses, comme le feutre de graphite, a

également permis l'amélioration des densités de courant anodiques (Aelterman et al., 2008; Sleutels et al., 2009b). Ye et al. (2015), qui travaillent avec un effluent de porcherie, proposent l'utilisation combinée de feutre de carbone avec des granules de graphite pour augmenter les performances d'une PACM, par rapport à l'utilisation seule du feutre de carbone.

La porosité élevée et la grande taille de pores du matériau sont des éléments essentiels pour l'obtention de densités de courant importantes. En effet, un matériau très poreux permet le développement du biofilm à l'intérieur de la structure sans gêner le transfert des substrat et nutriments. La Figure 5 présente des photographies de structure d'électrodes 3D en microscopie électronique à balayage, avec des tailles de pores ou interstices de 20 à 3000  $\mu\text{m}$  selon les matériaux.



**Figure 5 : Photographies de structures d'électrodes 3D en microscopie électronique à balayage, avec des tailles de pores ou interstices de 20 à 3000  $\mu\text{m}$  selon les matériaux. (A) Mousse d'acier (Ketep et al., 2014) ; (B) Feutre de carbone (Rousseau et al., 2013) ; (C) Mousse de carbone dérivée du kénaf (S. Chen et al., 2012a) ; (D) Voile en fibre de carbone (Liu et al., 2010) ; (E) Mousse de carbone dérivée de pelures de pomelo carbonisées (S. Chen et al., 2012c) ; (F) Carton ondulé carbonisé (S. Chen et al., 2012b)**

La taille des pores est un paramètre particulièrement important : par exemple, il a été montré qu'une électrode en mousse de carbone dérivée du kénaf (plante également appelée chanvre de Deccan) avec une taille de pores entre 20 et 60  $\mu\text{m}$  (Figure 5C) entraîne une limitation du transfert de matière et ne permet pas de maintenir des performances élevées (S. Chen et al., 2012a). En revanche, l'électrode formée à partir de la carbonisation de pelures de pomelo a permis des performances jusqu'à 40  $\text{A}/\text{m}^2$  (S. Chen et al., 2012c). Les pelures de pomelo ont une structure spongieuse avec des pores de 300 à 500  $\mu\text{m}$  (Figure 5E).

L'effet positif des matériaux poreux 3D ont également été mis en évidence avec du non-tissé en fibre de carbone (quelques micromètres ; 30  $\text{A}/\text{m}^2$ ) (Chen et al., 2011), de la mousse d'acier (Figure 5 A; taille de

pores 200-800 $\mu\text{m}$  ; 80 A/m<sup>2</sup>) (Ketep et al., 2014), du feutre de carbone (Figure 5 B; taille de pores 20-200  $\mu\text{m}$  ; 85 A/m<sup>2</sup>) (Rousseau et al., 2013).

Les meilleures performances ont été obtenues avec une électrode fabriquée à partir d'un assemblage de 6 couches de carton ondulé carbonisé (1h – 1000°C sous atmosphère N<sub>2</sub>). La densité de courant atteint 390 A/m<sup>2</sup> (Figure 5 F; taille des pores supérieure à 800  $\mu\text{m}$ ) (S. Chen et al., 2012b).

Cependant, l'utilisation d'une électrode 3D ne garantit pas obligatoirement une augmentation durable de la densité de courant et le problème d'encrassement des pores par le biofilm ou par les particules contenues dans l'effluent à traiter doit être pris en considération. En dehors des problèmes de colmatage et de vieillissement du biofilm, d'autres challenges associés à l'utilisation d'électrodes tridimensionnelles existent. Le mécanisme de transport des électrons au sein d'une matrice 3D pose des problèmes spécifiques qui n'ont pas encore été abordés dans le cadre des TEM et le choix du collecteur de courant (habituellement une tige de graphite) mérite des études complémentaires (Rousseau et al., 2015; Zhou et al., 2011). De plus, certaines configurations 3D induisent une chute ohmique plus importante qu'une structure plane (Aelterman et al., 2008). La construction d'électrode tridimensionnelle répondant aux critères de biocompatibilité, de conductivité et à faible coût reste donc un challenge à relever pour le développement des procédés électro-microbiens.

## 2 Cellules d'électrolyse microbienne (CEM)

### 2.1 Principes de base

Une cellule d'électrolyse se caractérise par un apport en énergie électrique qui est convertie en énergie chimique. Dans le cadre des TEM, il est généralement convenu d'appeler cellules d'électrolyse microbienne (CEM) une cellule d'électrolyse dans laquelle une anode microbienne est associée à une cathode abiotique qui assure la production d'hydrogène par réduction de l'eau. Pour une CEM les paramètres de performance importants sont la production d'hydrogène, la tension d'électrolyse et le rendement faradique.

#### 2.1.1 Production d'hydrogène

Lorsque aucune réaction parasite ne se produit à la cathode, le volume d'hydrogène produit est directement proportionnel au courant électrique traversant la cellule d'électrolyse selon :

Volume d'hydrogène théorique (L) =  $Q * V_m / F * n$

avec  $Q = \int_0^t i dt$  (Cb) ;  $V_m$  : volume molaire (L/moles H<sub>2</sub>) ;  $n$  : nombre de moles d'électrons par moles de H<sub>2</sub> ( $n=2$ ) ;  $F$  : constante de Faraday (Cb/moles d'électrons)

#### 2.1.2 Tension d'électrolyse

La tension d'électrolyse se décompose en quatre termes :

$$U_{\text{cellule}} = U_{\text{rév}} + \eta_{\text{anod}} + \eta_{\text{cath}} + \sum Ri$$

La tension de réversibilité ( $U_{rév}$ ) correspond à l'énergie électrique minimale à fournir au système pour compenser le seuil thermodynamique. Le calcul de cette tension en considérant la dégradation de l'acétate à l'anode et la réduction de l'eau à la cathode donne 0.2 V (Raphaël Rousseau, 2013).

Les termes  $\eta_{Anod}$  et  $\eta_{Cath}$  sont les surtensions anodiques et cathodiques nécessaires pour activer les cinétiques des réactions aux électrodes. Le dernier terme de l'équation  $\sum Ri$ , couramment nommé chute ohmique, est relatif à la dégradation de l'énergie électrique en chaleur par effet Joule lors du passage du courant dans la CEM. Plus les différentes composantes de la cellule d'électrolyse (anolyte, catholyte et séparateur) sont résistifs, plus ce terme est important.

### 2.1.3 Rendement faradique

Le rendement faradique anodique correspond à la part de matière organique dégradée qui est effectivement convertie en électricité. C'est la charge qui passe dans le circuit électrique durant une période donnée, mesurée par intégration du courant, divisée par la charge théorique qui aurait été produite si toute la matière organique dégradée pendant la période l'avait été par oxydation électrochimique :

$$CE = \frac{\int_0^t i(t) dt}{b.F.n_a}$$

avec  $b$  : le nombre de moles d'électrons produites par moles de substrat oxydé (8 pour l'acétate) ;  $F$  : la constante de Faraday (Cb/moles d'électrons) ;  $n$  : le nombre de moles de substrat consommées.

Un rendement faradique cathodique peut également être calculé, qui représente la part du courant servant à la production des molécules visées, ici l'hydrogène. C'est la charge théorique nécessaire pour la synthèse de la molécule, divisée par la charge mesurée expérimentalement.

## 2.2 Conductivité des électrolytes

Le procédé d'électrolyse microbienne est très proche de celui de l'électrosynthèse microbienne, avec un compartiment cathodique qui est souvent abiotique dédié à la production d'hydrogène. Le développement du procédé d'électrolyse microbienne est plus avancé que celui de l'électrosynthèse microbienne, concept plus récent. Néanmoins, si le même procédé à double compartiments est considéré, avec une bioanode alimentée en déchets organiques, les forces et faiblesses des deux systèmes sont en grande partie les mêmes. Un des points clés du développement concerne la conductivité des solutions utilisées aussi bien à l'anolyte qu'au catholyte. Utiliser un électrolyte avec une conductivité ionique élevée est un prérequis essentiel pour minimiser l'énergie à fournir aux électrolyseurs microbiens. Dans la thèse de Raphaël Rousseau (2013), l'utilisation de sédiments de salins provenant d'un environnement à forte teneur en NaCl a permis l'obtention de bioanodes capables de travailler à des conductivités de l'ordre de 100 mS/cm. Dans ces conditions, deux genres bactériens *Desulfuromonas* et *Marinobacter* sont enrichis au niveau des bioanodes (Rousseau et al., 2014). Cependant, la stratégie employée ne peut être mise en œuvre pour le projet Biorare qui a pour objectif de traiter un effluent de faible salinité à l'anode. Il n'est pas envisageable d'ajouter des sels dans un effluent que l'on cherche à traiter pour un rejet dans l'environnement. La conductivité de l'effluent à

l'anode est donc un paramètre contraint (entre 1 et 10 mS/cm), avec lequel il faut composer. Pour notre étude, seule la conductivité du catholyte est un paramètre modifiable.

Dans une revue récente Escapa et al. (2016) dressent l'état de l'art de l'électrolyse microbienne, en commençant par donner les différentes configurations de CEM avec leurs avantages et inconvénients.

### **2.3 Electrolyseurs microbiens : simple ou double compartiments ?**

Les premières études sur l'électrolyse microbienne se sont intéressées à l'utilisation de membranes ioniques pour séparer les compartiments anodique et cathodique (Rozendal et al., 2006a; Sleutels et al., 2009a). L'intérêt majeur de la configuration double-compartiments est de permettre d'optimiser les conditions opératoires à la cathode (pH, conductivité) sans affecter les communautés microbiennes de l'anode. De plus, il est ainsi possible d'obtenir un gaz composé à 100% d'hydrogène en minimisant sa ré-oxydation à l'anode. En revanche, séparer l'anode de la cathode avec une membrane induit une résistance supplémentaire au passage des charges en solution, une chute ohmique en termes électrochimiques, qui nuit aux performances du système.

Il est aussi possible de produire de l'hydrogène avec un électrolyseur microbien sans membrane (Call and Logan, 2008). L'avantage de cette configuration est principalement la réduction de la résistance interne, minimisant l'énergie à fournir pour produire l'hydrogène. Cependant, l'hydrogène produit à la cathode peut être ré-oxydé à l'anode, ce qui aboutit à un phénomène de recyclage qui augmente artificiellement la densité de courant et réduit l'efficacité énergétique du système (Lee and Rittmann, 2010). Par ailleurs, l'hydrogène produit peut être re-consommé et converti en méthane en cas de prolifération de bactéries méthanogènes. Pour les exemples où l'objectif premier est la production d'un gaz riche en hydrogène, la conversion de l'hydrogène en méthane constitue la faiblesse majeure des CEM sans membrane (Call and Logan, 2008; René A Rozendal et al., 2008; Tartakovsky et al., 2008). Cependant, notons également que l'objectif affiché de certains électrolyseurs sans membrane est la production de méthane. (Clauwaert and Verstraete, 2008) proposent d'utiliser la CEM comme technologie post-traitement en aval d'un digesteur anaérobie pour maximiser la récupération de méthane. Ils précisent que la CEM sans membrane peut admettre de faibles charges organiques en entrée et les convertir en méthane à température ambiante. Le terme d'électrométhanogenèse a été introduit pour décrire les procédés mettant en œuvre une biocathode productrice de méthane (Cheng et al., 2009).

### **2.4 Les différentes configurations de réacteurs**

L'architecture des électrolyseurs microbiens est un paramètre fondamental pour l'optimisation de leurs performances. La plupart des configurations existantes ont été détaillées dans la thèse de Raphaël Rousseau (2013) : Cellules en H, cellules parallélépipédiques de type filtre-pressé pour minimiser la distance entre anode et cathode ou électrolyseurs cylindriques pour pouvoir jouer sur le rapport de surface entre anode et cathode. D'autres types d'électrolyseurs microbiens ont été testés depuis 2013 (Figure 6). Bo et al. (2014) ont proposé un design pour lequel les parois en acier inoxydable d'un digesteur anaérobie servent de cathode pour augmenter la proportion de méthane dans le biogaz en associant l'électrolyse microbienne productrice d'hydrogène à la méthanisation. Un autre design

intéressant est celui de Katuri et al. (2014) qui utilisent des membranes à fibres creuses conductrices et poreuses à base de nickel, qui servent à la fois de cathode et de séparateur pour filtrer l'effluent. Ce réacteur permet de traiter un effluent faiblement chargé en matières organiques tout en produisant du biogaz riche en méthane. La formation d'hydrogène sur la membrane ainsi que le pH local élevé permet de réduire son encrassement. Un autre design consiste en une cellule d'électrolyse microbienne qui met en œuvre une anode fluidisée composée de granules de charbons actifs (Liu et al., 2014). Cette configuration permet d'augmenter la surface active de l'anode et de limiter son encrassement.

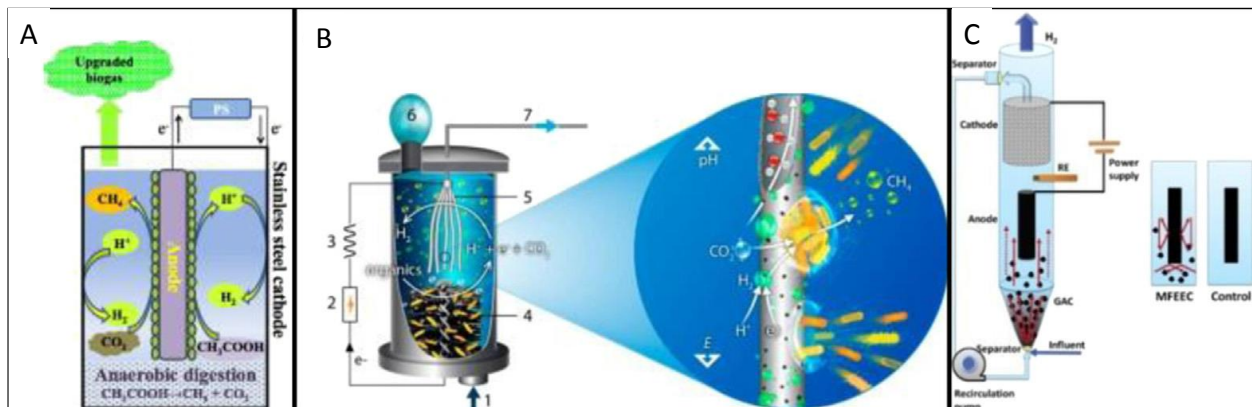


Figure 6 : Configurations récentes de cellules d'électrolyse microbienne : (A) Les parois d'un digesteur anaérobie servent de cathode, (B) La cathode est une membrane à fibre creuse à base de nickel qui permet aussi de filtrer l'effluent, (C) Cellule d'électrolyse microbienne avec une anode en granules de charbons actifs fluidisés. D'après (Escapa et al., 2016).

## 2.5 Les études en CEM à différentes échelles

La très grande majorité des études sur les CEMs utilise comme effluent anodique une solution synthétique alimentée en acétate (Kadier et al., 2014). Cette approche permet le développement de nouvelles électrodes, la comparaison de différentes configurations et l'évaluation de l'influence de différents facteurs, tout en maîtrisant la composition du substrat. Plus récemment, les études utilisant des eaux usées réelles à l'anode des CEMs se multiplient. Dans leur revue, Escapa et al. (2016) font une liste exhaustive des différents travaux utilisant des eaux usées domestiques et industrielles pour alimenter les bioanodes des CEMs.

Le volume anodique va de 5 mL pour des mini-CEMs à visée de screening de différentes eaux usées, notamment les eaux usées de l'industrie pétrolière (Ren et al., 2013), jusqu'à 1000 L pour un pilote traitant des effluents viticoles avec une DCO de 0.7-2.0 g/L (Cusick et al., 2011). Pour ce pilote, les performances sont de  $0.28 L_{H_2} / L_{réacteur} / jour$ , avec un abattement de la DCO de 50 à 70%. Des ajouts d'acétate sont nécessaires lorsque la concentration en acides gras volatils (AGVs) de l'effluent est faible. De plus, la température a dû être augmentée : elle est un facteur important pour améliorer les densités de courant ainsi que la composition du gaz produit. Il faut souligner à nouveau que pour la production d'un gaz composé essentiellement d'hydrogène, la configuration à double compartiments est requise (Lu et al., 2012)

Les performances maximales en termes de production d'hydrogène ont été obtenues avec une CEM sans séparateur (compartiment unique) de 28 mL qui a produit  $1.7 L_{H_2} / L_{réacteur} / jour$  (W. Liu et al., 2012).

L'effluent utilisé est un lixiviat de boues activées fermentées, riche en AGVs et la cellule est alimentée en batch successifs avec un temps de séjour de 24-48h.

Globalement, et surtout pour des échelles de réacteur supérieures au litre, les performances des CEMs alimentées avec des eaux usées réelles sont très faibles comparées à celles obtenues avec des CEMs optimisées alimentées en acétate. Par exemple, pour une CEM de 120 L alimentée avec des eaux usées domestiques (Heidrich et al., 2012), une différence de potentiel de 1.1 V a dû être appliquée pour obtenir une production d'hydrogène mesurable ( $0.015 \text{ L}_{\text{H}_2} / \text{L}_{\text{réacteur}} / \text{jour}$ ) tandis qu'une production de  $3.0 \text{ L}_{\text{H}_2} / \text{L}_{\text{réacteur}} / \text{jour}$  a été reportée dans la thèse de Raphaël Rousseau (2013) pour son prototype de 5L alimenté en acétate dans un électrolyte très salin ou une valeur de  $2.0 \text{ L}_{\text{H}_2} / \text{L}_{\text{réacteur}} / \text{jour}$  reportée dans les travaux de Pant et al. (2011).

### 3 La cathode, siège de l'électrosynthèse microbienne

#### 3.1 Généralités sur l'électrosynthèse microbienne

Contrairement aux nombreuses études rapportant la possibilité pour un microorganisme d'utiliser une électrode comme accepteur d'électrons (anode), les études portant sur le transfert d'électrons en sens opposé, i.e. d'une cathode vers un microorganisme sont beaucoup moins nombreuses. La première publication, qui apparaît en 2004 (Gregory et al., 2004), décrit la capacité de *Geobacter metallireducens* de réduire le nitrate en nitrite avec l'électrode comme seule donneur d'électrons et avec la stœchiométrie attendue. De plus, la même publication montre la réduction du fumarate en succinate par *Geobacter sulfurreducens* qui utilise les électrons issus d'une cathode.

Le premier dispositif dit d'électrosynthèse microbienne a été proposé et publié par Nevin et al. (2010). L'étude démontre le concept de la catalyse de la réduction de  $\text{CO}_2$  en acides organiques par l'espèce microbienne *Sporomusa ovata*, en utilisant la cathode comme donneur d'électrons. L'espèce est d'abord cultivée en utilisant l'hydrogène comme donneur d'électrons puis une cathode en graphite, polarisée à -0.4 V/ESH, sert de seul donneur d'électrons. La seule source de carbone fournie est du  $\text{CO}_2$ . Un biofilm fin de *S. ovata* se développe à la cathode et une production d'acétate et de 2-oxobutyrate couplée à la consommation de courant électrique est constatée, avec un rendement faradique de 86 % en moyenne. La plupart des électrons fournis par la cathode est donc utilisée pour la production d'acétate et d'oxobutyrate et non pour la croissance microbienne. Les microorganismes capables d'accepter directement les électrons provenant d'une cathode sont appelés électrotrophes (Lovley, 2011a, 2008), en accord avec la dénomination standard de chimiotrophes, qui utilisent une oxydation chimique comme source d'énergie (organotrophes ou lithotrophes en fonction de la nature organique ou inorganique du composé chimique oxydé) ou phototrophes, qui utilisent une source d'énergie lumineuse. Dans le dispositif bioélectrochimique, *S. ovata*, microorganisme acétogène, emploie un métabolisme électro-autotrophe car le donneur d'électrons est la cathode polarisée et la source de carbone est le  $\text{CO}_2$ .

Diverses espèces microbiennes acétogènes ont été testées pour leur capacité d'électro-autotrophie et les études ont montré que l'efficacité des conversions dépend des espèces utilisées (Nevin et al., 2011). En dehors des souches pures mises en œuvre, certains chercheurs utilisent des cultures mixtes de

différentes origines, comme par exemple des microorganismes issus d'eaux usées de brasserie (Marshall et al., 2012), de boues activées (Jiang et al., 2013; Su et al., 2013), ou des cultures acclimatées enrichies en microorganismes homoacétogènes (Marshall et al., 2013; Mohanakrishna et al., 2015).

## **3.2 Intérêts et challenges du procédé d'électrosynthèse microbienne**

### **3.2.1 Intérêts**

L'équipe de D. Lovley, à l'origine du concept d'électrosynthèse microbienne, l'a défendu de façon très efficace en introduisant la notion de photosynthèse artificielle. En supposant que la cellule d'électrosynthèse est alimentée en courant électrique produit par des panneaux photovoltaïques, le bilan global du procédé se résume à la consommation de CO<sub>2</sub> et d'énergie solaire pour produire des molécules d'intérêt. (Nevin et al., 2010). La similarité va même jusqu'à la création concomitante d'oxygène lorsque l'oxydation de l'eau a lieu à l'anode. Cette photosynthèse artificielle présente de nombreux avantages par rapport à la photosynthèse classique qui permet de produire des composés organiques sous forme de biomasse végétale. En effet, la capture de l'énergie solaire par des systèmes photovoltaïques présente une efficacité élevée, comprise entre 10 et 25 % (Grätzel, 2001), contre moins de 5% pour les systèmes photosynthétiques biologiques (Zhu et al., 2008). De plus, le couplage photovoltaïque /électrosynthèse microbienne n'occupe pas de vastes terrains arables et n'implique pas l'utilisation de pesticides (Rabaey et al., 2011). Enfin, les composés générés par les microorganismes électrotrophes sont directement disponibles et ne requièrent que peu de procédés de purification et d'extraction, contrairement aux composés synthétisés au sein de la biomasse végétale.

Un avantage supplémentaire de cette nouvelle voie de biosynthèse microbienne est qu'elle pourrait évoluer vers la production de composés beaucoup plus complexes grâce à l'utilisation de l'ingénierie génétique. En effet, l'analyse des produits générés par les bactéries suggère que les voies métaboliques exploitées font intervenir un intermédiaire biologique essentiel, l'acétyl coenzyme A. Le recours à l'ingénierie génétique permettrait de créer des voies de production de composés très diverses à partir de cet intermédiaire (Lovley, 2011a).

Par ailleurs, le système d'électrosynthèse microbienne peut également présenter un grand intérêt pour l'élongation de chaîne à partir d'une molécule organique. La formation de succinate à partir de glycérol ou l'élongation de chaîne à partir d'acides gras volatils sont des réactions envisagées à la cathode (Spirito et al., 2014).

Quelques études ont aussi mis en évidence que la présence d'une cathode dans un fermenteur peut orienter les voies métaboliques de fermentations bactériennes. Xafenias et al. (2015) améliorent d'un facteur 6 la production de 1-3 propanediol à partir de glycérol en utilisant l'électro-fermentation, comparée à une fermentation classique. Notons qu'il semble qu'il ne s'agisse pas dans ce cas d'un processus faradique, c'est-à-dire que les composés synthétisés ne sont pas les accepteurs finaux du flux d'électrons issus de la cathode, mais la présence de la cathode impacte les voies métaboliques de façon indirecte. Les mécanismes sont encore mal connus. Ces processus dits d'électro-fermentation ne relèvent pas des processus d'électrosynthèse microbienne traités dans ce mémoire.



### 3.2.2 Challenges

Un inconvénient principal des systèmes d'électrosynthèse microbienne est lié au métabolisme des microorganismes associés à la cathode pour la réduction du CO<sub>2</sub>. Ces microorganismes sont autotrophes et, comme les réactions de synthèse des composés intracellulaires à partir de CO<sub>2</sub> sont lentes et consommatrices d'énergie, leur croissance est lente. Or le système requiert la présence en grande quantité de bactéries à la cathode pour la formation d'un biofilm et la synthèse de molécules en quantité non négligeable. Une approche envisageable pour pallier le problème serait de concilier croissance hétérotrophe et production autotrophe (Rabaey et al., 2011), avec une phase de fonctionnement hétérotrophe afin d'assurer une multiplication rapide des microorganismes sur la cathode puis un fonctionnement autotrophe avec une production de composés à forte valeur ajoutée à partir de CO<sub>2</sub>. Pour cela, il faudrait donc des microorganismes au métabolisme flexible, par exemple des microorganismes autotrophes facultatifs (Zaybak et al., 2013) ou bien des organismes modifiés génétiquement.

### 3.3 Les molécules produites grâce à l'électrosynthèse microbienne à partir de CO<sub>2</sub>

Parmi les molécules organiques produites par électrosynthèse microbienne, l'acétate est la plus fréquemment rapportée (Tableau 3). En culture axénique, *S. ovata* est l'espèce la plus performante rapportée jusqu'à présent avec une production de 600 mg/L d'acétate après 9 jours sur une cathode polarisée à -0.4 V/ESH (T. Zhang et al., 2013). Les cultures mixtes permettent d'atteindre de meilleures performances, mais la comparaison est difficile étant donné la grande diversité de systèmes et de conditions mis en œuvre, ainsi que les différents potentiels appliqués. La production maximale d'acétate a été obtenue par Marshall et al. (2013), qui utilisent une cathode composée de granules de graphite polarisée à -0.59 V/ESH et un inoculum issu d'une précédente biocathode enrichie en bactéries acétogènes. Leurs cinétiques de production d'acétate ont atteint 17 mM/jour avec une accumulation jusqu'à 10.5 g/L en 20 jours. De l'hydrogène a également été produit à la cathode à une vitesse maximale de 100 mM/jour. Dans l'étude de LaBelle et al. (2014), l'utilisation de granules de graphite avec un inoculum déjà sélectionné à la cathode et acclimaté à un pH acide a permis d'atteindre une cinétique record de production d'acétate de 52 mM/jour pendant 3 jours, jusqu'à une concentration de 8.8 g/L d'acétate. Le milieu utilisé était une solution tampon phosphate, avec l'ajout d'un inhibiteur de méthanogène (Bromoéthanesulfonate - BES). La cathode polarisée à -0.8 V/ESH assurait alors avec une production d'hydrogène importante jusqu'à 1300 mM/jour.

**Tableau 3 : Liste des biocathodes de réduction de CO<sub>2</sub> dans la bibliographie et performances associées : vitesse de production maximale en mM/jour et concentrations maximales en mg/L.**

Matériau de la cathode	Polarisation (V/ ESH)	Biocatalyseur	Produit principal	Vitesse de production max (mM/jour)	Concentration max (mg/L)	Autres produits formés	références
Graphite	-0.4	<i>Sporomusa ovata</i>	Acétate	0.8	300	Oxo-butyrates	(Nevin et al. 2010)
Graphite	-0.4	<i>Clostridium Ljungdahlii</i>	Acétate	0.08	33	Oxo-butyrates formate	(Nevin et al. 2011)
Graphite	-0.4	<i>Sporomusa sphaeroides</i>	Acétate	0.04	16	Oxo-butyrates	(Nevin et al. 2011)
Tissu de carbone + chitosan	-0.4	<i>Sporomusa ovata</i>	Acétate	1.07	600	-	(Zhang et al. 2013)
Granules de graphite	-0.59	Rejets de brasserie	Acétate	4	1710	CH <sub>4</sub> , H <sub>2</sub>	(Marshall et al. 2012)
Granules de graphite	-0.59	Culture enrichie d'un précédent BES	Acétate	17.25	10500	H <sub>2</sub>	(Marshall et al. 2013)
Acier inoxydable	-0.29	<i>Geobacter sulfurreducens</i>	Glycérol	0.67	800	succinate	(Soussan et al. 2013)
Feutre de carbone	-0.7	Boues activées	Acétate	0.38	114	CH <sub>4</sub> , H <sub>2</sub>	(Su, Jiang, and Li 2013)
	-0.9			2.35	n.a		
Feutre de carbone	-0.75	Boues activées	Acétate	0	0	CH <sub>4</sub> , H <sub>2</sub>	(Jiang et al. 2013)
	-0.95			1.6	96		
Graphite + nanostructures en nickel	-0.4	<i>Sporomusa ovata</i>	Acétate	1.12	540	-	(Nie et al. 2013)
Plaquette de graphite (anode +0.5 V)	Potentiel non fixé Cathode=électrode auxiliaire	<i>Sporomusa ovata</i>	Acétate	0.92	180	-	(Gong et al. 2013)
Tissu de carbone	-0.8	<i>Clostridium</i> sp.	Acétate	2.05	1200	Ethanol	(Ganigué et al. 2015)
			Butyrate	0.37	330	Butanol	
Granules de graphite	-0.6	Culture enrichie issue d'effluents de brasserie	Acétate	15	5220	Formiate	(LaBelle et al. 2014)
	-0.8		Hydrogène	1000		Butyrate	
Graphite	-0.4	Culture enrichie en homoacétogènes	Acétate	52	8770	Formiate	
			Hydrogène	1300		Butyrate	
Feutre de graphite sur acier inoxydable	-0.9	Culture mixte	Acétate	1.3	630	H <sub>2</sub> / CH <sub>4</sub>	(Bajracharya et al. 2015)
	-0.7	<i>Clostridium Ljungdahlii</i>	Acétate	0.94	559	Ethanol / H <sub>2</sub>	

### 3.4 Mécanismes biologiques de fixation du CO<sub>2</sub>

Les mécanismes liés à la catalyse de la réduction du CO<sub>2</sub> en acides gras volatils via les biocathodes ne sont pas élucidés et demanderaient que des analyses génomiques soient conduites. Il est possible que les voies métaboliques fassent intervenir les cycles connus de production de composés organiques à partir de CO<sub>2</sub>.

Chez les plantes et les cyanobactéries, la fixation du CO<sub>2</sub> sous forme de composés organiques en utilisant l'énergie solaire se fait par le cycle réducteur des pentoses phosphate (RPP ou Calvin-Benson) qui permet de former un groupement carboxyle à partir de CO<sub>2</sub> et d'un accepteur et de régénérer cet accepteur. L'incorporation du CO<sub>2</sub> est la première étape du cycle RPP. Elle est catalysée par la ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase-oxygénase (RuBisCO). Le cycle de Calvin-Benson est également utilisé chez la bactérie autotrophe facultative *Ralstonia eutropha* (Grunwald et al., 2015).

Chez les bactéries autotrophes et les Archaea, il existe au moins trois autres voies de fixation du carbone, qui diffèrent dans leurs composés réduits, leur source d'énergie ou la sensibilité des enzymes à l'oxygène :

- Le cycle de Krebs inverse, qui est une voie métabolique chez certaines bactéries microaérophiles ou anaérobies, telles que les bactéries vertes sulfureuses. Quatre molécules de CO<sub>2</sub> sont fixées par des enzymes sensibles à l'oxygène et une molécule d'oxaloacétate est produite, elle-même intermédiaire dans le cycle.
- La voie de Wood-Ljungdahl, (ou voie réductrice de l'acétyl-CoA), identifiée chez les bactéries anaérobies strictes comme les acétogènes et les Archaea. Elle consiste à réduire le CO<sub>2</sub> en monoxyde de carbone CO qui est ensuite converti en acétyl-CoA sous l'action successive de deux enzymes sensibles à l'oxydation, la CO déshydrogénase pour la première étape et l'acétyl-CoA synthase pour la seconde étape. Cette voie est décrite plus en détails dans la section 4.1 suivante : « Les microorganismes acétogènes ».
- Le cycle du 3-hydroxypropionate, voie observée chez les bactéries vertes non sulfureuses du genre *Chloroflexus*. Trois molécules de bicarbonate sont converties en une molécule de pyruvate au cours d'un cycle complet. Par ailleurs, des intermédiaires, tels que l'acétyl-CoA, et le succinyl-CoA sont générés. Aucune des enzymes impliquées dans ce cycle n'est sensible à l'oxygène.

Il existe deux variantes du cycle du 3-hydroxypropionate : le cycle du 3-hydroxypropionate/4-hydroxybutyrate (trouvé chez une Archaea extrêmophile *Metallosphaera sedula*) et la voie du dicarboxylate/4-hydroxybutyrate, découverte chez *Ignicoccus hospitalis*, Archaea hyperthermophile.

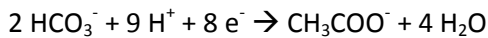
Les bactéries électrotrophes identifiées jusqu'à présent: *Sporomusa ovata*, *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium aceticum*, et *Moorella thermoacetica* (Nevin et al., 2011) sont des bactéries anaérobies acétogènes capables de fixer le CO<sub>2</sub> grâce à la voie de Wood-Ljungdahl avec l'hydrogène comme donneur d'électrons. *Acetobacter woodii* peut également fixer le CO<sub>2</sub> grâce à la voie de Wood-Ljungdahl avec l'hydrogène comme donneur d'électrons mais il a été montré qu'il n'était pas électrotrophe. A la différence des bactéries acétogènes électrotrophes identifiées qui possèdent des ATPases proton-dépendantes, *A. woodii* possède des ATPases sodium-dépendante. Il est suggéré que cette différence pourrait être à l'origine de son incapacité à utiliser les électrons de la cathode. En effet, si la conservation d'énergie chez la bactérie électrotrophe se fait grâce à la génération d'un gradient de protons lié à la réduction du CO<sub>2</sub> en acides organiques, *A. woodii* ne pourrait pas tirer profit de ce gradient de protons avec ses ATPases sodium-dépendantes.

Ceci n'est que supposition car le mécanisme de transfert d'électrons entre cathode et microorganismes reste à élucider.

### 3.5 Considérations thermodynamiques

#### 3.5.1 Calcul du potentiel apparent pour la réduction du CO<sub>2</sub> en acétate

La réduction électrochimique des ions carbonate en acétate :



est thermodynamiquement possible pour des potentiels inférieurs au potentiel standard apparent ( $E^{0'}_{\text{CO}_2/\text{acetate}}$ ):

$$E^{0'}_{\text{CO}_2/\text{acetate}} = E^0_{\text{CO}_2/\text{acetate}} - \frac{RT}{nF} \ln \frac{(\text{CH}_3\text{COO}^-)}{(\text{HCO}_3^-)^2 (\text{H}^+)^9}$$

Avec  $E^0_{\text{CO}_2/\text{acetate}}$  : le potentiel redox standard du couple CO<sub>2</sub>/acétate (0.187 V/ESH (Logan et al., 2006)) ;  $R$  : la constante des gaz parfaits (8.314 J mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>) ;  $T$  : la température (303 K) ;  $n = 8$  : le nombre d'électrons échangés ;  $F$  : la constante de Faraday (96 485 C mol<sup>-1</sup>) ; () : les activités, très proches des concentrations (mol.L<sup>-1</sup>) en solutions diluées.

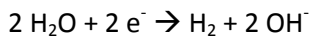
En considérant l'égalité des activités et des concentrations, pour les concentrations [HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>] = 1 mM et [CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>] = 5mM, le potentiel redox du couple CO<sub>2</sub>/ acétate est :

$$E^{0'}_{\text{CO}_2/\text{acetate}} = 0.143 - 0.067 \text{ pH} - 0.0075 \log ([\text{CH}_3\text{COO}^-])$$

A pH neutre (7.0), et pour une production d'acétate de 5mM, la valeur du potentiel  $E^{0'}_{\text{CO}_2/\text{acetate}}$  est égale à -0.31 V/ESH.

#### 3.5.2 Calcul du potentiel apparent pour la réduction de l'eau en hydrogène

La production d'hydrogène à pH neutre via la réaction :



a pour potentiel standard apparent :

$$E^{0'}_{\text{H}_2\text{O}/\text{H}_2} = E^0_{\text{H}_2\text{O}/\text{H}_2} - 2.3 \frac{RT}{2F} \{2 (\text{pH}-14) + \log p_{\text{H}_2}\}$$

avec  $E^0_{\text{H}_2\text{O}/\text{H}_2} = -0.828$  V/ESH et  $p_{\text{H}_2}$  : la pression partielle en hydrogène.

Si l'on considère que la production d'hydrogène s'effectue sous une pression partielle de 1 atm :

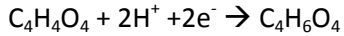
$$E^{0'}_{\text{H}_2\text{O}/\text{H}_2} = 0.014 - 0.060 \text{ pH}$$

Pour un pH de 7, l'hydrogène peut évoluer à partir d'un potentiel de -0.41 V/ESH.

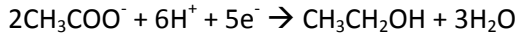
### 3.5.3 Les potentiels redox des autres réactions cathodiques

Sur la Figure 7 sont représentés les potentiels redox apparents par rapport à ESH des couples mis en jeu dans les réactions de réduction du CO<sub>2</sub> en acétate, réduction de l'eau en hydrogène ainsi que les autres réactions considérées à la cathode et écrites ci dessous, pour un pH égal à 7 :

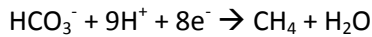
Réduction du fumarate en succinate :



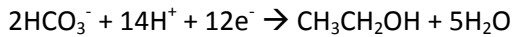
Réduction de l'acétate en éthanol :



Réduction des ions carbonates en méthane :



Réduction des ions carbonates en éthanol :



Réduction des ions carbonates en formiate :

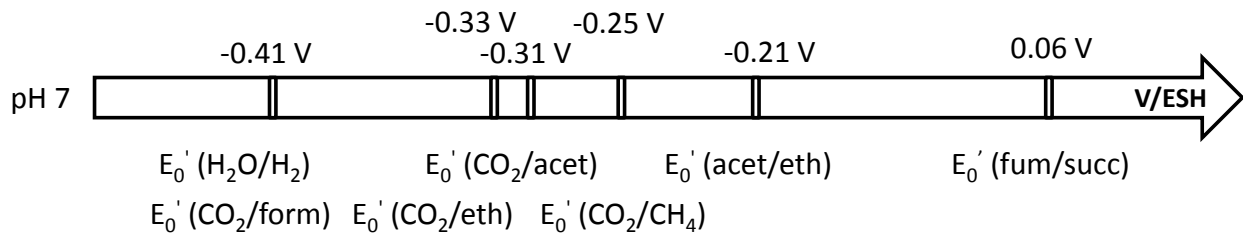
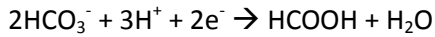


Figure 7 : Potentiels redox apparents des couples mis en jeu dans les réactions cathodiques en considérant un pH neutre (7.0) : fum = fumarate ; succ = succinate ; acet = acétate ; eth = éthanol ; form = formiate.

A un potentiel de -0.35 V/ESH, les réactions de réduction du CO<sub>2</sub> en acétate, éthanol ou méthane sont thermodynamiquement possibles. En revanche, aucune évolution de l'hydrogène ne peut être observée à ce potentiel. Le pH est un paramètre important qui influe sur la valeur du potentiel. Par exemple, pour un pH qui augmente à 8, le potentiel redox apparent du couple CO<sub>2</sub>/acétate devient  $E_0'_{\text{CO}_2/\text{acetate}} = -0.37$  V/ESH, soit une augmentation de 60 mV et les réactions de réduction qui étaient possibles à -0.35 V/ESH ne le sont plus. Toutefois comme le potentiel de réduction de l'eau est également abaissé de 60 mV, le raisonnement qui suit reste valable.

Le potentiel de réduction du CO<sub>2</sub> en acétate (-0,31 V/SHE) est proche de celui de la réduction de l'eau en hydrogène (-0,41 V/ESH). C'est pourquoi, dans de nombreuses études pour lesquelles le potentiel de la cathode est inférieur à -0.41 V/ESH (Bajracharya et al., 2015; Jiang et al., 2013; LaBelle et al., 2014; Marshall et al., 2013; Su et al., 2013), la production d'acétate est accompagnée de la production d'hydrogène (Tableau 3). Dans ces conditions, il n'est pas possible de savoir si la catalyse de la réduction

du CO<sub>2</sub> en acides gras volatils via les biocathodes est un mécanisme impliquant un transfert direct des électrons de la cathode vers les cellules bactériennes ou si le transfert d'électrons est médié via l'hydrogène. En effet, l'hydrogène est un donneur d'électrons connu pour de nombreuses bactéries lithotrophes. Cette interrogation fait l'objet de recherches fondamentales, notamment dans le domaine de la biocorrosion (Deutzmann et al., 2015).

### 3.6 Développement du procédé d'électrosynthèse microbienne

A l'heure actuelle, le procédé d'électrosynthèse microbienne n'existe qu'à l'échelle du laboratoire (Gregory et al., 2004; Nevin et al., 2010; Steinbusch et al., 2010) et l'extrapolation du concept vers l'application de la technologie à plus grande échelle nécessite encore un important travail de recherche (Angenent and Rosenbaum, 2013). De nombreuses limitations doivent être surmontées avant d'envisager son développement.

Peu de connaissances sont disponibles sur l'influence des propriétés de surface de la cathode sur la colonisation par un biofilm. Beaucoup d'efforts s'orientent vers la comparaison de différentes cathodes à base de carbone (tissu, feutre, graphite, carbone vitreux réticulé) et le développement d'électrodes plus efficaces et moins chères (Krieg et al., 2014). Les matériaux à base de graphite et les nanotubes de carbone sont les électrodes les plus couramment employées (Desloover et al., 2012). Des recherches se tournent aussi vers l'utilisation du graphène (Xie et al., 2012; Yong et al., 2014). Jusqu'à présent, le matériau de cathode le plus efficace pour le transfert direct d'électrons de la cathode vers la bactérie est l'acier inoxydable, qui a permis d'obtenir une densité de courant jusqu'à -30 A/m<sup>2</sup> avec le microorganisme *G. sulfurreducens* (Soussan et al., 2013).

L'évolution du pH au sein des systèmes électro-microbiens constitue une limitation importante. En effet, la concentration des protons étant très faible (autour de 10<sup>-7</sup> M), les charges sont alors transportées en solution par d'autres ions en concentrations plus importantes (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, phosphates, sulfates,...). En l'absence de fortes concentrations de composés à effet tampon, l'équilibre du pH n'est pas assuré et le compartiment anodique s'acidifie tandis que le compartiment cathodique s'alcalinise (Blanchet et al., 2014). Localement au niveau du biofilm cathodique, le pH élevé gêne la création de forces proton-motrices et diminue peu à peu l'activité métabolique du biofilm (Krulwich, 1995). Jusqu'à présent, pour éviter ce phénomène, des solutions avec un fort pouvoir tampon sont employées comme électrolyte, ce qui n'est pas une approche satisfaisante d'un point de vue environnemental et économique. Une alternative est la régulation du pH au sein des compartiments.

D'un point de vue économique, un facteur important est le rendement faradique qui représente la proportion d'électrons consommés pour former les produits voulus. Les réactions parasites de productions non désirées, comme la production de méthane ou d'hydrogène, doivent être évitées. Les paramètres opératoires comme le pH ou le temps de rétention peuvent permettre de minimiser les réactions parasites. L'ajout d'inhibiteurs, notamment le sodium 2-bromoethanesulfonate (BES), est également largement répandu dans les études publiées (Jiang et al., 2013; Marshall et al., 2012; Su et al., 2013).

### 3.7 Développement du procédé Biorare

Le procédé d'électrosynthèse microbienne nécessite un apport en énergie électrique. L'originalité du procédé Biorare est de combiner l'électrosynthèse microbienne avec l'oxydation de déchets organiques à l'anode pour minimiser l'énergie électrique à fournir au procédé. Ainsi, le procédé permet à la fois le traitement d'effluents et la valorisation du CO<sub>2</sub> en molécules plateformes.

L'architecture du procédé doit être conçue pour traiter l'effluent à l'anode et d'autre part atteindre la concentration requise en molécules d'intérêt à la cathode. Le titre massique obtenu est un résultat particulièrement important car il conditionne le coût du procédé d'extraction et de purification (downstream). Généralement, les microorganismes sont inhibés par une trop grande concentration de produits excrétés (Desloover et al., 2012), ce qui confère encore plus d'importance à la technologie de séparation et de récupération de la molécule en aval du procédé. Le procédé downstream n'a toutefois pas fait partie des axes de recherche de cette thèse.

Dans ce travail de thèse, deux configurations ont été étudiées pour le procédé Biorare. La première configuration est telle que décrite initialement dans l'appel à projets, avec deux compartiments biotiques séparés par une membrane échangeuse d'ions (Figure 1). Les résultats obtenus avec cette configuration sont décrits au chapitre 5 et ont conduit à proposer une seconde configuration.

Il a été décidé d'utiliser le transfert indirect d'électrons médié par l'hydrogène pour envisager une voie originale de développement du procédé. Le procédé Biorare est alors découplé en un système hybride (selon la définition de Schröder et al. (2015)) : l'hydrogène est produit dans une cellule d'électrolyse microbienne qui oxyde les biodéchets et, en aval, un bioréacteur gaz-liquide utilise l'hydrogène pour convertir le CO<sub>2</sub> en molécules organiques grâce à des microorganismes autotrophes (Figure 2).

Les organismes autotrophes utilisant l'hydrogène comme donneurs d'électrons sont dits lithoautotrophes et sont principalement des bactéries homoacétogènes ou des Archaea méthanogènes hydrogénotrophes. Les méthanogènes produisent du méthane, produit non désiré pour le procédé Biorare. Pour la synthèse de molécules à partir de CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub> au sein du procédé Biorare, ce sont donc les microorganismes homoacétogènes qui vont nous intéresser.

## 4 Synthèse de molécules organiques à partir de dioxyde de carbone et d'hydrogène.

" Amongst heterotrophs it is as anaerobes that bacteria specially excel.... It is in the use of hydrogen acceptors that bacteria are specially developed as compared with animals and plants." (Stephenson, 1947).

### 4.1 Les microorganismes homoacétogènes

La première description du processus d'homoacétogénèse a été reportée en 1932 par Fischer et al. (1932). Cette découverte fut suivie par l'isolement de la souche *Clostridium acetium* par le microbiologiste allemand Wieringa (Wieringa, 1936). Cette espèce est capable de croître grâce au seul apport de dioxyde de carbone et d'hydrogène. Malheureusement, la souche fut perdue peu de temps après son isolement et les recherches conduites sur les homoacétogènes se résumèrent à l'étude de Karlsson et al. (1948) qui définit le milieu nutritionnel de *C. acetium*. Toutes les tentatives pour ré-isoler cette souche échouèrent jusqu'en 1980 (Adamse, 1980; Braun et al., 1981; Gottschalk and Braun, 1981).

En 1942, une deuxième espèce homoacétogène *Clostridium thermoaceticum* fut isolée par Fontaine et al. (1942). Cette bactérie, reclassifié *Moorella thermoacetica* (Collins et al., 1994), fut le microorganisme d'étude avec lequel Harland G. Wood et Lars G. Ljungdahl élucidèrent la voie de l'acétyl-CoA. Cependant, ce microorganisme a été isolé en condition hétérotrophe et ce n'est qu'en 1990 que sa capacité de croissance autotrophe avec CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub> a été démontrée (Daniel et al., 1990). De la même manière, la troisième espèce homoacétogène publiée (Andresen et al., 1970), *Clostridium formicoaceticum*, a été isolée en condition hétérotrophe (sur fructose).

Le premier microorganisme homoacétogène autotrophe étudié en détail fut alors *Acetobacterium woodii*, qui peut croître avec CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub> ainsi que sur fructose et quelques autres substrats organiques (Balch et al., 1977).

Le nombre d'espèces acétogènes connues s'est considérablement accru ces vingt dernières années, et actuellement une centaine d'espèces ont été isolées d'environnements très divers (Drake et al., 2008). Ces bactéries peuvent être rencontrées dans la plupart des environnements anaérobies, incluant les environnements extrêmes comme *Acetobacterium psammolithicum* par exemple (Krumholz et al., 1999) et, si la majorité des isolats actuels sont mésophiles, certaines espèces sont thermophiles ou psychrotolérantes.

Le séquençage du génome d'un nombre croissant d'homoacétogènes permet de mieux comprendre leurs voies métaboliques. Les séquences génomiques de *Moorella thermoacetica* (Pierce et al., 2008), *Clostridium ljungdahlii* (Köpke et al., 2010), *Clostridium carboxidivorans* (Paul et al., 2010) et *Eubacterium limosum* (Roh et al., 2011) sont publiées. Les espèces homoacétogènes les mieux caractérisées appartiennent aux genres *Acetobacterium* et *Clostridium*.

Les bactéries homoacétogènes sont définies comme étant anaérobies et utilisant la voie de Wood-Ljungdahl ou voie réductrice de l'acétyl-CoA pour (i) la réduction du CO<sub>2</sub> ou CO en fonction acétyl de



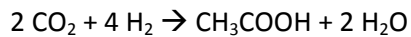
l'acétyl-CoA, (ii) sa balance énergétique et (iii) l'assimilation du CO<sub>2</sub> comme source de carbone pour la croissance.

La voie de Wood-Ljungdahl consiste en deux voies distinctes, dites « branche du méthyle » et « branche du carbonyle » (Figure 8):

- la branche du méthyle, découverte par Lars Ljungdahl, suivant laquelle une molécule de CO<sub>2</sub> est réduite en groupe méthyle –CH<sub>3</sub> (Ljungdahl, 1986);
- la branche du carbonyle, dont l'élucidation doit beaucoup aux travaux de Harland Wood, suivant laquelle une seconde molécule de CO<sub>2</sub> est réduite en CO (Wood, 1991).

Les deux branches de la voie acétyl-CoA, donc le travail conjoint de Wood et Ljungdahl, se regroupent au niveau de la synthèse de l'acétyl-CoA qui est soit converti en acétate, soit assimilé dans la biomasse via les voies anaboliques.

En conditions anaérobies, les homoacétogènes sont capables de croître en utilisant le dioxyde ou monoxyde de carbone comme unique source de carbone en le convertissant majoritairement en acétate.



Certains homoacétogènes comme *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii*, et *Clostridium ragsdalei* peuvent aussi produire de l'éthanol (Mock et al., 2015), d'autres peuvent former des molécules comme le butyrate, le 2.3-butanediol ou le butanol (Schiel-Bengelsdorf and Dürre, 2012).

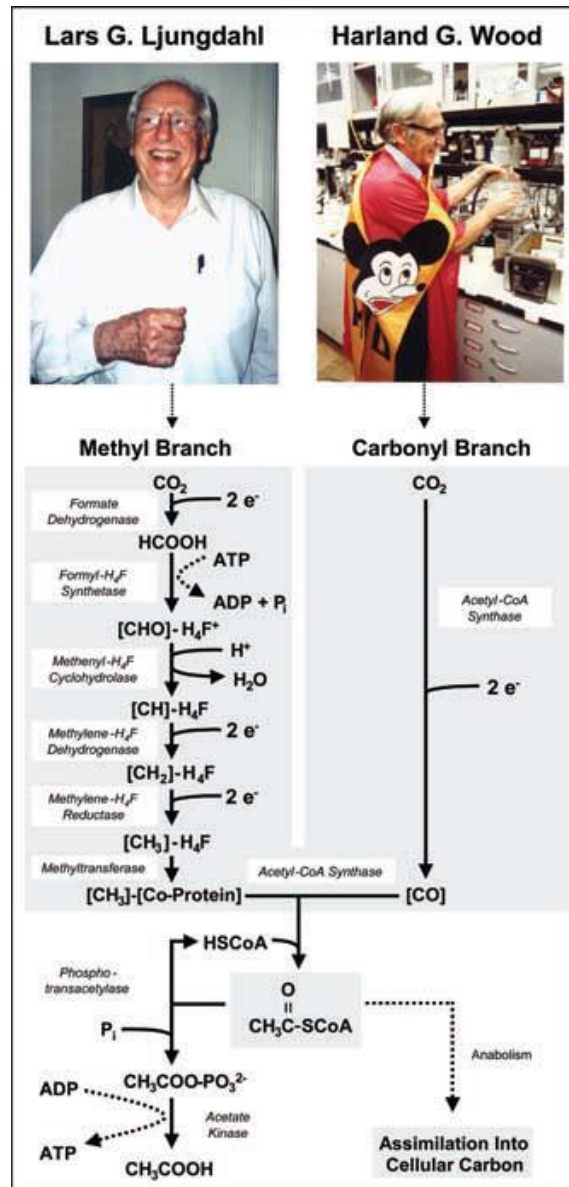


Figure 8 : Voie de l'acétyl-CoA (ou Wood-Ljungdahl). Abréviations:  $\text{H}_4\text{F}$  = tetrahydrofolate;  $\text{HSCoA}$  = coenzyme A;  $\text{P}_i$  = inorganic phosphate;  $e^-$  = electron; Co-Protein = corrinoid enzyme;  $\text{ATP}$  = adenosine 5-triphosphate. Figure provenant de (Drake et al., 2008).

#### 4.2 Utilisation d'acétogènes pour la production de molécules organiques à partir de $\text{CO}_2$

Ces dernières années ont vu croître l'intérêt industriel pour la production autotrophe de molécules organiques pour la chimie et les biocarburants. L'utilisation du mélange gazeux  $\text{CO}_2 + \text{H}_2$  ou  $\text{CO} + \text{H}_2$  comme unique source de carbone et d'énergie pour la production de molécules organiques présente un intérêt écologique et économique. En effet, cette voie peut contribuer à la réduction des émissions de gaz à effets de serre. De plus, si le mélange de gaz servant de substrat est une émission gazeuse rejetée par une industrie ou un gaz de synthèse (syngas), il peut être obtenu à bas coût. Le gaz de synthèse est un mélange de monoxyde de carbone et d'hydrogène obtenu par la gazéification par pyrolyse du charbon,

des déchets et de la biomasse (paille, bois). La fermentation de syngas par des espèces bactériennes acétogènes commence à intéresser l'industrie pour la production de molécules chimiques (Henstra et al., 2007).

La bibliographie décrit un certain nombre d'espèces cultivées et testées pour leur capacité à produire des molécules en solution à partir de carbone inorganique et d'hydrogène. La liste suivante n'est pas exhaustive, elle donne des exemples d'acétogènes utilisés pour la fermentation de gaz avec les concentrations en molécules produites.

- *Acetobacter woodii*

Une culture pure d'*A. woodii* sous atmosphère de  $H_2+CO_2$ , avec une pression partielle  $p_{H_2}$  de 1700 mbar, a permis d'obtenir une concentration finale en acétate de 44.7 g/L (Demler and Weuster-Botz, 2011) et plus de 50 g/L en moins de 4 jours avec une souche recombinante (Straub et al., 2014).

- *Clostridium ljungdahlii*

En optimisant les conditions de culture et en maximisant la densité cellulaire (réacteur continu avec recyclage de la biomasse) Phillips et al. (1993) atteignent une concentration d'éthanol de 48 g/L et de 3g/L en acétate après 23 jours avec une culture de *C. ljungdahlii* alimentée en syngaz obtenu à partir de charbon.

La production biologique d'éthanol avec *C. ljungdahlii* à partir d'effluents gazeux a été protégé par un brevet (Gaddy, 2000) dans lequel sont données les productions suivantes : 6.4 g/L d'acétate et 2.7 g /L d'éthanol avec un substrat gaz composé de  $CO/H_2/CO_2/N_2$  (14 :17 :4 :65) ou encore 21 g/L d'éthanol avec une alimentation  $CO/H_2/CH_4$  (45 :50 :5).

Younesi et al. (2005) ont obtenu une concentration maximale de 600 mg/L d'éthanol avec *C. ljungdahlii* alimenté en syngas. Une souche recombinante de *C. ljungdahlii* a produit jusqu'à 150 mg/L de butanol pendant sa phase de croissance exponentielle (Köpke et al., 2010).

Cette souche, qui peut être transformée avec l'introduction d'un plasmide portant le gène de production du butanol via une procédure d'électroporation, est citée par Köpke et al. (2010) et Leang et al. (2012) comme pouvant devenir le catalyseur « plateforme » pour la production de diverses molécules chimiques et de biocarburants à partir de CO,  $CO_2$  et  $H_2$ .

- *Clostridium aceticum*

*C. aceticum* cultivé en batch sous  $CO/H_2/Ar$  (78 :4 :18) a produit 2.3 g /L d'acétate après 3 jours (Sim et al., 2007).

- *Clostridium autoethanogenum*

Une culture de *C. autoethanogenum* en milieu optimal alimenté avec du carbone inorganique  $CO/CO_2$  (95 :5) a produit 259 mg/L d'éthanol et 1.4 g/L d'acétate en batch de 60 heures à pH 4,7 (Guo et al., 2010).

Très récemment, l'activité spécifique des oxydoréductases ainsi que les cofacteurs impliqués dans les voies énergétiques d'assimilation de H<sub>2</sub> et CO<sub>2</sub> ont été déterminés à partir d'extrait cellulaire de *C. autoethanogenum*. Les voies métaboliques ont été proposées pour élucider la conservation de l'énergie chez cette espèce, capable de produire de l'éthanol à partir de CO<sub>2</sub> (Mock et al., 2015).

Cette souche est mise en œuvre dans le procédé développé par l'entreprise Lanzatech (voir ci-après).

- *Butyribacterium methylotrophicum*

Worden et al. (1989) ont démontré que *B. methylotrophicum* pouvait produire du butyrate, jusqu'à 6 g/L, comme produit majoritaire à partir de monoxyde de carbone.

- *Sporomusa ovata*

*S. ovata* est connue pour ses propriétés typiques d'acétogènes produisant de l'acétate à partir de CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>. Jusqu'à présent, seule une petite production d'éthanol, inférieure à 1 mM, a été reportée avec cette espèce (Möller et al., 1984). Sur son milieu de référence avec bêtaïne, *S. ovata* produit 1.2 g/L d'acétate en 30 heures. Cette souche a été la première décrite comme capable d'électrosynthèse, c'est-à-dire capable de consommer directement les électrons provenant d'une cathode. Elle est donc souvent utilisée en procédé de bioélectrosynthèse (Nevin et al., 2010). Avec une souche de *S. ovata* acclimatée pour une croissance rapide sur méthanol, Tremblay et al. (2015) produisent 900 mg/L d'acétate en 6 jours à partir de CO<sub>2</sub> dans un système d'électrosynthèse avec une cathode polarisée à -0.69 V/ESH.

Les procédés mettant en œuvre des cultures autotrophes acétogènes pour la fermentation de syngas existent presque exclusivement à l'échelle du laboratoire, sauf une étude à l'échelle pilote en fermenteur de 100 L avec la souche *Clostridium P11* (Kundiyana et al., 2010).

En parallèle, trois entreprises ont tout de même déjà commencé le travail à plus grande échelle pour la bioproduction d'éthanol avec des microorganismes acétogènes : IneosBio, Coskata et LanzaTech (Köpke et al., 2011) :

- IneosBio annonce la production de 24 000 tonnes d'éthanol par an provenant de cellulose lorsque leur usine située à Indian River (Floride) fonctionnera à pleine capacité. La combinaison de microorganismes utilisée dans l'étape de fermentation des gaz n'est pas révélée et est propriété de l'entreprise.
- Lanzatech en collaboration avec ArcelorMittal et Primetals Technologies annoncent leur intention de construire la première unité européenne de production de bioéthanol à partir des émissions de gaz engendrées par le procédé de production d'acier. L'objectif annoncé est la production de 47 000 tonnes d'éthanol par an. Le microorganisme utilisé par Lanzatech est *C. autoethanogenum*.
- L'entreprise Coskata commercialise sa technologie de production d'éthanol à partir de déchets. Elle a breveté l'utilisation de nouveaux bioréacteurs à membranes fibre creuses dans lesquelles

est diffusé le gaz, en association avec les microorganismes optimisés et immobilisés, propriété de Coskata (Hickey et al., 2008).

D'autres brevets protègent des procédés biologiques variés avec l'objectif de produire des molécules d'intérêts à partir de CO<sub>2</sub>, d'acides gras volatils (AGV) et d'éthanol :

- la production d'alcools, AGV ou de biopolymères (Polyhydroxybutyrate - PHB) à partir de CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub> grâce à la mise en œuvre par exemple du microorganisme *Cupriavidus necator* (Rozendal and Rabaey, 2010)
- la production d'acétate à partir de CO<sub>2</sub>, d'eau et d'électricité (Lovley and Nevin, 2012) avec des souches telles que *S. ovata* (DSM 2662), *S. sphhaeroides* (DSM 2875), *C. ljungdahlii* (DSM13528), *C. aceticum* (DSM 1496), *M. thermoacetica* (DSM 21394), *A. woodii* (DSM 1030)
- la production de caproate et caprylate à partir d'AGV et d'éthanol grâce à la mise en œuvre de cultures mixtes (Angenent and Agler, 2014)

#### 4.3 Utilisation de cultures mixtes pour la production de molécules organiques à partir de CO<sub>2</sub>

L'utilisation de cultures mixtes permet de minimiser les coûts de mise en œuvre car elle dispense du recours à la stérilisation et confère une meilleure robustesse au procédé en supportant mieux les variations de l'effluent en entrée (Agler et al., 2011; Kleerebezem and van Loosdrecht, 2007).

Récemment et de manière encore isolée, des recherches se sont tournées vers l'utilisation de cultures mixtes pour la production d'acide carboxylique à partir de CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub> (F. Zhang et al., 2013). En omettant les études sur la bioélectrosynthèse (utilisation de la cathode comme donneur d'électrons), cet article est à notre connaissance le seul qui propose l'utilisation d'une culture mixte pour la production d'acétate à partir de CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>. Pour améliorer le transfert gaz-liquide, les auteurs mettent en œuvre un module de membranes à fibres creuses sur lesquelles se développe un biofilm («Hollow-fiber membrane biofilm reactors»). L'hydrogène n'étant pas détecté dans le ciel gazeux du réacteur, il est conclu que son taux d'utilisation est de 100%. Les produits formés sont l'acétate, le butyrate, le caproate et le caprylate. Les concentrations maximales obtenues sont respectivement 7,4 g/L, 1,8 g/L, 0,98 g/L et 0,42 g/L. L'analyse de la population microbienne révèle que les espèces dominantes qui forment le biofilm sont *C. ljungdahlii* et *C. kluyveri*. Elles représentent 57.1% des clones séquencés.

Les autres études réalisées en culture mixte ne concernent pas l'utilisation du dioxyde de carbone en tant que substrat, mais plutôt l'élongation de chaînes à partir d'acétate, d'éthanol ou de glycérol pour produire des molécules à plus haute valeur ajoutée (Agler et al., 2012; Grootcholten et al., 2013; Sharma et al., 2013; Spirito et al., 2014; Van Eerten-Jansen et al., 2013).

*C. kluyveri* est souvent dominant dans les populations microbiennes capables d'utiliser l'acétate (C2) et produisant du caproate (C6) et du caprylate (C8). (Kenealy et al., 1995; Steinbusch et al., 2011, 2010).





# Chapitre 2 : Matériels et méthodes





## 1 Sources de microorganismes

Différentes sources de microorganismes ont été testées à l'anode et à la cathode des systèmes électro-microbiens et dans les contacteurs gaz-liquide.

### 1.1 Compartiment anodique

Durant les travaux sur la formation de bioanodes, les réacteurs sont inoculés soit à partir d'une bioanode déjà colonisée par un biofilm électroactif, ou bien directement, de manière plus classique, avec des boues de différentes provenances :

#### 1.1.1 Boues activées

Les boues activées sont prélevées directement dans le bassin aéré de la station d'épuration de Castanet-Tolosan (31).

#### 1.1.2 Boues biologiques épaissies

Les boues biologiques épaissies par flottation sont prélevées à la station d'épuration d'Evry (91) puis hydrolysées sept jours à 15°C. Ces boues sont fournies par le partenaire Suez-Environnement.

### 1.2 Compartiment cathodique ou contacteurs gaz-liquide

#### 1.2.1 Boues biologiques épaissies

Pour la formation de biocathodes (Chapitre 5) et pour les études réalisées dans les contacteurs gaz-liquide (Chapitre 7), les boues biologiques épaissies fournies par le partenaire Suez-Environnement sont utilisées, après une acclimatation sous une atmosphère H<sub>2</sub> et N<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> (80-20%) pendant 5 jours à 30°C. Cette étape vise à favoriser le développement de bactéries homoacétogènes.

#### 1.2.2 Sédiments de marais salants

Pour certaines expériences, un inoculum de type sédiments de marais salants (Gruissan, Aude) a été utilisé. Cet inoculum contient des bactéries électroactives halotolérantes qui ont déjà permis de former des électrodes microbiennes efficaces dans des électrolytes contenant de fortes concentrations en sels (Rousseau et al., 2014). Lors de l'utilisation de cet inoculum, 45 g/L NaCl sont ajoutés au milieu de culture (définition du milieu en section 2.1.3).

#### 1.2.3 *Geobacter sulfurreducens* et *Sporomusa ovata*

Dans certains essais (Chapitre 5) des précultures de *G. sulfurreducens* servent d'inoculum pour le compartiment cathodique. Des expérimentations en culture pure ont également fait l'objet du stage de François Duquenne (Elève-ingénieur ENSTBB en 2ème année) avec qui j'ai collaboré et qui a travaillé avec la souche *Sporomusa ovata*. Les souches ont été commandées auprès de DSMZ (Braunschweig, Allemagne). Elles nous ont été fournies sous forme liquide pour *G. sulfurreducens* (DSM n°12127) et lyophilisée pour *S. ovata* (DSM n°2662).

## 2 Milieux et substrats

Différents types de milieux synthétiques ou réels ont été utilisés en fonction des expériences réalisées.

### 2.1 Milieux synthétiques

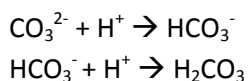
#### 2.1.1 Milieu synthétique (anode) : S1

Pour les travaux réalisés à l'anode, le milieu synthétique utilisé est tirée de l'étude de Liu et al. (2008) :  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (2.69 g/L),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (4.33 g/L),  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (0.31 g/L),  $\text{KCl}$  (0.13 g/L),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.1 g/L),  $\text{CaCl}_2$  (5.7 mg/L), 10 mL/L d'une solution de micronutriments (ATCC MD-TMS), 10 mL/L d'une solution de vitamines (ATCC MD-VS). Le pH du milieu est ajusté à 7.0. Ce milieu est stérilisé dans un autoclave (20 minutes à 121°C) avant l'ajout des vitamines. Avant l'inoculation, le milieu est désaéré avec un flux d'azote gazeux pendant 15 minutes. Le substrat carboné utilisé est l'acétate de sodium ajouté dans ce milieu à une concentration de 10 à 20 mM.

#### 2.1.2 Milieu synthétique (cathode) : S2

Pour les travaux réalisés à la cathode ou dans les contacteurs gaz-liquide (CGL), le milieu synthétique utilisé est le milieu minimum pour *Geobacter sulfurreducens* décrit dans l'étude de (Dumas et al., 2008) :  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (0.6 g/L),  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (1.5 g/L),  $\text{NaHCO}_3$  (2.5 g/L),  $\text{KCl}$  (0.1 g/L), 10 mL/L d'une solution de micronutriments (ATCC MD-TMS), 10 mL/L d'une solution de vitamines (ATCC MD-VS). La seule source de carbone est inorganique : il s'agit du carbonate ( $\text{HCO}_3^-$ ). De plus, du dioxyde de carbone est injecté via un flux continu de gaz  $\text{N}_2\text{-CO}_2$  (80-20%) de telle sorte qu'un équilibre s'établisse en solution entre les formes  $\text{H}_2\text{CO}_3$  ( $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ ) et  $\text{HCO}_3^-$ , fixant ainsi le pH du milieu à 6.8.

Les réactions qui régissent le fonctionnement du phénomène tampon de la solution carbonatée sont :



Pour certaines expériences, du Sodium 2-bromoéthanesulfonate (BES - inhibiteur de méthanogènes) est ajouté à ce milieu.

#### 2.1.3 Milieu synthétique à fortes teneurs en sels : S3

Pour les quelques expériences réalisées avec des sédiments de marais salants comme inoculum, le milieu S2 a été modifié avec l'ajout de sels, selon (Rousseau et al., 2013) : Milieu S2,  $\text{NaCl}$  (45 g/L),  $\text{MgCl}_2$  (0.1 g/L),  $\text{CaCl}_2$  (0.01 g/L). Ce milieu est particulièrement conducteur (autour de 100 mS/cm)

#### 2.1.4 Milieu de culture pour *Geobacter sulfurreducens*

Pour les pré-cultures de *G. sulfurreducens*, le milieu utilisé est le milieu S2, dans lequel est ajouté un donneur d'électrons : l'acétate de sodium (10 mM) et un accepteur d'électrons : le fumarate de sodium (50 mM). Un volume de 20 mL des précultures de *G. sulfurreducens* en croissance exponentielle est prélevé pour ensemercer les compartiments cathodiques des réacteurs d'électrosynthèse microbienne

(600 mL). Dans ces réacteurs, le milieu est dépourvu du donneur d'électrons organique (acétate) et remplacé par une cathode. Un flux continu de N<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> (80-20%) est injecté dans les compartiments cathodiques.

### 2.1.5 Milieu de culture pour *Sporomusa ovata*

*S. ovata* a été cultivée selon les recommandations du fournisseur DSMZ en utilisant le milieu DSMZ 311 modifié (sans casitone ni rézasurine) dont la composition est détaillée dans le Tableau 4.

20 ml de préculture de *S. ovata* sont prélevés pour inoculer les contacteurs gaz-liquide contenant un volume de 200 mL de milieu DSMZ modifié sans bêtaïne (donneur d'électrons).

**Tableau 4 : Milieu DSMZ 311 modifié utilisé pour les précultures de *Sporomusa ovata* (DSM 2662). Le même milieu sans Bêtaïne est utilisé dans les contacteurs gaz-liquide alimentés en hydrogène et en dioxyde de carbone.**

Composants	Quantités
NH <sub>4</sub> Cl	0,50 g/l
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,50 g/l
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,25 g/l
NaCl	2,25 g/l
FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	3,5 mg/l
Trace Mineral Supplement (ATCC)	10 ml/l
Vitamin Supplement (ATCC)	10 ml/l
Yeast extract	2,00 g/l
Bêtaïne x H <sub>2</sub> O	6,70 g/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,35 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,23 g/l
NaHCO <sub>3</sub>	4,00 g/l
L-Cystéine-HCl x H <sub>2</sub> O	0,30 g/l
Na <sub>2</sub> S x 9 H <sub>2</sub> O	0,30 g/l

## 2.2 Milieux « réels »

### 2.2.1 Milieu "Lixiviat de terreau"

Le lixiviat de terreau est préparé selon la méthode décrite dans la thèse de Diana Pocaznoi. (2012) en mélangeant 1 L de terreau de jardin et 1.5 L d'une solution à 60 mM de KCl. Le mélange est laissé sous agitation pendant 18 à 24h, puis filtré pour éliminer la fraction solide et complété avec de l'acétate de sodium 20 mM, sauf précision contraire.

### 2.2.2 Milieu « eaux usées »

Le milieu de dilution « eaux usées » provient de prélèvements réalisés à la station d'épuration de Castanet (31) au niveau de l'arrivée des eaux usées brutes après le dégrillage. La demande Chimique en Oxygène (DCO) de ces effluents varie entre 270 et 500 mg/L en fonction des prélèvements. Sa

conductivité est autour de 1.2 mS/cm. Ce milieu est complété avec de l'acétate de sodium 10 mM (0.6 gDCO/L) ou 10 mL de biodéchet (0.7 gDCO/L) préparé au laboratoire selon le protocole décrit dans la section suivante (2.2.3).

### **2.2.3 Protocole de préparation du biodéchet**

Le biodéchet est préparé en utilisant le protocole de préparation défini par le partenaire coordinateur du projet Biorare : l'IRSTEA. Les matières premières du biodéchet sont décongelées à 4°C. Un kilogramme de biodéchet est reconstitué à partir de 81 g de pommes de terre, 34 g de tomates, 81 g de steak, 7 g de biscuits, 42 g de poudre de lait et 756 mL d'eau. Le mélange est broyé et homogénéisé à l'aide d'un mixeur. Avant utilisation, le biodéchet reconstitué est versé dans un flacon schott (2L) puis fermenté pendant cinq jours à 30°C. Après 5 jours de fermentation, le pH est de 3.4 et la DCO soluble est de 43 gDCO/L. Le biodéchet est alors centrifugé et le surnageant est aliquoté en flacons de 40 mL puis congelé. La composition approximative du biodéchet ainsi reconstitué exprimé en gDCO/L est : 9.7 g DCO/L d'acide butyrique, 5.3 g DCO/L d'acide lactique ; 0.4 g DCO/L d'acide acétique et 27.2 g DCO/L d'autres composés correspondants à des protéines, sucres, lipides et autres acides organiques non identifiés dans l'analyse HPLC. Ce biodéchet est utilisé par ajout de 10 à 20 mL dans 600 mL d'anolyte, ce qui correspond à des concentrations de 700 à 1400 mgDCO/L.

## **3 Dispositifs expérimentaux**

### **3.1 Les électrodes**

Différentes électrodes ont été utilisées au cours de ce travail de thèse (Figure 9). Pour les études sur la formation de bioanodes, les électrodes de travail sont en tissu de carbone (Paxitech, Grenoble) ou en feutre de carbone (RVG 4000, Mersen, France) avec une surface projetée de 2\*3 cm<sup>2</sup>. La connexion électrique est assurée par un fil de platine qui traverse le tissu ou par une tige de titane ( $\varnothing=2\text{mm}$ ) qui traverse le feutre dans le sens de la longueur. Pour les études sur la formation de biocathodes, les électrodes de travail sont soit en tissu de carbone, soit en acier inoxydable 254 SMO de dimension 7\*3 cm (21 cm<sup>2</sup>). La connexion électrique des électrodes d'acier est assurée par une tige de titane fileté et vissée dans le matériau.

Les électrodes de références utilisées sont des électrodes commerciales au calomel ( $\text{Hg}/\text{Hg}_2\text{Cl}_2/\text{KCl}_{\text{sat}}$ ), saturées (ECS, Radiometer) avec une solution de KCl, dont le potentiel ( $+0.244 \pm 0.01 \text{ V/ESH}$ ) est contrôlé avant chaque expérience par rapport à une électrode de référence ECS neuve.

Les électrodes auxiliaires (ou contre électrodes) sont des grilles de platine de 4 à 10 cm<sup>2</sup> nettoyées avant chaque utilisation dans la flamme d'un bec bunsen pour éliminer les dépôts de surface.



Figure 9 : Photographie des quatre types d'électrodes utilisées dans les travaux de thèse.

### 3.2 Réacteurs électrochimiques « standards »

Les expérimentations ont été réalisées dans des réacteurs électrochimiques avec des montages à 3 électrodes, constitués d'une électrode de travail, une électrode de référence et une contre électrode.

Différentes configurations de réacteurs électrochimiques ont été utilisées : Des réacteurs dits « simple compartiment », qui mettent en oeuvre les 3 électrodes dans le même électrolyte (Figure 10B) et des réacteurs dits « double compartiment », pour lesquels une membrane sépare les côtés anodiques et cathodiques (Figure 10A). Dans les réacteurs à double compartiments, l'électrode de référence est toujours placée dans le même compartiment que l'électrode de travail, au plus proche de celle-ci.

Les réacteurs « simple compartiment » consistent en une bouteille de type Schott à col large munie d'un couvercle à 4 piquages de type GL18. Trois piquages permettent l'introduction des 3 électrodes et le dernier sert au prélèvement de la solution d'électrolyte pour les analyses physico-chimiques. Pour les réacteurs à double compartiments, deux flacons Schott sont associés après modifications nécessaires pour permettre leur assemblage. Les deux flacons sont physiquement séparés par une membrane. La membrane utilisée est une membrane échangeuse de cations (Fumasep FKE) de 7 cm<sup>2</sup>.

Sauf indication contraire, la température est régulée par un bain thermostaté à 27°C pour les réacteurs simple compartiment. Cette température a été choisie initialement suivant le protocole tiré de la bibliographie (Liu et al., 2008) et a été conservée par la suite. La température des réacteurs à double compartiments est régulée elle aussi à 27°C grâce à l'utilisation d'une étuve thermostatée.

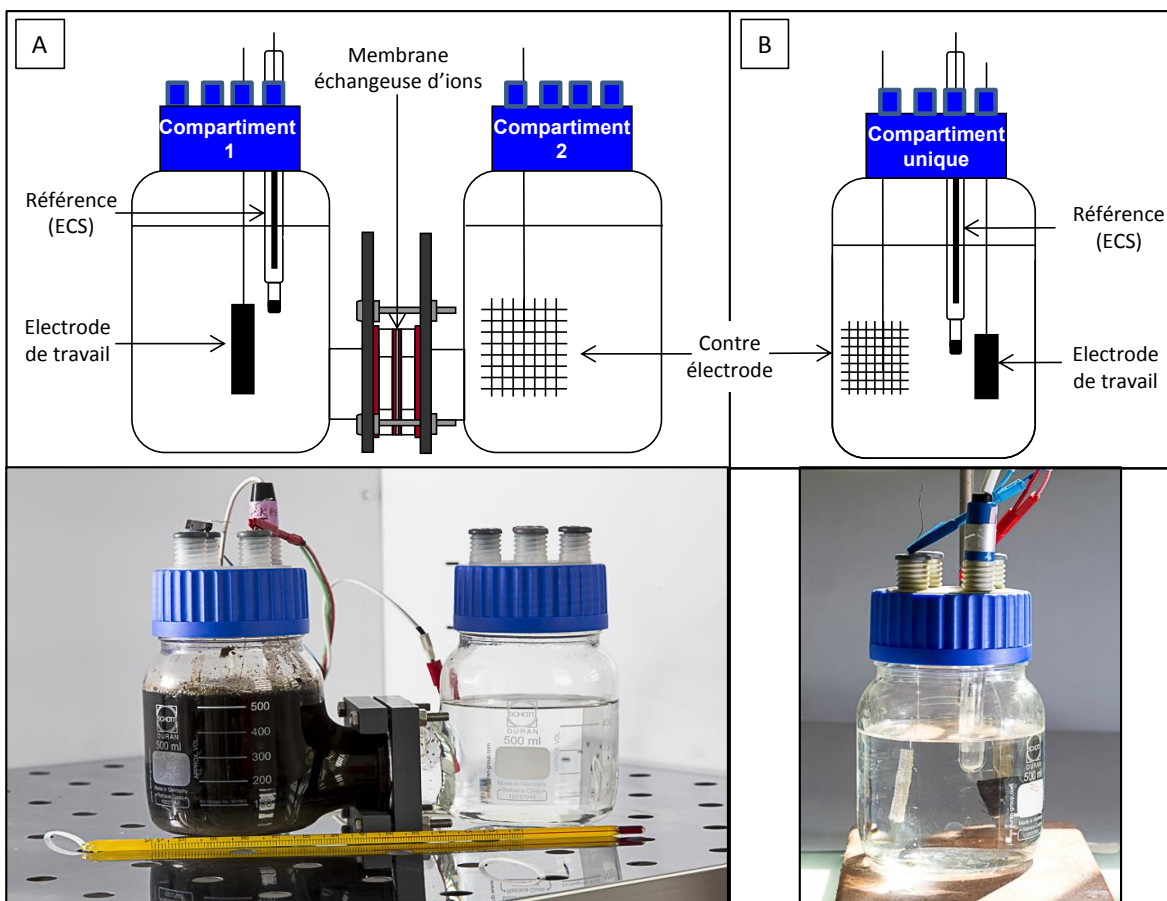


Figure 10 : Schéma et photographie d'un réacteur double compartiments (A) et d'un réacteur simple compartiment (B).

### 3.3 Réacteurs électrochimiques modifiés

Pour permettre l'insertion d'une électrode pH et pour faciliter les changements de milieu (électrolyte), des modifications ont été effectuées sur les réacteurs électrochimiques « standards » par une équipe industrielle spécialiste de la conception et de la modification du verre (verrier Avitec, Toulouse). Les modifications ont consistées à ajouter trois piquages sur les flacons Schott (Figure 11): un piquage GL 18 en bas, un piquage GL 18 et un piquage GL 25 avec un angle de 20° environ pour la sonde pH en haut des flacons. Ces réacteurs sont utilisés dans une étuve thermostatée pour maintenir la température des milieux réactionnels à 27°C.



Figure 11 : Réacteurs électrochimiques modifiés avec 3 piquages supplémentaires.

### 3.4 Electrolyseur microbien sans membrane

Les électrolyseurs microbiens sans membrane sont des réacteurs en verre cylindriques avec un volume utile de 700 mL (Figure 12.A). Ils sont munis de plusieurs piquages sur le couvercle, pour assurer la disposition des électrodes, l'alimentation du réacteur ainsi que les prélèvements de la phase liquide ou de la phase gaz des réacteurs. Un dernier piquage sert à récupérer en continu les gaz produits grâce à un tuyau rigide connecté à un compteur volumétrique adapté à la mesure des micro-débits de gaz (Figure 14 - section 3.5). Une bague à sertir en acier et un joint torique permettent de fixer hermétiquement le couvercle sur le corps du réacteur.

Une électrode rectangulaire en tissu de carbone de surface projetée égale à  $180 \text{ cm}^2$  ( $20 \times 9$ ) a été utilisée comme anode. Pour assurer sa tenue et la collecte du courant, le tissu est « agrafé » sur une grille d'acier inoxydable, sur laquelle est soudée une tige d'acier. L'anode est façonnée pour qu'elle puisse s'ajuster proche des parois du réacteur en verre cylindrique (Figure 12.B). La cathode, une grille de platine de  $18 \text{ cm}^2$ , est placée au centre du cylindre formé par l'anode. Une électrode de référence (ECS) est également insérée dans le piquage central du réacteur, afin d'être positionnée entre l'anode et la cathode.

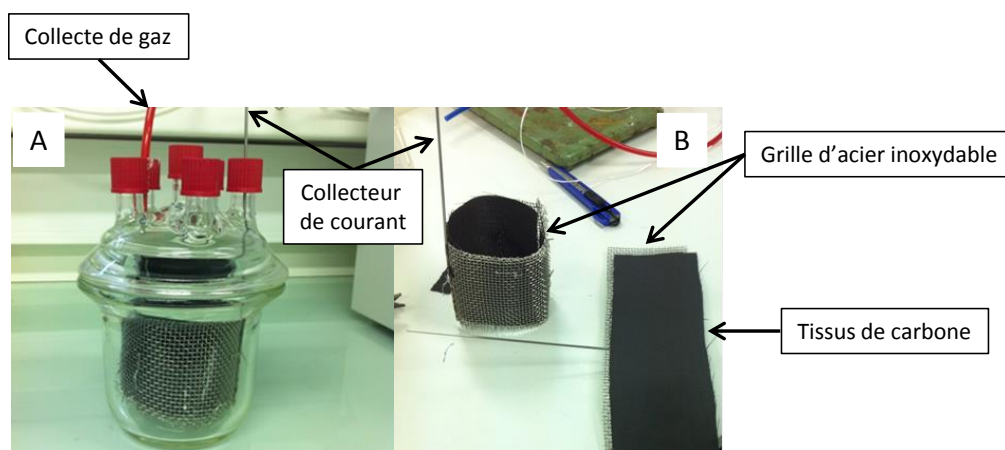


Figure 12 : (A) Electrolyseur microbien sans membrane ; (B) Anode cylindrique en tissu de carbone (surface déployée  $180 \text{ cm}^2$ ) fixée mécaniquement à un collecteur de courant en acier inoxydable.



### 3.5 Electrolyseur microbien avec membrane

Un prototype d'électrolyseur microbien avec séparateur a été dimensionné (Chapitre 5) à partir de l'expérience acquise ces dernières années par le LGC sur la technologie des électrolyseurs microbiens, spécialement au cours du projet ANR Défi H12 (Lacroix et al., 2014) et des calculs présentés dans le chapitre 6 de ce manuscrit. La construction a ensuite été réalisée par le service technique et industriel (atelier STI) du LGC.

Le prototype a été fabriqué en plexiglas (Polyméthacrylate de méthyle - PMMA) et ses dimensions sont 140\*188\*363 mm L\*I\*h (Figure 13).

Le compartiment cathodique possède un volume utile de 2.2 L, tandis que le compartiment anodique a un volume de 500 mL. Ce compartiment anodique est hydrauliquement connecté à un réacteur déporté d'un volume de 500 mL. L'anolyte est de l'eau usée alimenté en acétate. L'anolyte est re-circulé entre le compartiment anodique du prototype et le réacteur déporté à l'aide d'une pompe avec un débit d'environ 120 mL/min (HRT=8.3 min). Le réacteur déporté permet une instrumentation plus aisée du système (pH, température, apport du substrat et prélèvement). Il est continuellement désaéré avec un flux gazeux d'azote.

Une électrode rectangulaire en tissu de carbone de surface projetée égale à 80 cm<sup>2</sup> (20\*4) a été utilisée comme anode. Pour assurer sa tenue et la collecte du courant, le tissu est « agrafé » sur une grille d'acier, sur laquelle un fil de platine est « tissé » pour servir de collecteur de courant. Une électrode de référence au calomel, saturée sert de référence. Elle est placée très proche de l'anode dans le même compartiment.

La cathode est une grille d'acier de surface 60 cm<sup>2</sup>. Le collecteur est une tige d'acier soudée sur la grille. La membrane, d'une surface utile de 110 cm<sup>2</sup> est choisie en fonction du catholyte utilisé. Deux couples catholyte/membrane ont été testés :

- Eau du réseau / membrane de microfiltration (en polyéthersulfone, de référence S80610 chez le fournisseur Pall)
- Solution tampon phosphate (0.4 M – pH 6.8) / membrane échangeuse de cation (Fumasep® FKE).

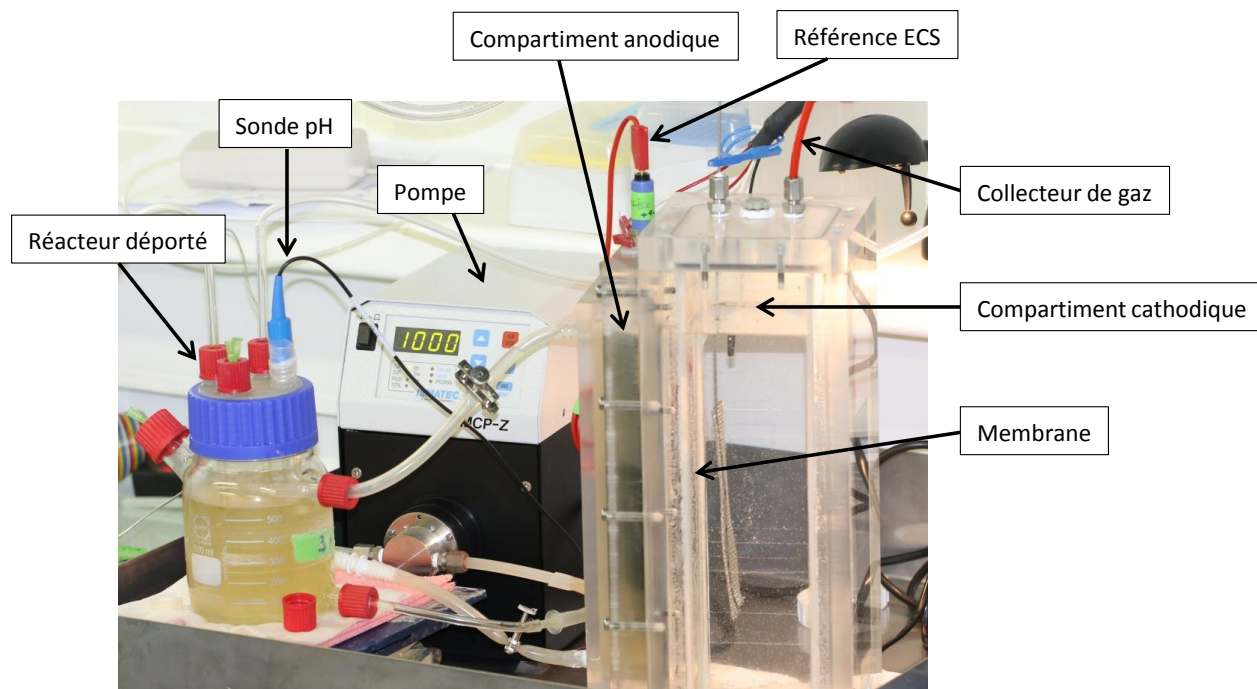


Figure 13 : Electrolyseur microbien avec séparateur (membrane).

L'hydrogène produit dans le compartiment cathodique est récupéré et dirigé vers un compteur volumétrique (Figure 14) MilliGascounter® (Marque Ritter, Référence : MGC-1 V3.2) permettant de mesurer des micro-débits de gaz de 1 mL/j à 1L/h avec une précision de +/- 3%. L'affichage sur écran digital donne le volume total produit. Le logiciel d'acquisition « RIGAMO » permet la saisie des données sur Windows® et le calcul des débits.



Figure 14 : Compteur volumétrique MilliGascounter® utilisé pour la mesure des débits gazeux en sortie du compartiment cathodique

### 3.6 Contacteurs gaz-liquide (CGL)

Les contacteurs gaz-liquide utilisés sont dérivés de flacons laveurs sur lesquels un piquage hermétique (bouchon perforé + septum) a été ajouté pour réaliser des prélèvements à l'aide d'une seringue et d'une aiguille (Figure 15).

Les contacteurs gaz-liquide contiennent 200 mL de milieu synthétique (S2 ou S3) et sont alimentés en continu avec deux flux gazeux :  $N_2$ - $CO_2$  (80-20%) et  $H_2$ . Ils sont inoculés à 3% v/v ou 10% v/v selon les expériences.

La première version (1.0) des contacteurs gaz-liquide a été optimisée grâce à l'ajout d'un tuyau poreux connecté à un diffuseur de fines bulles en sortie de la canne plongeante d'alimentation des gaz dans le flacon laveur. Avec le tuyau, la diffusion du gaz se fait avec des bulles plus fines. Le temps de rétention du gaz au sein de la phase liquide est plus long. Par conséquent, le contact gaz-liquide est amélioré. Cette optimisation est la version 1.1 du contacteur.

Une version 1.2 a été imaginée à partir de la version 1.1 en ajoutant de la laine d'acier à l'intérieur des flacons. Le temps de rétention des fines bulles de gaz est encore maximisé car les bulles de gaz restent coincées sous et dans le garnissage. Le temps de contact est augmenté, favorisant ainsi les échanges de matière entre les deux phases. La présence de la laine d'acier peut également servir de support solide au développement d'une biomasse fixée (biofilm).

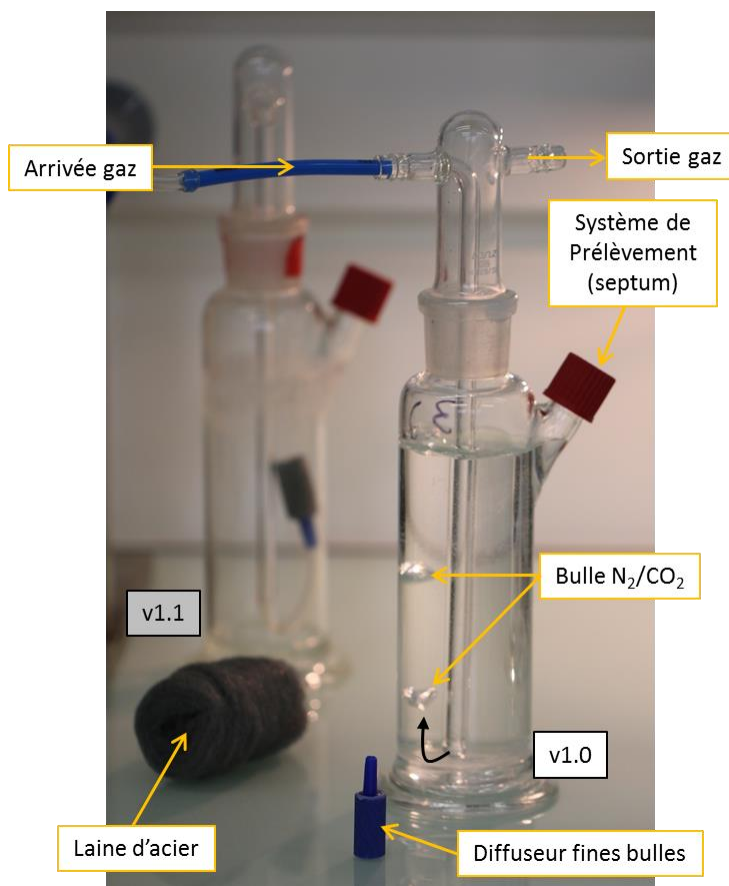


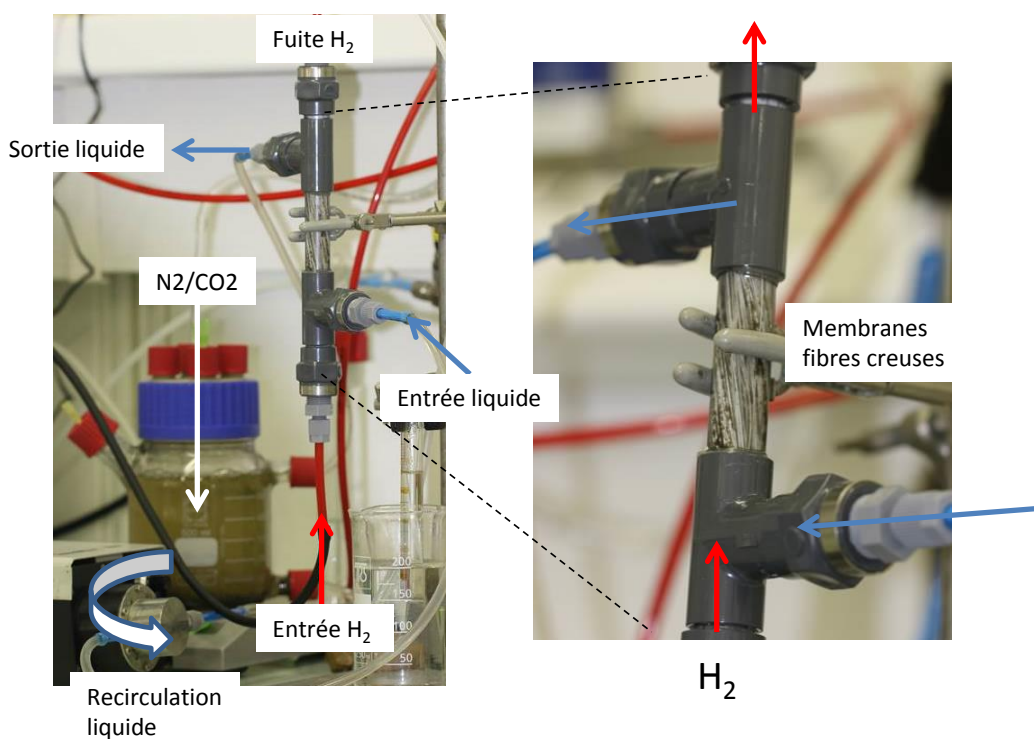
Figure 15 : Contacteurs gaz-Liquide : La Version 1.0 est un simple flacon-laveur équipé d'un système de prélèvement. Dans la version 1.1 sont ajoutés un tuyau poreux et un diffuseur de fines bulles. La version 1.2 est une modification de la version 1.1 avec l'ajout d'un garnissage de laine d'acier.

Finalement, la version 2.0 utilise un contacteur membranaire conçu et fabriqué au LGC par J-C Rémigy et J-C Rouch (Département Génie des Interfaces et des Milieux Divisés) spécialement pour le projet. L'utilisation d'une membrane permet d'intensifier le transfert gaz-liquide grâce à une aire interfaciale développée plus élevée.

Il s'agit de modules « Oxyplus » (Figure 16) comportant 200 fibres creuses en polyméthylpentène, de longueur totale 2150 mm avec un encombrement en longueur de 120 mm. L'épaisseur de la membrane est 90  $\mu\text{m}$  et le diamètre interne de la fibre est de 200  $\mu\text{m}$ . Les performances caractéristiques de la membrane sont données entre 0.2 et 10  $\text{mL}/(\text{cm}^2 \cdot \text{min} \cdot \text{bar})$  pour un flux d'azote. Sur notre montage, la pression de l'hydrogène en amont du module est fixée à 1.5 bars.

Le module « Oxyplus » est monté en dérivation sur un réacteur de 600 mL. Le milieu réactionnel ainsi que la biomasse sont re-circulés à l'aide d'une pompe avec un débit de 100  $\text{mL}/\text{min}$ . La phase liquide dans le réacteur est alimentée en continu avec un flux gazeux de  $\text{N}_2\text{-CO}_2$ . L'hydrogène est injecté dans les fibres creuses à un débit d'environ 1  $\text{mL}/\text{min}$ .

Le réacteur est inoculé avec 10% v/v de boues biologiques hydrolysées préalablement acclimatées.



**Figure 16 : Contacteur gaz-liquide version 2.0 : Module « Oxyplus® » avec membranes à fibres creuses dans lesquelles circule le flux gazeux. Cette version de CGL a pour objectifs de maximiser le contact entre l'hydrogène et les microorganismes autotrophes par l'intermédiaire de la membrane et du biofilm développé sur celle-ci.**

## 4 Technique d'analyses

### 4.1 Techniques électrochimiques

Trois techniques électrochimiques ont été utilisées au cours de ce travail : la chronoampérométrie, la voltammétrie cyclique et la spectrométrie d'impédance. L'ensemble des mesures a été réalisé avec un multi-potentiostat (VPM, Bio-Logic S.A., France) piloté par le logiciel EC-Lab (version 10.2).

#### 4.1.1 Chronoampérométrie (CA)

La chronoampérométrie consiste à imposer un potentiel à l'électrode de travail par rapport à une électrode de référence et à mesurer le courant électrique qui traverse le circuit au cours du temps. Pour les études sur la formation de bioanodes, les électrodes de travail ont été polarisées à +0.15 V/ECS sauf indication contraire. Pour les études sur la formation de biocathodes, les électrodes de travail ont été polarisées à -0.6 ou -0.9 V/ECS. Les courants enregistrés sont exprimés en intensité (mA) ou en densité de courant par rapport à la surface géométrique de l'électrode de travail ( $A/m^2$ ).

#### 4.1.2 Voltammétrie cyclique (CV= Cyclic Voltammetry)

La voltammétrie consiste à enregistrer le courant en faisant varier le potentiel de l'électrode de travail de façon linéaire entre deux bornes de potentiel. On parle de voltammétrie cyclique (CV) lorsque le potentiel est balayé en aller-retour d'une borne à l'autre de la fenêtre de potentiels. Le potentiel de l'électrode de travail part d'une valeur initiale et varie linéairement jusqu'à une valeur limite fixée, dite « potentiel d'inversion », à partir de laquelle, le sens du balayage du potentiel est inversé. La même fenêtre de potentiel est alors balayée dans le sens opposé pour revenir au potentiel de départ. Les CV ont été réalisées avec une vitesse de variation du potentiel, appelée communément vitesse de balayage, de 1 mV/s. L'intervalle des potentiels a été fixé en fonction du type de réaction étudiée à l'électrode de travail (oxydation ou réduction), allant au maximum de -1.0 V/ECS à +0,3 V/ECS. Généralement, les CVs sont enregistrées avant le démarrage des chronoampérométries, c'est-à-dire à  $t=0$  quand les électrodes ne sont pas colonisées, puis lorsque le courant est proche de sa valeur maximale, et enfin lorsque le courant revient à une valeur nulle avec un biofilm établi. Lorsque la CV est effectuée en présence d'espèces à oxyder ou à réduire (substrat par exemple) dans l'électrolyte, on parle de CV catalytique ou « turn-over ». Inversement, les CVs non-catalytiques ou « non turn-over » sont celles réalisées lorsqu'il n'y a plus d'espèces en solution à oxyder ou à réduire.

#### 4.1.3 Spectrométrie d'impédance électrochimique

La technique d'impédance électrochimique diffère des techniques électrochimiques dites « classiques ». Cette méthode consiste à perturber l'état stationnaire d'un système électrochimique, et à observer comment chaque processus élémentaire perturbé revient à l'état stationnaire, avec son propre temps de réponse. En spectrométrie d'impédance, le potentiostat impose un signal sinusoïdal à l'électrode autour d'un courant stationnaire fixé. Trois paramètres sont à renseigner au niveau du potentiostat pour effectuer les mesures : le courant, l'amplitude du signal (qui doit être faible pour rester sur le même état d'équilibre) et la gamme de fréquence à étudier.

Dans le cas présent, les spectrométries d'impédance ont été réalisées à plusieurs valeurs de courant inférieures à la valeur de courant au moment de l'analyse soit 1.5, 15 et 30 mA. L'amplitude du signal a été fixée à 400  $\mu$ A et la gamme de fréquences va de 1 Hz à 100 kHz avec un échantillonnage de 10 points par décade (soit 50 points).

L'impédance mesurée  $Z = \text{Re}(Z) + j\text{Im}(Z)$  est représentée par un nombre complexe avec une partie réelle et une partie imaginaire. Le diagramme de Nyquist qui porte la partie imaginaire de l'impédance en fonction de la partie réelle, a été utilisé pour l'exploitation des résultats. En fait l'exploitation des résultats s'est limitée à évaluer la valeur de l'intersection de la courbe avec l'axe des abscisses  $\text{Re}(Z)$  dans les hautes fréquences. Cette valeur est homogène à une résistance et se mesure en Ohms. Elle renseigne sur la résistance aux transferts d'ions en solution entre anode et cathode pour les montages à deux électrodes ou entre électrode de travail et référence pour les montages à 3 électrodes.

## 4.2 Techniques d'analyses chimiques et biochimiques

### 4.2.1 Analyse de la composition des gaz produits par chromatographie en phase gaz (CPG)

Un micro-chromatographe en phase gazeuse ( $\mu$ CPG, Agilent, modèle 490 GC) a été utilisé afin de déterminer la composition des gaz produits dans les électrolyseurs microbiens sans membrane. Ce chromatographe comporte deux colonnes. La première colonne est constituée d'un tamis moléculaire en zéolithe et permet la détection des gaz dits permanents ( $\text{N}_2$ ,  $\text{O}_2$ ,  $\text{H}_2$ ). La deuxième colonne est poreuse et apolaire et constituée d'un mélange polystyrène-divinylbenzène greffé sur gel de silice. Elle est conçue pour la détection des gaz de type hydrocarbures,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ . De l'argon et de l'hélium ont été utilisés respectivement comme gaz vecteur dans la première et la deuxième colonne. Les températures de fonctionnement des colonnes sont respectivement de 100°C et 45°C et leur pression doit être réglée à 150 kPa.

L'étalonnage du  $\mu$ CPG a été effectué avec un mélange commercial de gaz de fractions molaires connues :  $\text{H}_2$  (60%),  $\text{CH}_4$  (10%) et  $\text{CO}_2$  (30%). L'air ambiant peut également servir de gaz étalon pour l'étalonnage de l' $\text{O}_2$  (21%) et  $\text{N}_2$  (78%).

### 4.2.2 Analyses des métabolites produits par chromatographie liquide haute performance (HPLC)

Les échantillons prélevés sont analysés en HPLC (Thermo Scientific, France) pour la quantification des acides organiques et des alcools produits. La colonne utilisée est une colonne Rezex ROA-Organic acid  $\text{H}^+$  (8%), 250\*4.6 mm (Phenomenex, France) thermostatée à 30°C et associée à deux détecteurs en série : un détecteur UV et un réfractomètre. La phase mobile est une solution aqueuse d'acide sulfurique 10 mM (pH 2.2). Son débit est fixé à 170  $\mu$ L/min.

Le système est calibré avec soit un mélange de malate, succinate, glycérol, et fumarate, soit un mélange de formiate, acétate, propionate, éthanol, et butyrate dans une gamme de 0 à 2 g/L. Les temps de rétention de ces composés sont donnés dans le Tableau 5.

Tableau 5 : Temps de rétention des différentes espèces dosées à l'HPLC

Espèces	Temps de rétention (min)
Acide malique	11,7
Acide succinique	14,2
Glycérol	14,7
Acide formique	15,6
Acide acétique	16,8
Acide fumarique	18,3
Acide propionique	19,6
Ethanol	21,4
Acide butyrique	24,2

#### 4.2.3 Dosage d'acétate par kit enzymatique

Le dosage de l'acétate a parfois été réalisé avec un kit enzymatique (Libios, K-Acetak). Ce kit est constitué de 3 flacons contenant une solution tampon (pH 7.4), des comprimés contenant le cofacteur NADH, l'adénosine triphosphate (ATP) et le phosphoénolpyruvate (PEP), une solution enzymatique avec de l'acétate kinase (AK), de la pyruvate kinase (PK) et de la D-lactate déshydrogénase (D-LDH).

Les trois réactions mises en jeu sont : la phosphorylation de l'acide acétique en acétylphosphate qui génère de l'ADP, la déphosphorylation du phosphoénolpyruvate en pyruvate et enfin la déshydrogénation du pyruvate en acide lactique (Figure 17).

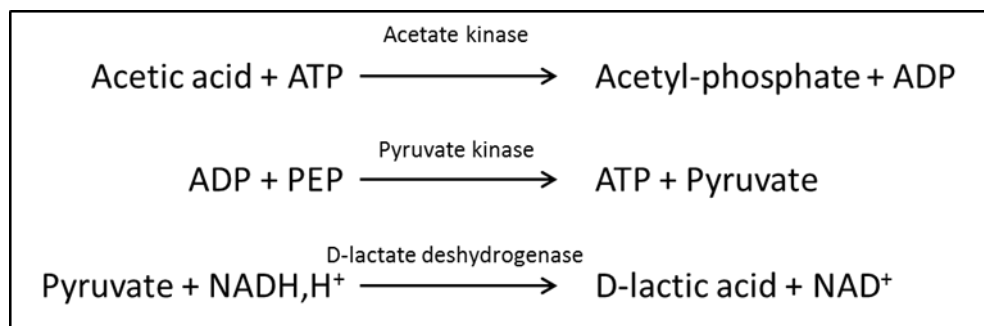


Figure 17 : Réactions mises en jeu lors du dosage de l'acide acétique au kit enzymatique

Le temps de réaction est de dix minutes. La méthode consiste en un dosage indirect de la quantité de NADH restante par absorbance à 340 nm (spectromètre JENWAY 7315). Cette quantité est inversement proportionnelle à la quantité d'acide acétique dosée. L'étalonnage a été effectué avec des solutions d'acétate de sodium de concentrations croissantes entre 0 et 15 mM (Figure 18).

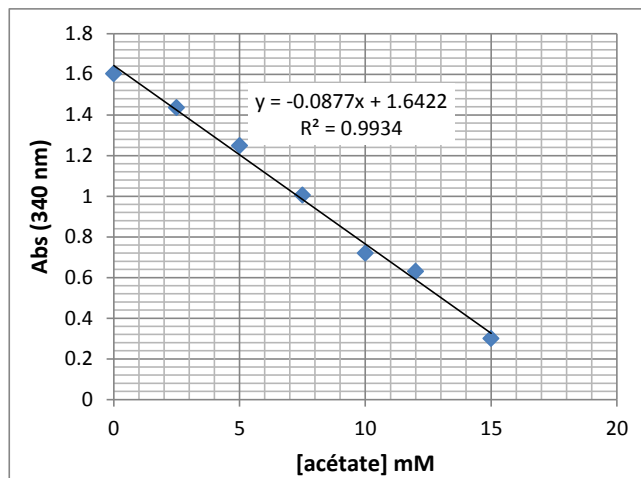


Figure 18 : Gamme étalon pour le dosage de l'acide acétique à l'aide du kit enzymatique (Libios, K-Acetak)

### 4.3 Observations microscopiques des électrodes

#### 4.3.1 Microscopie électronique à balayage (MEB)

Ces observations ont été effectuées au Service d'Analyse et Procédé du LGC avec l'aide précieuse de Marie-Line De Solan qui excelle dans l'utilisation du MEB (Leo 435 VP-Carl Zeiss SMT, Figure 19).

Le principe du microscope électronique consiste à envoyer des électrons sur l'échantillon. Ces électrons vont s'intercaler dans les atomes de l'échantillon en émettant des électrons secondaires, par analogie avec la réflexion des photons. Les électrons secondaires étant très sensibles à la topographie, un détecteur d'électrons secondaires affiche l'image retransmise de l'échantillon.

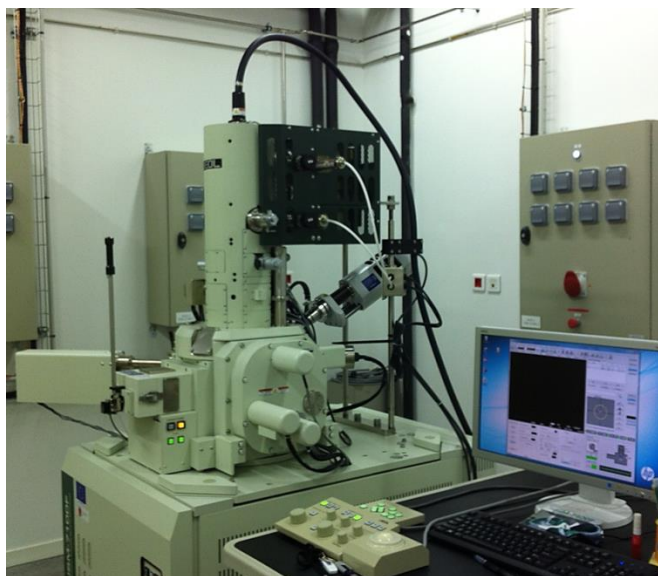


Figure 19 : Microscope électronique à balayage (Leo 435 VP) utilisé pour les observations d'électrodes colonisées par un biofilm



L'observation des biofilms au MEB nécessite un prétraitement des électrodes colonisées. Ce traitement se décompose en 3 parties successives : la fixation, la déshydratation, la métallisation.

Fixation : Pour fixer le biofilm, les échantillons d'électrode sont tout d'abord placés dans un bain contenant 33% d'une solution de glutaraldéhyde à 8% vol., 33% d'une solution de tampon phosphate (0.4 M - pH 7.4) et 33% d'eau distillée. La fixation peut durer de 20 minutes à 2 heures, selon le matériau d'électrode et sa porosité. Pour le tissu de carbone, le temps de fixation est de l'ordre de 1 heure. Une fois la fixation effectuée, les échantillons sont ensuite lavés délicatement dans une solution contenant 50% d'une solution de saccharose à 0.6 M, 25% de tampon phosphate (0.4 M - pH 7.4) et 25% d'eau distillée.

Déshydratation : La déshydratation chimique est préférée au séchage car elle nous a semblé moins destructrice pour les biofilms. Pour éviter un stress osmotique trop important pour les cellules bactériennes formant le biofilm, l'étape de déshydratation s'opère de façon progressive. L'échantillon est, dans un premier temps, plongé pendant des périodes de 5 minutes dans des mélanges eau/acétone dont la proportion en acétone augmente progressivement : 50/50, 30/70 et 100% d'acétone. Finalement, les électrodes sont plongées dans un mélange acétone/hexaméthylsilazane (HMDS) à 50/50% puis dans 100% HMDS jusqu'à évaporation totale du solvant dans les deux cas.

Métallisation : Lors du passage du faisceau d'électrons sur un matériau non ou peu conducteur comme un biofilm, les électrons vont s'accumuler sur la surface du matériau qui va se charger et dégrader la qualité de l'image finale. Pour éviter un tel phénomène, l'échantillon est recouvert d'une nanocouche d'or (10/20nm) par pulvérisation cathodique à froid.

La Figure 20 est une illustration des observations de biofilms actuellement possibles en MEB au LGC. Il s'agit d'un biofilm formé à partir de boues activées dans un milieu synthétique alimenté par de l'acétate, pendant 20 jours sur une électrode en tissu de carbone polarisée à +0.15 V/ECS à une température de 27°C.

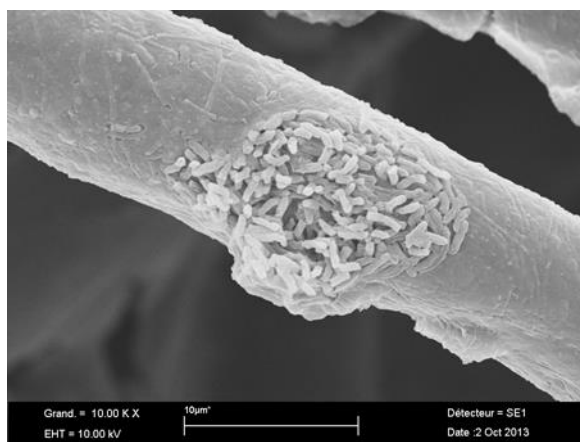


Figure 20 : Image MEB d'un biofilm électroactif sur une fibre de tissu de carbone.

### 4.3.2 Microscopie à épifluorescence 3D

La répartition globale du biofilm et du matériel biologique en général a été examinée à la surface des électrodes par microscopie à épifluorescence 3D. Les biofilms sont visualisés avec un microscope Carl Zeiss Axio Imager-M2 motorisé en Z et équipé avec une source de lumière (HBO 200) et un filtre Zeiss 09 (excitateur HP450-490, réflecteur FT-10, filtre barrière LP520). Les images ont été acquises avec une caméra monochrome numérique (Evolution VF) et traitées avec le logiciel Zen.

Le prétraitement des biofilms consiste à mettre en contact les biofilms avec une solution aqueuse contenant un fluorochrome spécifique des acides nucléiques : l'acridine orange (AO) 0,01% (A6014 Sigma) pendant 10 minutes. Les biofilms sont ensuite lavés soigneusement avec de l'eau physiologique. Les échantillons sont ensuite laissés à température ambiante pendant au minimum 12 heures avant les observations. La Figure 21 est un exemple de l'observation d'une électrode de tissu colonisée par un biofilm, marqué à l'AO.

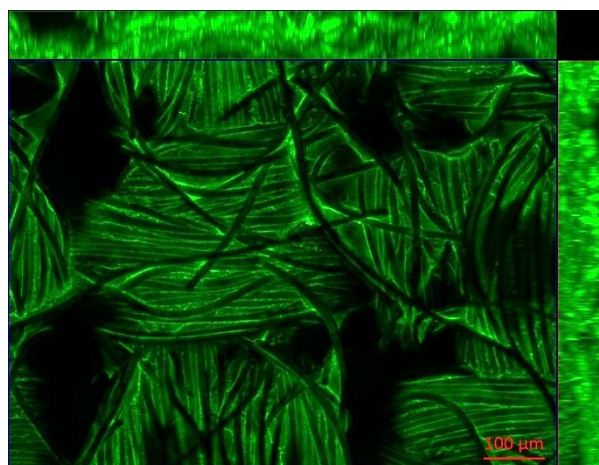


Figure 21 : Biofilm sur tissu visualisé par microscopie à épifluorescence 3D

## 4.4 Analyse des populations microbiennes par pyroséquençage

### 4.4.1 Préparation des échantillons

Les microorganismes organisés en biofilm sur l'électrode de travail sont détachés et prélevés en suivant la procédure suivante : les électrodes sont délicatement retirées des réacteurs et rincées avec de l'eau physiologique (ou avec leur milieu de culture synthétique propre). Une partie de la bioélectrode à analyser (environ 2 cm<sup>2</sup> de tissu ou de feutre de carbone) est placée dans un tube à essai avec 2 mL d'eau distillé puis le biofilm est détaché par sonication (3 minutes à une puissance de 80 W). 1.5 mL d'échantillon soniqué sont prélevés avec une pipette et conditionnés dans des tubes à bouchons vissant certifiés exempt d'ADN, d'ADNase et ARNase d'une contenance de 2 mL.

1.5 mL d'échantillons provenant des milieux sont également prélevés et conservés dans les tubes à bouchons. Il s'agit des microorganismes planctoniques ou détachés du biofilm.

Chaque échantillon est identifié avec un nom unique et envoyé par voie postale au laboratoire américain Research and Testing Laboratory (RTLab) situé à Lubbock (Texas).

#### 4.4.2 Extraction d'ADN, pyroséquençage et analyses bioinformatiques

L'extraction d'ADN, le pyroséquençage et les analyses bioinformatiques des échantillons a été sous-traité au laboratoire RTLab (Lubbock, Texas).

Le séquençage de l'ADN permet de déterminer l'ordre d'enchaînement des nucléotides, molécules de bases de l'ADN, et d'identifier par comparaison et selon le niveau d'exigence du séquençage une classe, un ordre, une famille, un genre, une espèce donné de microorganisme. Les désoxyribonucléotides triphosphate (dNTP) sont ajoutés l'un après l'autre (et non pas tous ensemble comme dans la méthode de Sanger). Si le désoxyribonucléotide ajouté est complémentaire du désoxyribonucléotide du brin matrice, il est incorporé dans le brin en cours de synthèse et un pyrophosphate inorganique (PPi) est libéré. L'ATP sulfurylase transforme stœchiométriquement le pyrophosphate libéré en ATP en présence d'un substrat : l'adénosine 5' - phosphosulfate (APS). L'ATP formé est utilisé par une luciférase qui transforme la luciférine en oxyluciférine qui génère un signal lumineux dans le visible proportionnel à la quantité d'ATP. Le capteur du séquenceur capte le signal lumineux et le traduit par un pic sur un pyrogramme. La hauteur du pic est proportionnelle à l'intensité du signal lumineux, elle-même proportionnelle au nombre de nucléotides incorporés au même moment. La séquence est déduite à partir de la taille des pics obtenus.

Le traitement des données est pris en charge par RTLab et consiste d'abord à corriger les erreurs de séquençage et éliminer le « bruit ». Les séquences sont soumises à un nettoyage avec plusieurs niveaux de filtres (motifs répétés, taille minimale de séquences, nettoyage des extrémités de séquences de mauvaise qualité). Les séquences qui passent les filtres sont regroupées en groupe de séquences redondantes par clusterisation avec un taux d'homologie à 96%, avec l'algorithme USEARCH (Edgar, 2010). Toutes les séquences non redondantes (les singletons) sont mises de côté car elles présentent le risque de correspondre à des séquences artificielles (chimériques).

Finalement, pour chaque cluster regroupant les séquences homologues est créé un fichier FASTA, interrogé contre une base de données issue du site NCBI (National Center for Biotechnology Information) en utilisant BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool nucleotidic). Basé sur le pourcentage d'identité entre la séquence et celle dérivée du BLASTn, l'identification est réalisée aux niveaux taxonomiques appropriés sur la base des critères suivants :

Scores d'identité des séquences	Niveaux taxonomiques
En dessous de 77%	Non pris en compte (non identifié)
Entre 77% et 80%	Phylum
Entre 80% et 85%	Classe
Entre 85% et 90%	Ordre
Entre 90% et 95%	Famille
Entre 95% et 97%	Genre
Plus de 97%	Espèce

#### 4.4.3 Traitement des résultats

A la réception des résultats, chaque niveau taxonomique est analysé individuellement fournissant des informations d'abondance relative au sein de l'échantillon. Cela permet d'avoir un aperçu des groupes microbiens dominants au sein de l'échantillon et de comparer les échantillons entre eux. Plus l'ADN était de bonne qualité et plus l'identification est précise (jusqu'à l'espèce).

A partir des données fournies par RTLab, il est également possible de calculer des indices de diversité pour « quantifier » la diversité microbienne d'un échantillon et faciliter les comparaisons entre échantillons. C'est l'indice de Simpson qui a parfois été considéré, calculé à partir du nombre d'Unité Taxonomique Opérationnelle (UTO), correspondant à l'espèce (identification avec un score supérieur à 97%), selon l'équation :

$$\text{Simpson} = 1 - \frac{\sum_{i=1}^S ni * (ni - 1)}{N * (N - 1)}$$

Avec ni : nombre de séquences correspondant à la i<sup>ème</sup> UTO, S : nombre d'UTO dans l'échantillon, N : le nombre total de séquences prises en compte pour l'analyse (après traitement).

Cet indice est une valeur entre 0 et 1 et correspond à la probabilité que 2 souches prélevées au hasard dans l'échantillon soient différentes. Aussi, plus la valeur de l'indice est élevée (se rapproche de 100%) et plus la diversité microbienne de l'échantillon est grande.



Chapitre 3 :  
Performances  
électrochimiques de  
bioanodes formées à  
partir de différents  
types de déchets



Les objectifs de ce chapitre, décrits dans la première section (3.1), sont de tester différents déchets pour servir de matière organique et de sources de microorganismes électroactifs (EA) à l'anode. Après quelques tests préliminaires, présentés dans la section 3.2, le manque de reproductibilité a été pointé du doigt comme étant un problème majeur pour exploiter les résultats des expériences réalisées avec les effluents dit « réels » (en opposition au milieu synthétique contrôlé préparé au laboratoire avec l'acétate comme substrat carboné). Le travail s'est alors orienté vers la mise en place d'une méthode pour améliorer d'une part la reproductibilité des expériences et d'autre part pour augmenter les densités de courant obtenues. La méthode mise en œuvre et les résultats associés sont présentés dans la section 3.3. Cette stratégie, mise au point en utilisant un effluent synthétique, a été ensuite implémentée en conditions réelles. Le passage en conditions réelles a fait l'objet de la publication insérée dans la section 3.4. Des analyses de populations microbiennes non incluses dans la publication sont également ajoutées. Finalement, la vitesse de traitement des biodéchets a été évaluée et discutée dans la section 3.5.

## **1 Objectifs et description des déchets mis en oeuvre**

Technologiquement, l'hypothèse de travail du projet BIORARE est basée sur l'implantation de la technologie électro-microbienne (TEM) couplée à une unité existante de digestion anaérobie pour :

- dévier une fraction de déchets hydrolysés vers le compartiment anodique de la TEM pour servir de source d'électrons
- tirer parti de la disponibilité en dioxyde de carbone renouvelable dérivé du procédé de digestion anaérobie pour alimenter le compartiment cathodique de la TEM
- avoir un complément de puissance sous forme d'énergie renouvelable, grâce à la chaleur et l'électricité générés par la valorisation du biogaz

L'une des tâches du projet, pilotée par le LGC, est d'investiguer différents types de déchets en tant qu'inoculum et / ou source de matière organique oxydable à l'anode de la TEM et d'évaluer alors les performances électrochimiques des biofilms formés à partir de ces déchets. Plusieurs types de déchets ont été sélectionnés par le consortium du projet Biorare :

- (1) **Des déchets issus de la filière du traitement des eaux usées urbaines**, c'est-à-dire des résidus d'assainissement collectés dans les stations d'épuration (STEP), comme les boues primaires ou les boues secondaires. En 2010, le gisement de boues produites par les STEP urbaines avoisinait 1,1 millions de tonnes de matières sèches. Ce tonnage est voué à augmenter puisque les boues sont le résultat de l'amélioration de la dépollution des eaux usées avant leur rejet dans la nature. Il existe 3 filières principales d'élimination des boues de STEP en France qui sont l'épandage, la mise en centre de stockage et l'incinération.
- (2) **Des déchets organiques solides (ou biodéchets) issus de la filière des déchets ménagers (déchets de cuisine principalement)**. En France, les biodéchets ménagers représentent 22 millions de tonnes (données ADEME en 2013) et les producteurs de biodéchets doivent respecter les nouvelles obligations de tri et de valorisation organique des biodéchets instaurées par la loi du 12 juillet 2010, dite « loi Grenelle 2 ». Trois filières sont autorisées pour la



valorisation des biodéchets : méthanisation, compostage ou épandage (sachant que l'épandage concerne principalement les industries agroalimentaires produisant des biodéchets d'origine végétale et que les conditions administratives à satisfaire sont contraignantes).

Concrètement, les déchets testés au cours de ces travaux de thèse sont les suivants :

- Des boues primaires prélevées à la station d'épuration d'Evry (91) fournies par le partenaire Suez-Environnement. Ces boues ont été épaissies et hydrolysées (7 jours à 15 °C) pour augmenter la fraction de matière organique soluble, avant leur utilisation en réacteur bioélectrochimique.
- Des boues biologiques épaissies par flottation prélevées à la station d'Evry (91) et hydrolysées (7 jours à 15°C) fournies par le partenaire Suez-Environnement.
- Un biodéchet reconstitué, dont la composition initiale ainsi que le protocole de préparation (cf Chapitre 2) nous a été fournie par l'IRSTEA d'Antony (équipe HBAN) qui pilote le projet BIORARE. Le biodéchet n'est pas utilisé en l'état. Il subit une étape d'hydrolyse pendant 5 jours à 30°C pour maximiser la fraction de matière organique soluble. A l'issue de l'hydrolyse, les matières solides sont éliminées et seule la partie liquide est utilisée pour alimenter les réacteurs électrochimiques.
- Nous avons également utilisé des eaux usées brutes dégrillées, prélevées en entrée de station d'épuration (SICOVAL, Castanet-Tolosan, 31). Les charges moyennes en DCO de ces effluents aqueux variaient entre 270 et 500 mg/L, en fonction de la saison et des précipitations (période 06/2013 – 10/2015). Ces effluents étant faiblement chargés, ils sont mis en œuvre avec des ajouts de matières organiques provenant d'autres sources et servent alors de milieu de dilution.
- Le dernier type d'effluent mis en œuvre est de la boue prélevée directement dans le bassin aéré de la station d'épuration de Castanet-Tolosan. Ce type de boue, riche en microorganismes catalyseurs de l'épuration dans la station, est appelé boue activée et est utilisé uniquement en tant qu'inoculum pour certains de nos essais.

Le Tableau 6 donne les caractéristiques des déchets mentionnés.

**Tableau 6 : Caractéristiques principales des déchets mis en œuvre au cours de ce travail de thèse. DCO : Demande Chimique en oxygène ; MES : Matières en Suspension ; AGV : Acides gras volatils.**

	pH	Conductivité (mS/cm)	DCO soluble (mgO <sub>2</sub> /L)	MES (g/L)	AGV (mg/L)	Acétate (mg/L)
Boues primaires épaissies	5.2	8.0	4390	24.9	2820	1800
Boues biologiques épaissies	7.5	7.8	1630	38.3	800	540
Biodéchets reconstitués	3.4	6.3	42600	100	5700	375
Eaux usées dégrillées	7.8	1.2	390	0.24	n.d	n.d
Boues activées	7	n.d	n.d	2.7	n.d	n.d

## 2 Tests préliminaires avec les différents déchets

Des tests préliminaires avec les boues primaires, les boues biologiques et les biodéchets ont été réalisés en réacteur à double compartiments (Dispositif décrit au Chapitre 2 –Figure 10) en amont de ce travail de thèse par Mickaël Rimboud, post-doctorant au LGC sur le projet BIORARE pendant la période 2012-2013. L'électrode de travail utilisée (anode) était une électrode de 2 cm<sup>2</sup> en tissu de carbone. La contre-électrode était une grille de platine et la référence une ECS. L'électrode de travail était polarisée à un potentiel de -0.2 V/ECS (Commault et al., 2013; Pocaznoi et al., 2012b). La séparation des compartiments anodique et cathodique était réalisée grâce à une membrane échangeuse d'anions. Ce choix était motivé par des résultats de deux études sur des procédés bioélectrochimiques, l'une en pile microbienne (Li et al., 2011) et l'autre en cellule d'électrolyse microbienne (Sleutels et al., 2009b), qui indiquent de meilleures densités de courant pour les systèmes expérimentaux utilisant une membrane échangeuse d'anions plutôt qu'une membrane échangeuse de cations. Dans ces deux publications, le milieu réactionnel est un milieu synthétique préparé à partir d'une solution tamponnée (tampon phosphate ou tampon carbonate), très majoritairement chargée en anions. La conductivité à travers les membranes anioniques est assurée en majorité par les espèces anioniques présentes dans les solutions tampons (phosphates ou carbonates) dont la concentration est dépendante du pH du milieu réactionnel.

On peut s'interroger sur la pertinence d'utiliser une telle membrane échangeuse d'anions à cause de la possible mobilité de l'anion acétate à travers la membrane échangeuse d'anions. L'acétate présent initialement dans le déchet ou apporté comme combustible exogène pour les microorganismes électroactifs doit rester confiné dans le compartiment anodique. Il conviendrait de vérifier expérimentalement que l'anion acétate ne transfère pas dans le catholyte pour ces systèmes. Les résultats préliminaires au travail de thèse sont regroupés dans le Tableau 7.

**Tableau 7 : Bilan des essais préliminaires à la thèse dans un bioréacteur électrochimique à double compartiments. Le compartiment anodique contient 500 mL du déchet à tester et une anode de 2 cm<sup>2</sup> en tissu de carbone. Le compartiment cathodique de 500 mL est rempli d'une solution de phosphate 0.25 M et est équipé d'une électrode auxiliaire de platine. L'anode est polarisée à -0.2V vs ECS. Les réacteurs sont disposés dans une étuve thermostatée à 40°C. Chaque expérience est au minimum dupliquée.**

Type de déchets	Co-Inoculum	Réplicats	Potentiel (V vs. SCE)	Résultats (A/m <sup>2</sup> )
Boues primaires épaissies	non	4	-0.2 V	J < 0.1
Boues biologiques épaissies	non	6	-0.2 V	1.4 < J < 10
Biofilm formé dans boues bio puis transfert dans boues primaires	non	2	-0.2 V	J < 0.1
Biodéchets	non	3	-0.2 V	J < 0.1
Biodéchets	Boues Biologiques	2*4	-0.2 V	J < 1

Les boues primaires ont été rapidement écartées du champ du projet suite aux travaux de Mickaël Rimboud car elles n'ont pas permis d'obtenir du courant, même à partir d'un biofilm déjà formé et produisant jusqu'à  $7 \text{ A/m}^2$  dans des boues biologiques. L'hypothèse qui a été formulée pour expliquer l'absence de la production de courant dans les boues primaires concerne le pH acide (autour de 5), qui inhibe l'activité microbienne. Même après une neutralisation du pH avec de l'hydroxyde de sodium, les boues primaires retrouvent un pH acide autour de 5 en quelques jours. Il est probable également que les microorganismes développés à pH 5 soient des bactéries hydrolytiques et acidogènes qui transforment la matière organique par fermentation et respiration anaérobie sans avoir besoin de l'anode (pas d'électroactivité). Les AGVs qui s'accumulent peuvent avoir un effet inhibiteur sur les bactéries susceptibles de dégrader l'acétate à l'anode (Kiely et al., 2011). Le phénomène observé se rapprocherait alors d'une acidose, dysfonctionnement fréquent dans les digesteurs anaérobies, qui est une intoxication aux AGVs accumulés.

L'utilisation de biodéchets utilisés bruts n'a pas permis d'obtenir de courant non plus, à cause du même phénomène d'inhibition par le pH et les AGVs (concentration supérieure à  $5 \text{ g/L}$  d'AGVs). De plus, le pH inférieur à 4 favorise la forme protonée des acides gras volatils (pKa de l'acétate, butyrate et propionate compris entre 3.2 et 4) qui est connue pour inhiber les métabolismes microbiens. Les essais réalisés avec une neutralisation du pH ont permis d'obtenir un maximum de  $1 \text{ A/m}^2$ , lorsqu'un co-inoculum de boues était ajouté. Ce résultat est également mis en évidence par Li et al. (2013) qui utilise du lixiviat de déchets alimentaires et obtient ses meilleures performances avec l'addition de boues anaérobies en co-inoculum (ratio en DCO 1:10), qui permet l'enrichissement du biofilm en *Clostridium sp.*, *Bacteroides sp.*, *Geobacter sp.* Pour nos essais, la densité de courant a diminué rapidement de  $1 \text{ A/m}^2$  pour se stabiliser autour de  $0.4 \text{ A/m}^2$ , ce qui nécessite des améliorations.

En revanche, il a été montré que les boues biologiques étaient directement adaptées pour une utilisation en tant que substrat et sources de microorganismes électroactifs à l'anode avec des performances atteignant jusqu'à  $10 \text{ A/m}^2$ . Dans la bibliographie, en conditions de laboratoire optimales, c'est-à-dire en milieu synthétique tamponné contenant l'ensemble des micronutriments et vitamines nécessaires et avec l'ajout d'acétate comme substrat, les performances sont plus élevées de  $30 \text{ A/m}^2$  sur électrode 2D (Chen et al., 2011; He et al., 2011), et jusqu'à  $80 \text{ A/m}^2$  avec de la mousse d'acier (Ketep et al., 2014) ou encore  $390 \text{ A/m}^2$  avec une électrode innovante fabriquée avec 6 couches de cartons ondulés carbonisés (S. Chen et al., 2012b). Mais notons que les densités de courant maximales obtenues avec l'utilisation d'un effluent brut à l'anode restent bien plus modestes :  $2 \text{ A/m}^2$  avec des eaux usées de brasserie (Feng et al., 2008),  $3 \text{ A/m}^2$  avec des eaux usées de chocolaterie (Patil et al., 2009) et de 4 à  $6 \text{ A/m}^2$  avec des effluents de papeteries (Ketep et al., 2013). Ainsi les performances de  $10 \text{ A/m}^2$  obtenues à partir des boues biologiques représentent un excellent résultat pour des effluents bruts. Cependant, les résultats obtenus n'étaient que très peu reproductibles. En effet, sur un total de 6 expériences, les densités de courant maximales obtenues varient de  $1.4$  à  $10 \text{ A/m}^2$ .

### 3 Mise au point d'une méthode pour améliorer la reproductibilité et les performances anodiques

Pour améliorer les performances ainsi que la reproductibilité entre essais, un travail en milieu synthétique dit « propre », inoculé à partir de boues a été mené. L'utilisation de milieux contrôlés permet de ne pas introduire de variabilité liée au milieu et de mettre les microorganismes dans les conditions optimales de croissance. L'utilisation des boues comme inoculum vient de la filière Biorare elle-même, car elle s'inscrit dans le traitement des déchets. De plus, la boue biologique est source d'une grande diversité de microorganismes (Wagner et al., 2002), dont certains peuvent se révéler électroactifs (Mei et al., 2015).

Pour enrichir davantage le biofilm en microorganismes électroactifs (EA), les protocoles issus de la bibliographie tirent parti de biofilms déjà formés, qui sont collectés par grattage de l'électrode pour servir d'inocula plus performants (Kim et al., 2005; Rabaey et al., 2003). Cette méthode de sélection permet d'augmenter la fraction en microorganismes électroactifs, mais la procédure est assez délicate au niveau opérationnel. Liu et al. (2008) ont proposés une alternative qui consiste également à réutiliser un biofilm EA déjà formé, dit « primaire » comme unique source d'inoculum pour former un biofilm dit « secondaire », mais de manière simplifiée. Nous avons adapté cette méthode en réacteur simple compartiment avec un système à 3 électrodes (Dispositif décrit au Chapitre 2). L'utilisation de réacteurs « simple compartiment » permet de s'affranchir des contraintes liées à la présence d'une membrane de séparation. Le dispositif à 3 électrodes a été choisi comme outil d'électroanalyse pour caractériser précisément les phénomènes électrochimiques de la bioanode. Ce dispositif permet de contrôler parfaitement le potentiel imposé à l'électrode de travail et de s'assurer que la cinétique de l'électrode de travail est bien la seule étape limitant la vitesse globale du système expérimental (Rimboud et al., 2014).

La méthode en 3 étapes (Figure 22) est la suivante :

- formation d'une première bioanode sur  $6 \text{ cm}^2$  de tissu de carbone polarisé à  $+0.15 \text{ V/ECS}$  à partir d'un inoculum environnemental de boues biologiques. Pour cette première étape, le milieu (milieu S1, cf Chapitre 2) est complété avec de l'acétate  $10 \text{ mM}$  et est renouvelé 3 ou 4 fois (dès que le courant diminue à zéro). Lors de chaque renouvellement, l'inoculum est également ajouté ( $3,3 \text{ \% v/v}$ ).
- la bioanode primaire colonisée sert ensuite d'inoculum pour une électrode vierge en tissu de carbone ( $6 \text{ cm}^2$ ) polarisée au même potentiel et placée dans le réacteur bioélectrochimique à proximité de la première qui reste polarisée. Le milieu avec le substrat est renouvelé une dernière fois mais sans aucun ajout de boues supplémentaires.
- la troisième étape commence lorsque la bioanode primaire est retirée du réacteur. La bioanode secondaire peut alors être étudiée seule.

Deux types de boues biologiques ont été testés pour servir d'inoculum ( $3.3\%$  en milieu S1) : la boue biologique épaissie hydrolysée d'Evry (91) fournie par Suez-Environnement ou la boue activée prélevée à Castanet-Tolosan.

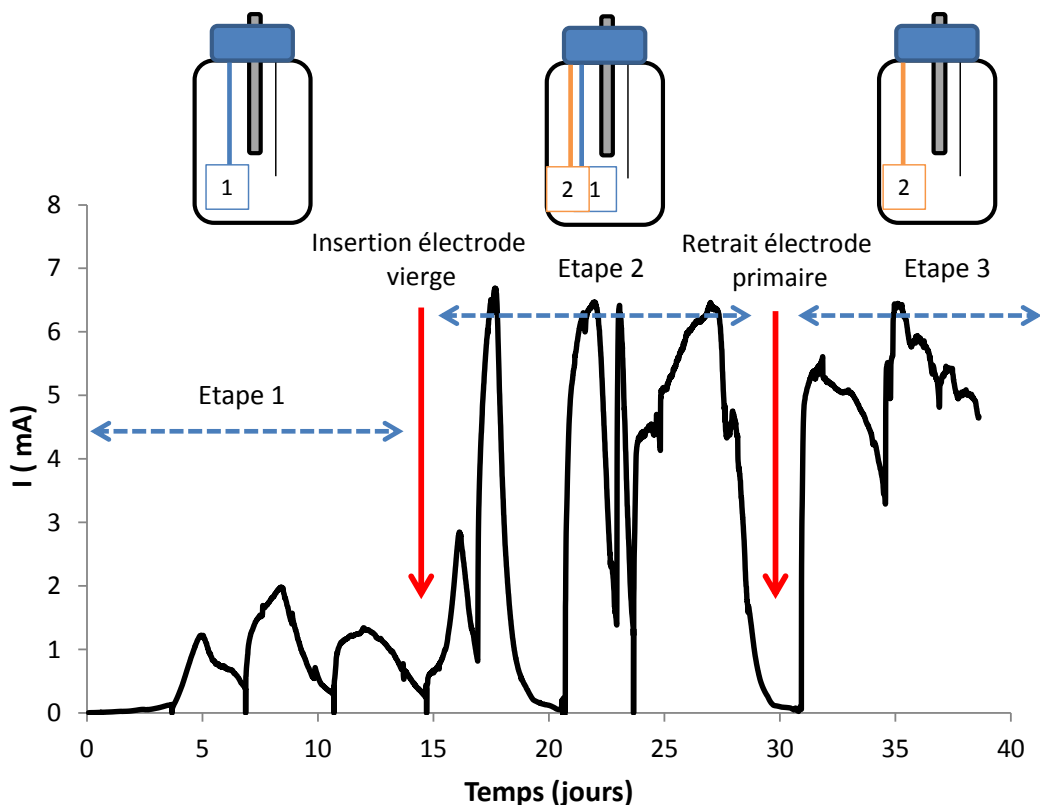


Figure 22 : Représentation de la méthode en 3 étapes, adaptées de Liu et al., (2008) pour la formation rapide de biofilms électroactifs performants.

### 3.1 Formation de bioanodes à partir d'un inoculum de boues biologiques épaissies hydrolysées

Les premiers tests ont été menés en milieu synthétique contrôlé (Milieu S1, (Liu et al., 2008)) avec 10 mM d'acétate et inoculé avec 3.3% v/v de boues biologiques épaissies hydrolysées. Ces premiers tests réalisés en duplicat n'ont pas permis d'obtenir de courant, sur un temps d'expérience de plus de 10 jours et après 2 renouvellements complets de milieu, substrat et inoculum (étape 1 de la méthode). Ces essais ont donc été stoppés. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer les résultats :

- la boue biologique hydrolysée n'est peut-être pas une source adéquate de microorganismes électroactifs. L'étape d'hydrolyse induit certainement un enrichissement de la population microbienne en bactéries hydrolytiques et fermentaires qui n'ont peut-être aucune propriété électroactive.
- l'inoculum choisi est potentiellement riche en Archaea méthanogènes. L'acétate (10 mM), qui est dégradé en 3 jours, est peut-être converti en méthane (méthanogénèse acétoclastique).
- pour être conservé et mis en œuvre, l'inoculum a subi ont provoqué des cycles de congélation/décongélation, qui ont certainement réduit la quantité de microorganismes revivifiables.
- la quantité d'inoculum choisie (3.3% v/v) pourrait donc être trop faible pour permettre le développement du biofilm à l'anode. Ce choix de 3.3% correspond à 20 mL de boues ajoutés au

580 mL de milieu. Ce sont les mêmes proportions que celles utilisées par Liu et al., (2008). Par contre, cette équipe utilise de la boue activée et non de la boue biologique épaissie hydrolysée.

### 3.2 Formation de bioanodes à partir d'un inoculum de boues activées

Il est donc décidé de changer d'inoculum en prenant de la boue activée. Il a déjà été montré que ce type d'inoculum était une excellente source de microorganismes électroactifs (Villano et al., 2012). Dans les bassins aérés, la boue activée oxyde les molécules organiques en utilisant l'oxygène comme accepteur d'électrons. Les boues activées sont organisées en floc. Au sein du floc, il y a des hétérogénéités de population et des hétérogénéités métaboliques liées aux conditions physico-chimiques. Aussi, en l'absence d'oxygène, parmi l'importante diversité microbienne, il peut être supposé que certaines bactéries seront capables de s'adapter et d'utiliser l'électrode comme accepteur d'électrons.

Les électrodes de travail utilisées sont en tissu de carbone avec une surface géométrique de  $6 \text{ cm}^2$  ( $2 \times 3 \text{ cm}$ ), et la méthode employée est celle en 3 étapes décrite précédemment.

Les chronoampérométries obtenues pour 2 séries de 2 duplicats dans les mêmes conditions (R1-R2 de juin 2013 et R3-R4 de mai 2014) sont présentées dans la Figure 23.

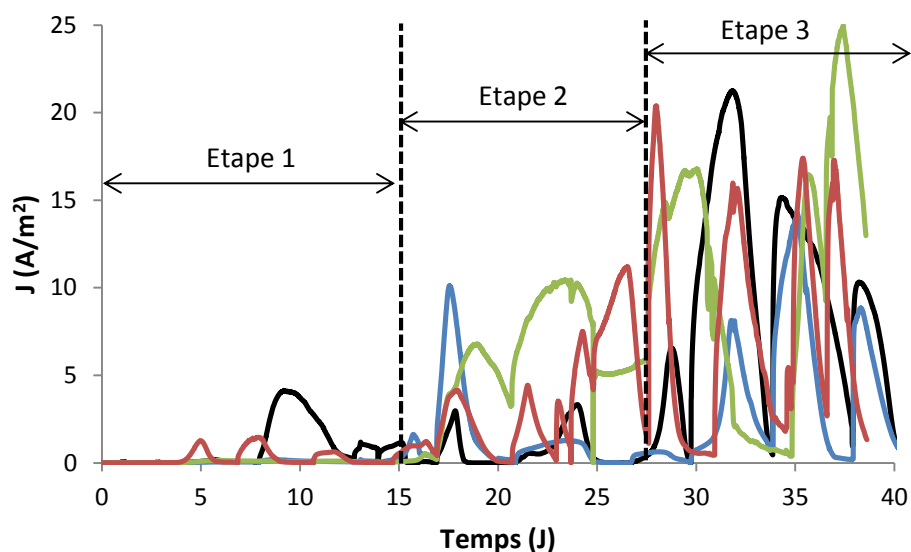


Figure 23 : Evolution de la densité de courant anodique pour 4 réacteurs électrochimiques (placés à  $27^\circ\text{C}$ ), contenant 600 mL de milieu synthétique S1, alimenté avec 10 mM d'acétate et inoculés avec 20 mL de boues activées. R1 et R2 sont représentés en rouge et vert ; R3 et R4 sont en bleu et noir. La bioanode est formée avec la méthode en 3 étapes (Une bioanode primaire colonisée à l'étape 1 sert d'inoculum pour former une bioanode secondaire). Pour les étapes 1 et 3, la surface d'électrode est  $6 \text{ cm}^2$  tandis qu'elle est de  $12 \text{ cm}^2$  pour l'étape 2.

En milieu synthétique avec un inoculum de type boues activées et un substrat acétate (ajouts de 10 mM), des densités de courant reproductibles de  $15\text{-}20 \text{ A/m}^2$  ont été obtenues avec la bioanode secondaire. Les densités de courant maximales ( $J_{\text{max}}$ ) obtenues pour l'étape 1 sont faibles et surtout elles sont très peu reproductibles, de  $0.1$  à  $4.1 \text{ A/m}^2$ . Toutefois la méthode permet de corriger le manque de reproductibilité des densités de courant maximales ( $J_{\text{max}}$ ) puisque la moyenne des densités de

courant est de  $19.3 \pm 3.7 \text{ A/m}^2$  au cours de l'étape 3. Ainsi pour l'étape 1, plus de 100% de fluctuations étaient obtenus sur les  $J_{\text{max}}$  ( $1.5 \pm 1.8 \text{ A/m}^2$ ) en 15 jours d'expérience, tandis que ces fluctuations sont inférieures à 20% sur 10 jours d'expérience lors de l'étape 3.

Dans la bibliographie, l'utilisation de cette méthode a permis d'augmenter les densités de courant d'un facteur 2 (Baudler et al., 2014; Liu et al., 2008). Dans notre cas, le facteur d'amélioration entre anode primaire et anode secondaire est compris entre 4.7 et 193. Leur facteur d'amélioration est plus faible car leurs biofilms électroactifs primaires présentent des densités de courants largement plus élevées que les nôtres (Figure 24). On peut supposer que leur inoculum est plus adapté pour former directement un biofilm électroactif. Une autre différence réside au niveau du ratio entre surface d'électrode et volume de réacteur. Ce ratio est de  $76.7 \text{ cm}^2/\text{L}$  dans leur cas alors qu'il n'est que de  $10 \text{ cm}^2/\text{L}$  dans notre cas. Pour un même taux d'inoculum, ils augmentent ainsi la probabilité qu'un biofilm EA se forme sur une partie ou sur toute l'électrode dès la formation de la bioanode primaire.

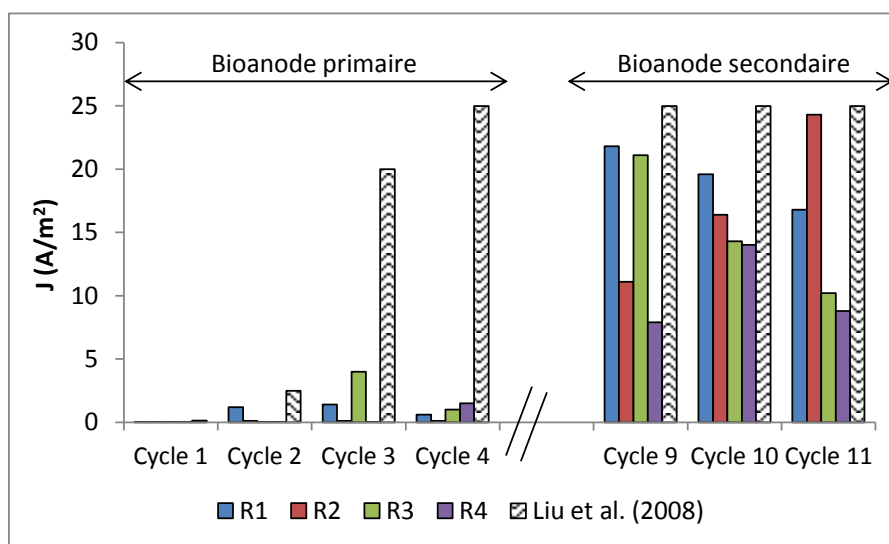


Figure 24 : Densités de courant maximales obtenues à chaque cycle (ajout d'acétate, 10 mM) pour les 4 réacteurs lors des étapes 1 et 3 de la méthode de sélection adaptée au LGC à partir des travaux de Liu et al (2008), dont les résultats sont également indiqués pour comparaison.

Les performances catalytiques de nos biofilms primaires sont bien inférieures à ceux de Liu et al. (2008), mais les résultats obtenus avec les biofilms secondaires sont du même ordre de grandeur.

Dans nos expérimentations, pour chaque cycle, d'une durée moyenne de 3 jours, la vitesse de consommation d'acétate reste constante entre les étapes 1 et 3 (env 3.2 mM/jour) et c'est la densité de courant qui est nettement améliorée. Par conséquent, les rendements faradiques obtenus avec les bioanodes primaires ne dépassent pas 5 à 10%, et augmentent jusqu'à 40-70% avec les bioanodes secondaires.

La consommation d'acétate dans l'étape 1 est probablement majoritairement liée à la présence d'oxygène dans les réacteurs, accepteur d'électrons alternatif permettant l'oxydation du substrat. La purge initiale de 15 minutes à l'azote lors du renouvellement de milieu ne suffit pas pour maintenir l'anaérobiose dans les réacteurs. De plus, à la différence de l'étape 3, des ajouts d'inoculum sont

effectués dans l'étape 1, ce qui ajoute des microorganismes planctoniques et des nutriments susceptibles de servir d'accepteurs d'électrons (nitrates, sulfates).

Les voltammétries cycliques effectuées en absence d'acétate (conditions dites « non turn-over ») pour les bioanodes primaires (fin du cycle 4) et les bioanodes secondaires (fin du cycle 10) sont présentées dans la Figure 25.

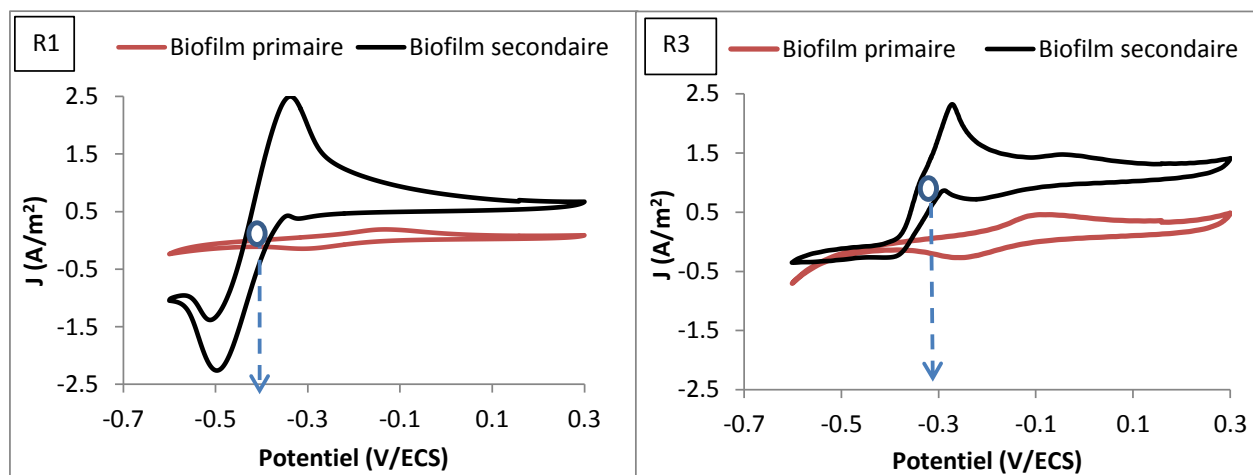


Figure 25 : Voltammétries cycliques (1 mV/sec) enregistrées sur les biofilms primaires (courbe rouge) et secondaires (courbe noire) des réacteurs R1 (juin 2013) et R3 (mai 2014) en milieu synthétique en l'absence d'acétate (conditions « non turn-over »). La flèche pointillée représente le potentiel auquel se situe l'oxydation du système redox sur l'électrode.

Les CVs effectuées sur les bioanodes primaires (pH = 7.2) ne montrent qu'un faible signal redox du biofilm. Par contre, la présence d'un système oxydo-réducteur est nettement visible pour les biofilms secondaires (pH = 7.8), en accord avec les performances catalytiques relevées en chronoampérométrie, qui sont nettement supérieures avec la bioanode secondaire. Le pic correspondant à l'oxydation du système redox du biofilm se situe à un potentiel de -0.4 V/ECS pour R1 et vers -0.3 V/ECS pour R3. Cette différence pour le potentiel d'oxydo-réduction peut être liée à une différence de pH dans le biofilm formé. Les pH mesurés dans le milieu sont identiques lors de la CV sur le biofilm secondaire (7.5-7.8) mais une différence reste possible localement au sein du biofilm en surface de l'électrode. Au vu du système redox envisagé, une différence de 100 mV représenterait une différence de 1.5 unités pH entre les biofilms R1 et R3. La solution serait plus acide au sein du biofilm R3, en surface de l'électrode. Pour R1, il y a une réversibilité importante du système redox avec un pic en réduction à -0.5V/ECS, qui peut-être lié à la présence d'oxygène dans le milieu.

Dans la bibliographie, il est précisé qu'un des modes de transfert d'électrons entre la bactérie *Geobacter sulfurreducens* et un accepteur solide d'électrons est effectué via des protéines membranaires, des cytochromes de type c, comme OmcB, OmcE et OmcS (Fricke et al., 2008). Pour OmcB, un potentiel de -391 mV/ECS a été reporté à pH 7.5 (Magnuson et al., 2001), ce qui est proche des potentiels déterminés dans nos essais (-300 et -400 mV/ECS). En culture mixte, un grand nombre de facteurs influence les types de systèmes redox impliqués dans le transfert d'électrons : le potentiel appliqué est par exemple un paramètre important pour les bioanodes formées en chronoampérométrie (Aelterman et al., 2008). La nature du substrat a également une influence sur les systèmes exprimés pour le transfert d'électrons.



Kaur et al. (2013) ont détecté différents systèmes redox avec différents AGVs. L'acétate et le butyrate conduisent aux mêmes formes de CV avec un unique système redox bien défini, tandis que le propionate stimule d'autres systèmes redox (Rimboud et al., 2015).

Dans nos essais, les voltammogrammes des biofilms secondaires ont une allure classique de biofilms formés sur acétate et présentant une activité électroactive, avec un transfert d'électrons qui pourrait être liés aux cytochromes.

La sélection des bactéries électroactives se révèle efficace avec la méthode employée et permet d'obtenir des bioanodes d'oxydation d'acétate à partir d'un inoculum de boues activées. Cette méthode est simple et la bioanode formée catalyse l'oxydation de l'acétate dès -0,4V/ECS (Figure 26). Ce type de cinétique est classiquement obtenu pour l'oxydation de l'acétate. Le plateau de courant n'est pas toujours atteint même à +0.3 V/ECS, en raison de possibles chutes ohmiques liées au dispositif (distance bioanode – référence) et de la faible conductivité des milieux utilisés. Pour notre étude en milieu synthétique, la conductivité initiale du milieu est autour de 6.8 mS/cm, et les courbes atteignent leur courant maximal entre -0.1V/ECS et +0.1V/ECS selon les expériences.

Pour ce type de dispositif, il convient donc de former l'anode en chronoampérométrie à un potentiel minimal de +0.1 V/ECS.

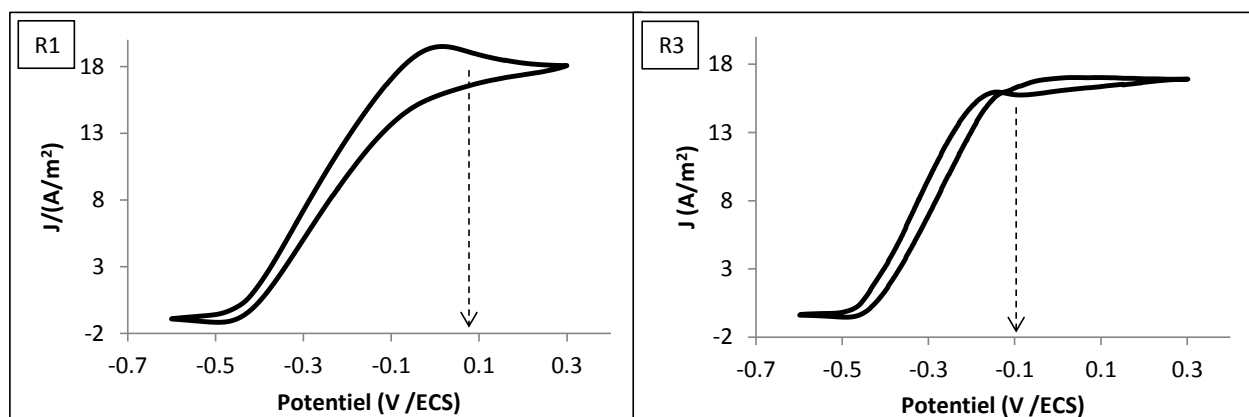


Figure 26 : Voltammétrie cyclique (1 mV/sec) enregistrée pour un biofilm secondaire formé en milieu synthétique en présence d'acétate (conditions dites « turn-over »). Les flèches en pointillés indiquent le potentiel minimal pour lequel la bioanode atteint son maximum d'intensité. R1 et R3 sont des duplicats.

Dans le cadre du projet collaboratif Biorare, deux des électrodes primaires formées lors de l'étape 1 au LGC ont été envoyées au partenaire IRSTEA (Antony) pour servir d'inoculum. Il est intéressant de noter que la mise en œuvre de ces électrodes, envoyées sans précaution particulière (Envoi colis en tubes « Falcon » dans le milieu synthétique, sans réfrigération et réception dans les 3 jours), a permis d'obtenir des bioanodes secondaires performantes atteignant des densités de courant de l'ordre de 15-20 A/m<sup>2</sup> dans un milieu BMP (Biochemical Methane Potential, NF EN ISO 11734) et une configuration de réacteurs bioélectrochimiques à double compartiments.

De plus, la méthode en trois étapes, appelée méthode de repiquage à l'IRSTEA, apparaît comme appropriée pour pallier le vieillissement du biofilm. En effet, Bridier et al. (2015) ont montré que

l'introduction d'une surface vierge à coloniser permet une réorganisation du biofilm favorable au transfert d'électrons. En pratique, la procédure est très efficace pour maintenir les performances anodiques sur une période prolongée de plus de 50 jours dans un système électro-microbien alimenté en biodéchets.

La procédure a permis de répondre aux objectifs initiaux d'amélioration des performances ( $J_{max}$  autour de  $19 \text{ A/m}^2$ ), ainsi que de l'amélioration de la reproductibilité entre essais (fluctuations inférieures à 20% sur les  $J_{max}$  obtenus avec la bioanode secondaire).

La méthode est robuste, permet de s'affranchir de l'inoculum initial, de maintenir les performances sur une période prolongée et apparaît donc intéressante pour être adaptée à une application industrielle.

## **4 Passage des conditions modèles de laboratoire vers des conditions se rapprochant de celles des stations d'épuration**

### **4.1 Introduction**

Les tests préliminaires ont démontré les difficultés d'utilisation directe du biodéchet brut. Les densités de courant maximales restaient très faibles ( $<1 \text{ A/m}^2$ ) à cause de la concentration en matière organique trop élevée et du pH trop acide défavorable à la formation des bioanodes. Ce type de difficultés a déjà été rencontré avec des déchets agro-alimentaires concentrés en matière organique qui s'adsorbe sur les électrodes propres et interdit ensuite l'établissement du biofilm électroactif (Cercado-Quezada et al., 2010a). L'inhibition par des concentrations en matière organique trop importantes a également été notée pour de la matière organique issue d'effluents papetiers pour des seuils de DCO de l'ordre de  $3 \text{ g/L}$  (Ketep et al., 2013). Il paraît donc nécessaire de diluer les biodéchets.

Le milieu de dilution, souvent synthétique ou constitué d'eau potable (Choi et al., 2010; Li et al., 2013; Oh and Logan, 2005; Goud et al., 2011) pourrait être remplacé par un effluent non traité disponible en station d'épuration (eaux usées entrantes). A ce jour, une seule publication (Pant et al., 2013) a proposé cette option et nous avons souhaité la mettre en oeuvre.

Ainsi, pour se rapprocher des conditions réelles de station d'épuration, les deux étapes distinctes de l'étude ont été définies comme suit :

- appliquer la méthode pour la formation de bioanodes alimentées en acétate ( $10 \text{ mM}$ ) en comparant les performances obtenues dans le milieu synthétique S1 ou dans les eaux usées.
- remplacer le substrat modèle (acétate) par les biodéchets reconstitués à mêmes concentrations en DCO soluble ( $0.6\text{-}0.8 \text{ g/L}$ ).

La comparaison des performances catalytiques des biofilms formés, ainsi que leur observation microscopique et l'analyse des communautés microbiennes font l'objet de l'article intitulé « Comparison of synthetic medium and wastewater used as dilution medium to design scalable microbial anodes: Application to food waste treatment » publié dans Bioresource Technology.

#### 4.2 Publication 1 : Comparaison d'un milieu de dilution synthétique avec un milieu de dilution constitué d'eaux usées pour la formation de bioanodes : application au traitement de biodéchets.

Les principaux résultats présentés dans cet article sont les suivants :

- Le milieu de dilution synthétique peut être remplacé par des eaux usées dans le compartiment anodique et 50% des performances catalytiques du biofilm sont alors conservées pendant un minimum de 10 jours (3 cycles d'ajouts successifs de biodéchets).
- Les baisses de performances sont attribuées à la structure et à l'équipement redox des biofilms formés.
- La procédure utilisée conduit à un enrichissement en microorganismes de la famille des *Geobacteraceae*.
- Les densités de courant maximales obtenues sont corrélées au pourcentage de microorganismes de la famille des *Geobacteraceae* dans le biofilm.
- L'utilisation de biodéchet a été rendu possible à l'anode en les diluant dans des eaux usées (max 1.2 gDCO/L) et avec un inoculum de type boues activées (3-5% v/v).
- La bioanode formée avec une alimentation en biodéchet atteint une densité de courant maximale de 7 A/m<sup>2</sup>, ce qui représente un progrès d'un facteur 4 par rapport aux meilleures études utilisant également des biodéchets à l'anode (Goud et al., 2011).

Les « supplementary data » mentionnées dans l'article sont insérées en Annexe 1.

## Comparison of synthetic medium and wastewater used as dilution medium to design scalable microbial anodes: application to food waste treatment.

Elise Blanchet, Elie Desmond, Benjamin Erable, Arnaud Bridier, Théodore Bouchez and Alain Bergel

Received 5/01/15, Received in revised form 13/02/15, Accepted 24/02/2015, Published 2/03/2015.  
*Bioresource Technology* 185 (2015) 106-115

### Abstract

The objective was to replace synthetic medium by wastewater as a strategy to design low-cost scalable bioanodes. The addition of activated sludge was necessary to form primary bioanodes that were then used as the inoculum to form the secondary bioanodes. Bioanodes formed in synthetic medium with acetate 10 mM provided current densities of  $21.9 \pm 2.1 \text{ A/m}^2$ , while bioanodes formed in wastewater gave  $10.3 \pm 0.1 \text{ A/m}^2$ . The difference was explained in terms of biofilm structure, electrochemical kinetics and redox charge content of the biofilms. In both media, current densities were straightforwardly correlated with the biofilm enrichment in *Geobacteraceae* but, inside this family, *Geobacter sulfurreducens* and an uncultured *Geobacter sp.* were dominant in the synthetic medium, while growth of another *Geobacter sp.* was favoured in wastewater. Finally, the primary/secondary procedure succeeded in designing bioanodes to treat food wastes by using wastewater as dilution medium, with current densities of  $7 \pm 1.1 \text{ A/m}^2$ .

**Keywords:** Bioanode, bioelectrochemical system, *Geobacteraceae*, wastewater, food waste.

### 1. Introduction

The treatment of the domestic and industrial wastes that are produced by developed countries consumes huge amounts of energy. Abating the organic matter to a level that permits its disposal in natural environments generally involves aerobic processes, which consume considerable amounts of electrical energy for aeration (Miksch et al., 2013). Nowadays, much research focuses on extracting the chemical energy contained in so much wasted organic matter in order to treat it and, even better, to generate a positive energy balance. Microbial electrochemical technologies (METs) may be the tools that will make this dream a reality (Wang and Ren, 2013). They would offer the great advantages of abating organic matter in anaerobic conditions, thus saving the cost of aeration, and converting the chemical energy of organic compounds directly into electrical energy (microbial fuel cells), hydrogen (microbial electrolysis cells) or other services (microbial desalination cells, for example).

All these applications are based on the implementation of microbial bioanodes that use electrochemically active microorganisms able to oxidize the organic compounds and to transfer the electrons produced to the electrode material. Lab studies have had considerable successes in bioanode design by working in well-controlled conditions, in synthetic medium and with acetate as substrate (Rimboud et al., 2014). Current densities of  $5 \text{ A/m}^2$  have been obtained on graphite electrodes (Liu et al.,

2008) and even more with sophisticated electrode designs, e.g. 80 A/m<sup>2</sup> with stainless steel foam (Ketep et al., 2014) and up to 67 A/m<sup>2</sup> with layered corrugated carbon (Baudler et al., 2014).

A few bioanodes have also been successfully designed to treat real raw effluents (Pant et al., 2010) but current densities remain modest, for example 0.18 A/m<sup>2</sup> has been reported with urban wastewater (Rodrigo et al., 2007), 2 A/m<sup>2</sup> with brewery wastewater (Feng et al., 2008), 3 A/m<sup>2</sup> with chocolate industry wastewater (Patil et al., 2009), and 4 to 6 A/m<sup>2</sup> with paper mill effluent (Ketep et al., 2013). So far, the gap is large between the performance reached in synthetic media and that obtained in raw effluents.

Designing METs for the treatment of food wastes should be of great economic interest because food wastes are generated abundantly in concentrated form and need to be treated before disposal (Pant et al., 2013). In 2010, more than 34 million tons of food waste was generated in the United States, of which less than 3% was recovered and recycled, according to the U.S. Environmental Protection Agency (Li et al., 2013). Despite the high economic interest, studies that have investigated bioanodes able to treat food wastes remain rare (Table 1).

**Table 1: Studies using food wastes as a substrate to power microbial fuel cells or microbial electrolysis cells.**

Food waste type	sCOD (gO <sub>2</sub> /L)	Dilution medium	Inoculum	Bioanode type	Configuration	Performances (A/m <sup>2</sup> )	References
Food processing wastewater (Cereal)	8.9	Synthetic medium	Sludge	Toray carbon paper (22.5 cm <sup>2</sup> )	MFC	0.24	(Oh and Logan, 2005)
Food industry waste (Yoghurt waste)	N/A	Synthetic medium	Anaerobic sludge	Graphite felt (10 cm <sup>2</sup> )	MFC	0.4	(Cercado-Quezada et al., 2010a)
Canteen food waste	12	Tap water	Anaerobic sludge	Graphite plate (70 cm <sup>2</sup> )	MFC	1.6	(Goud et al., 2011)
Food waste from student's cafeteria	27.5	Synthetic medium	Anaerobic sludge	carbon felt (50 cm <sup>2</sup> )	MFC	0.45	(Choi et al., 2010)
Food waste leachate	12.7	deionized water	Anaerobic sludge	carbon felt (21 cm <sup>2</sup> )	MFC	0.1	(Li et al., 2013)
Fermented reconstituted food waste	13	domestic wastewater	Compost	carbon felt (10 cm <sup>2</sup> )	MFC	0.065	(Pant et al., 2013)
Food processing wastewater	1.8	No dilution	Acclimated biomass	Graphite fiber brushes	MEC	2	(Tenca et al., 2013)

Food wastes are generally high in soluble COD and consequently need to be diluted to be oxidized by bioanodes. For this purpose, synthetic medium, drinking water or deionized water has generally been used. To our knowledge, only one study (Tenca et al., 2013) has overcome the problem by using food processing water with a fairly low COD (1.8 g/L) that did not require dilution. If the objective is to treat

large quantities of wastes, it will not be possible to scale up large-sized METs that require huge amounts of phosphate or other buffer salts and the addition of micro-nutriments and vitamins. The cost would be too high, the release of salt would induce serious new environmental problems or require costly downstream separation and re-cycling processes. Using tap water would be less costly, but unfortunate in a world that should be increasing its efforts to preserve drinking water. (Pant et al., 2013) have proposed a clever solution to this critical issue by using domestic wastewater as a dilution medium. The current densities obtained were modest ( $65 \text{ mA/m}^2$ ) but the idea is surely interesting enough to deserve further investigation. Actually, if efficient bioanodes could be formed by diluting food wastes, or any other concentrated wastes, in wastewater, it would open up a cost-free method that could be easily scaled-up to large sized industrial METs.

The purpose of the present work was to help to define a scalable strategy for bioanode design by assessing the suitability of wastewater as a dilution medium. The work was based on the comparison of bioanodes designed in identical conditions in wastewater and in a synthetic medium. Bioanodes were formed in an optimal synthetic solution composed of phosphate buffer, macro-nutriments, trace minerals and vitamins, as commonly used in MET studies. In parallel, the same procedure was implemented in wastewater without any supplementation. The synthetic medium was inoculated with activated sludge and the necessity for the same inoculation with wastewater was discussed. In both cases, the bioanodes were formed in electroanalytical conditions under constant applied potential. The well-controlled electroanalytical conditions allowed the bioanode itself to be characterized by minimizing the interactions and rate-limiting steps that can occur in microbial fuel cells and microbial electrolysis cells (Rimboud et al., 2014). The design procedure consisted of, firstly, forming a primary bioanode that was then used to inoculate a secondary bioanode. This procedure has already been described in the literature and has led to secondary bioanodes displaying twice the current of the primary ones (Liu et al., 2008) and sustaining their performance over long periods (Baudler et al., 2014). This strategy designed in lab conditions with synthetic medium should be of great interest for real effluent because of its effectiveness and its capacity to be reproduced at large scale.

The bioanodes formed in synthetic medium and wastewater were compared by crossing electrochemical measurements, microscopy imaging and analysis of the microbial communities by 16S rRNA pyrosequencing. The comparison was performed with acetate as the substrate and the practical interest of the procedure was then checked with food wastes.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1. Electrochemical setup**

Sealed vessels (600 mL) served as electrochemical cells that hosted the microbial medium and 3 electrodes. The 3-electrode set-ups consisted of a carbon cloth working electrode of  $2 \times 3 \text{ cm}^2$  geometric surface area (Paxitech, Grenoble, France), a saturated calomel reference electrode (SCE, Radiometer Analytical, +0.24 V vs. SHE) and a  $2 \times 3 \text{ cm}^2$  platinum grid used as the auxiliary electrode. The anode and cathode were connected to the electrical circuit by a 12-cm-long, 1-mm-diameter platinum wire. The anode (working electrode) was located at around 10 cm from the auxiliary electrode and as close as

possible (around 0.5 cm) to the reference electrode. The working electrode was polarized at 0.15 V vs. SCE using a VSP potentiostat (Bio-Logic SA) interfacing with a computer (software EC-Lab) and the current was recorded every 10 minutes. Chronoamperometry was sometimes interrupted to perform cyclic voltammetry at low scan rate (1 mV/s) in the -0.6 to +0.3 V vs. SCE range.

The reactors were maintained at  $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  in a water bath and were initially purged with nitrogen for 15 minutes to remove oxygen. Substrate solutions in reactors were continuously lightly stirred (100 rpm).

## **2.2. Synthetic medium, activated sludge, wastewater and food wastes**

The synthetic medium contained (Liu et al., 2008) :  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (2.69 g/L),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (4.33 g/L), KCl (0.13 g/L) and 10 mL/L macronutrients ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  31 g/L ;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  10 g/L ;  $\text{CaCl}_2$  0.57 g/L). pH was adjusted to 7.0 and the solution was sterilized in an autoclave ( $121^{\circ}\text{C}$  for 20 minutes). Trace mineral mix (10mL/L, ATCC MD-TMS) and vitamin mix (10 mL/L, ATCC MD-VS) were added by filtration. Acetate (10 mM) was finally added as the substrate. Before inoculation, the medium was purged with nitrogen for 15 minutes. Acetate concentration was monitored by an enzymatic kit (K-ACETAK, Megazyme).

Activated sludge sampled in a wastewater treatment plant (Castanet-Tolosan, France) was used as the inoculum (3.3 % v/v) for the primary bioanode design. The chemical oxygen demand of the activated sludge was 4100  $\text{mgO}_2/\text{L}$ .

Wastewater was collected from the same wastewater treatment plant (Castanet-Tolosan, France). The average soluble COD was about 390  $\text{mg}/\text{L}$ , ammonium 48  $\text{mg}/\text{L}$ , nitrate concentration less than 0.5  $\text{mg}/\text{L}$  and sulfate 27  $\text{mg}/\text{L}$ . The average pH was 7.8.

Food wastes were prepared with common food components in a reproducible way to mimic the mean composition of food wastes from supermarkets and water was added to obtain a waste with 10% dry mass. The raw components were defrosted 24 hours before weighing. One kg of reconstituted biowaste was prepared with 81 g of potatoes, 34 g of tomatoes, 81 g of minced meat, 7 g of biscuit and 42g of milk powder. 756 mL of water was added and the components were ground and mixed together. This mixture was stored 5 days at  $30^{\circ}\text{C}$  in 1 L bottles for fermentation. During these 5 days, food waste fermented (i.e hydrolyses and acidogenesis steps) with its indigenous flora, mostly anaerobic. The food waste was then centrifuged and the supernatant sampled and frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$ . The final pH was 3.4 and soluble COD 42.6  $\text{gO}_2/\text{L}$ . The composition was analyzed using an HPLC giving (g COD/L): butyric acid 9.7, lactic acid 5.3, acetic acid 0.4, others (proteins, sugars, other organic acids, lipids) 27.2.

Addition of 10 mL of waste into the 600 mL reactors corresponded to 700  $\text{mg}/\text{L}$  COD, which was of the same order of magnitude as 10 mM acetate in term of COD.

COD was measured using kit LCK514 kit (Hach Lange, range of measurement 100-2000  $\text{gO}_2/\text{L}$ ). Volatile fatty acids composition was analyzed using an HPLC (Thermo Scientific, France) equipped with a Rezex ROA-Organic acid H+ (8%), 250\*4.6 mm phase-reverse column (Phenomenex, France) thermostated at  $30^{\circ}\text{C}$  and associated with a refractive Index detector in series with a UV detector. The elution was performed at 170  $\mu\text{L}/\text{min}$  with an aqueous solution of sulphuric acid 10 mM (pH 2.2). Before analysis,

samples were thawed, diluted 10 times in the eluent and filtered at 0.2  $\mu\text{m}$ . The column was calibrated with a mixture of methanoate, acetate, lactate, propionate and butyrate, in the analysis concentration range.

### **2.3. Bioanode formation**

Experiments were systematically carried out in duplicate. A total of 8 reactors were implemented to study four different conditions: synthetic medium with 10 mM acetate inoculated with fresh activated sludge in reactors R1 and R2; wastewater with 10 mM acetate inoculated with fresh activated sludge in R3 and R4; wastewater with 10 mM acetate without inoculum in R5 and R6; wastewater with reconstituted food waste inoculated with fresh activated sludge in R7 and R8.

The primary bioanodes were formed with four consecutive batches. Each batch corresponded to the replacement of the reactor solution with fresh solution. After four batches, a clean working electrode (same surface area as the primary) was immersed in each reactor. The electrodes were connected together and consequently polarized at the same potential (0.15 V vs. SCE). From this step onwards, activated sludge was no longer present in the solutions. The secondary bioanode was developed under semi-batch conditions, with either full replacement of the reactor solution or a simple substrate pulse into the reactors. The last phase of the procedure was to remove the primary bioanode and characterize the secondary bioanode alone. At the end of the experiments, the bioanodes were cut into three portions to be imaged by scanning electron microscopy, epifluorescent microscopy and for 16S rRNA pyrosequencing.

### **2.4. Microscopic imaging**

*Scanning electron microscopy (SEM).* Bioanodes were fixed in phosphate buffer (400 mM, pH=7.4) with 4% glutaraldehyde. They were rinsed in phosphate buffer containing saccharose (0.4 M) and dehydrated by immersion in increasing concentrations of acetone (50%, 70%, 100%), then in acetone and hexamethyldisilazane (50:50), and in 100% hexamethyldisilazane (HMDS). The last batch of HMDS was dried until complete evaporation. The bioanodes were observed with a LEO 435 VP scanning electron microscope.

*Epifluorescence microscopy.* Biofilms were stained with acridine orange 0.01% (A6014 Sigma) for 10 minutes, then carefully washed with distilled water and dried at ambient temperature. The samples were imaged with a Carl Zeiss Axioalger M2 microscope equipped for epifluorescence with an HBO 50 W ac mercury light source and the Zeidd 09 filter (excitor HP450-490, reflector FT 10, Barrier filter LP520). Images were acquired with a monochrome digital camera (evolution VF) every 0.5 $\mu\text{m}$  along the Z-axis and the set of images was processed with the Axiovision<sup>®</sup> software.

Epifluorescence images were analyzed by grey scale interpretation to calculate the proportion of the electrode surface covered by the biofilm. The grey intensity threshold between the areas covered by the biofilm and the non-covered areas was set manually. Grey levels greater than the threshold value were considered as biofilm-covered areas, while grey levels lower than the threshold were considered as clean areas.



## 2.5. Microbial community analysis

Samples of 2 mL were taken from the wastewater and from the activated sludge. Primary bioanodes were collected from R1, R3 and R5 at the end of step 2 (Figure 1) and secondary bioanodes at the end of the experiments. The biofilms were collected by sonication in 2 mL of distilled water (3 minutes at 80W). Cells were concentrated by centrifugation and re-suspended in 500 µL of water. The DNA was extracted from 250 µL of each sample using the MOBIO PowerSoil® DNA Isolation kit according to the manufacturer's instructions.

DNA concentrations were checked with absorbance at 260 nm. Sequencing of V3-V4 regions from ribosomal genes was then performed on the GeT-PlaGe platform in Toulouse using Illumina Miseq technology. The resulting data were analyzed with the open source software package QIIME "Quantitative Insights Into Microbial Ecology" (Caporaso et al., 2010b). 16S DNA sequence quality was checked using a sliding window 50 nt long and require an average quality above 35. The sequences were thus trimmed to the end of the last window with the required average quality and discarded if their final length was less than 250 nt. In addition, remaining reads where the longest homopolymer was more than 6 nt long or containing an ambiguous base were also discarded. Sequences were then aligned with PyNAST (Caporaso et al., 2010a) using the Silva 108 database core-aligned set formatted for QIIME as a template (Quast et al., 2013). Putative chimeric sequences were identified with ChimeraSlayer and removed from the dataset (Haas et al., 2011). Remaining sequences were clustered in Operational Taxonomic Units (OTUs) at 97% sequence similarity using uclust (Edgar, 2010). OTU taxonomic assignment was then performed with the RDP classifier (Cole et al., 2009), a 0.8 bootstrap cut-off using the longest sequence in each OTU as the representative sequence. Finally OTUs identified as Archaea or Eukarya were discarded.

For phylogenetic analysis, the 3 major OTUs belonging to *Desulfuromonadales* were introduced into the ARB software to check the quality of alignments and of the taxonomic assignation (Ludwig et al., 2004). Sequences of representative species of the current known diversity of the order *Desulfuromonadales* together with sequences of uncultured bacteria close to our sequences were then exported for deeper phylogenetic analysis. Exported sequences were aligned with PyNAST as stated above. Unambiguously aligned positions were extracted from the alignment using the BMGE program with block size of one and allowing 40% gaps in columns (Criscuolo and Gribaldo, 2010). The maximum likelihood tree was then inferred with PhyML using the GTR model with optimized equilibrium frequencies, a gamma correction to take the heterogeneity of evolutionary rates across sites into account (four discrete classes of sites, an estimated alpha parameter and an estimated proportion of invariable sites) and SPR & NNI topology searches with five random starting trees (Guindon and Gascuel, 2003). The robustness of each branch was estimated by the non-parametric bootstrap procedure implemented in PHYML (100 replicates of the original data set and the same parameters). The phylogenetic tree was edited and exported using FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Bioanode formation under applied potential

Six bioelectrochemical reactors, R1 to R6, were run in parallel following the same procedure with three different solutions (in duplicate):

- R1 and 2 were filled with synthetic medium and inoculated with activated sludge,
- R3 and 4 were filled with wastewater and inoculated with activated sludge,
- R5 and 6 were filled with wastewater only, without supplementary inoculum.

Each solution contained acetate 10 mM. The carbon cloth electrodes were polarized at 0.15 V vs. SCE. Evolutions of the current densities were reproducible for each duplicate so, for the sake of clarity, only one curve is plotted for each solution in Figure 1.

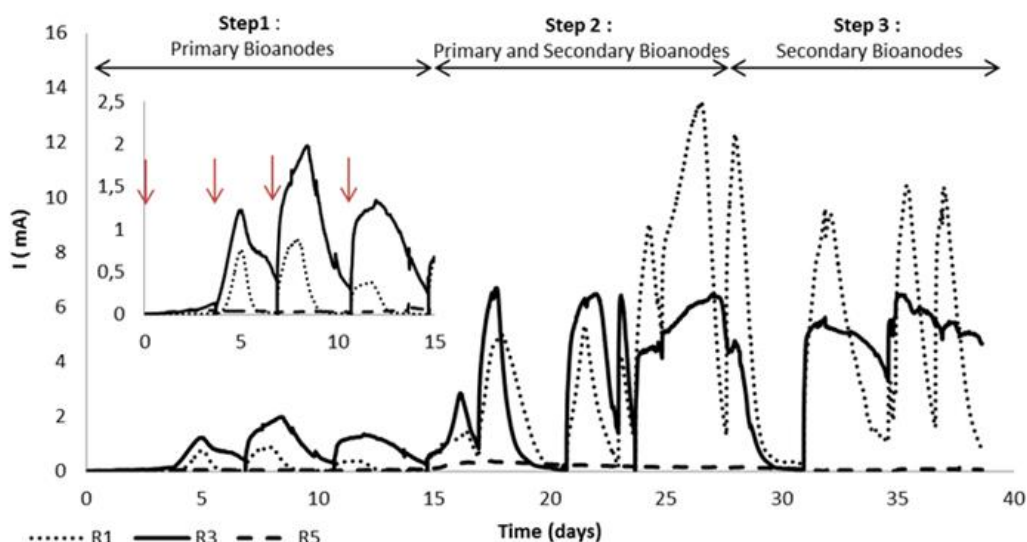


Figure 1: Current intensities (mA) during bioanode formation in three different solutions : Synthetic medium - R1; Wastewater effluent - R3 and R5. Activated sludge (3.3% v/v) was added as an inoculum in R1 and R3 but not R5. Each solution contained 10 mM acetate. Electrodes were polarized at 0.15 V vs. SCE. The arrows in the inset indicate replacement of the solution by the same fresh solution.

The bioanodes were designed following a procedure organized in three successive steps. The first step consisted of forming the primary bioanodes with four consecutive batches (inset of Figure 1). The current increased at the beginning of the second batch for reactors R1 to 4, which were inoculated with activated sludge. During the third batch, current densities up to  $0.7 \pm 0.6$  and  $3.1 \pm 0.1$  A/m<sup>2</sup> were obtained for R1-2 and R3-4 respectively. In R5-6, not inoculated with sludge, the current density did not exceed  $0.15 \pm 0.1$  A/m<sup>2</sup>. As commonly reported, the current was generated by the biofilm-catalysed acetate oxidation:



and the current decreased at the end of each batch because of acetate depletion.

The second step started when a clean electrode (secondary electrode) was introduced into each reactor and polarized at the same potential as the primary bioanode. From this time on, the solutions used for the successive batches no longer contained the activated sludge. Starting from the second step of the procedure, the primary bioanode played the role of inoculum. Current intensities increased for all the reactors due to the colonization of the secondary electrode. Finally, the primary bioanodes were removed from the reactors and, during the third step, the current was provided by the secondary bioanodes alone. The secondary bioanodes gave maximum current densities of  $21.9 \pm 2.1 \text{ A/m}^2$  and  $10.3 \pm 0.1 \text{ A/m}^2$  with the synthetic medium (R1-2) and the wastewater (R3-4), respectively. This means that, in synthetic medium and wastewater, the secondary bioanodes gave respectively around 30 and 3 times higher current density than their corresponding primary bioanode.

During the second and third steps of the procedure, the solutions no longer contained the activated sludge used as an inoculum to form the R1-4 primary bioanodes. The primary electrode was expected to act as selected inoculum that emitted electroactive microbial cells to colonize the clean surface of the secondary electrode. As already reported, this strategy brought a considerable improvement from the primary to the secondary bioanodes. In previous studies, a multiplication factor of 2 has been reported between primary and secondary bioanodes designed in synthetic medium (Baudler et al., 2014; Liu et al., 2008). Here, in synthetic medium and in similar conditions (same applied potential, same procedure), the multiplication factor was 30. Actually, the secondary bioanodes reached pretty common performance levels and the difference with the reported studies was due to the low currents provided by the primary bioanodes. These results demonstrate the efficiency of the strategy even when starting with relatively poorly efficient primary bioanodes.

The improvement factor of 3 obtained here in wastewater also showed the interest of the strategy when implementing real effluents. Comparing reactors R1-2 and R3-4 demonstrated that wastewater could be used as a low-cost medium to replace the more efficient but costly synthetic media. Around half of the current intensity found in synthetic medium was obtained in wastewater under identical conditions.

The R5-6 reactors constituted an exception, for which the primary/secondary electrode procedure was not fully successful. In these reactors fed with wastewater without additional inoculum, the primary bioanodes did not show significant electroactivity. The secondary bioanode showed similar poor catalytic activity in R5 but the duplicate R6 led to an improvement factor of 13 (from 0.2 to  $2.6 \text{ A/m}^2$ ). With a primary biofilm showing almost no electroactivity, colonization of the secondary electrode by electroactive microbial cells could not be guaranteed and led to poor reproducibility.

The R5-6 reactors showed that wastewater itself was not an efficient inoculum. This could be due to the microbial composition of the wastewater, but it is more likely to have been caused by the too low concentration of viable bacterial biomass introduced into the reactors. Foladori et al. (2010) quantified the biomasses in wastewater and in activated sludge and found that activated sludge had a 22 times higher concentration of viable cells than wastewater. It was also previously proved that activated sludge used as inoculum accelerated the start-up process and facilitated the co-enrichment of both fermentative and electrogenic bacteria at the anode (Li et al., 2013).

### **3.2. Biofilm structure**

At the end of the chronoamperometry (38 days) the bioanodes were imaged by epifluorescence microscopy and scanning electron microscopy (SEM) (Supplementary material - Figure S1). Epifluorescence images were analyzed by grey scale interpretation to calculate the proportion of the electrode surface covered by the biofilm. Coverage ratios were evaluated as 77%, 92% and 39% for R1, R3 and R5, respectively. The significantly lower biofilm coverage observed on the bioanodes formed in wastewater alone (R5) corroborated their lower electrochemical performance and the hypothesis of lower colonization due to the insufficient biomass contents of wastewater. SEM confirmed the low colonization of the bioanode formed in the absence of activated sludge (R5), which did not exhibit obvious microbial colonization at the lowest magnitude. It was necessary to resort to higher magnitudes to identify colonized patches on the fibre surfaces.

Nevertheless, for R1 and R3 with activated sludge as initial inoculum, performance of the secondary bioanode (19.9 A/m<sup>2</sup> and 10.4 A/m<sup>2</sup> respectively) was not correlated with the biofilm coverage ratios (77 and 92 %, respectively). Higher performance but lower coverage was indeed obtained in synthetic medium compared to wastewater.

The coverage ratio alone was not sufficient to explain the differences in electrochemical performance. SEM showed that the anodes from R1 and R3 were covered with a significant layer of biofilm but with marked difference in the structures. Biofilms formed in wastewater inoculated with activated sludge (R3) completely covered the electrode surface and almost masked the woven structure of the carbon cloth electrode. They had a chaotic structure whereas the biofilms formed in synthetic medium (R1) appeared less thick and were more regularly wrapped around each fibre of the carbon cloth. The latter structure was more favourable for producing high current densities, because it exposed a larger surface area of biofilm to the solution and thus enhanced mass transfers with the solution, either for feeding the microbial cells with substrate or balancing the biofilm internal pH by proton extraction (Torres et al., 2008).

The synthetic medium did not contain any component that could be used as electron acceptor by the cells, except possible traces of dissolved oxygen. Any alternative electron acceptor could only come from the activated sludge inoculum in R1-2. Microbial cells were forced to use the electrode as final electron acceptor and consequently formed a biofilm tightly wrapped around the electrode fibres. In contrast, wastewater, which contained around 30 mg/L of sulfates and traces of nitrates, offered dissolved electron acceptors to the cells, and a biofilm could thus develop far from the material surface in the spaces between the fibres. If this hypothesis is right, biofilms formed in inoculated wastewater can be expected to present a larger microbial diversity than those formed in inoculated synthetic medium.

In summary, the coverage ratio observed for the bioanodes formed in inoculated wastewater was higher than for those formed in synthetic medium but the electrochemical performance was lower. The more compact structure of the biofilm obtained in wastewater did not favour mass transfers with the solution and the electron transfer inside the biofilms was probably impeded by non-electroactive microbial species. SEM at higher magnitudes did not show obvious differences between R1 and R3 bioanodes.

Curved rod and rod-shaped bacteria were observed in both cases, embedded in extracellular polymeric substances.

### **3.3. Electrochemical characterization**

Catalytic cyclic voltammeteries were recorded at the same time (day 37) with each secondary bioanode (Figure 2). The bioanodes formed in synthetic medium (R1) revealed a current-potential sigmoid shape with zero-current potential of -0.45 V vs. SCE and the maximum plateau reached at around -0.02 V vs. SCE. The overpotential of 0.43 V required for the sigmoid to reach the maximum current was too large to strictly correspond to a Nernst-Michaelis law. The Nernst-Michaelis equation links the current density ( $j$ , A/m<sup>2</sup>) provided by a bioanode to the applied potential ( $E$ , V), assuming that electron transfer from the biofilm to the electrode is fast enough to ensure the Nernst equilibrium at any potential during the voltammetric record (Kato Marcus et al., 2007):

$$j = j_{\max} / (1 + \exp[-F/RT(E - E_k)]) \quad (2)$$

where  $j_{\max}$  is the maximum current density provided at the plateau,  $F$  the Faraday constant (96 485 Cb.mol<sup>-1</sup>e<sup>-</sup>),  $R$  the gas constant (8.3145 J mol<sup>-1</sup> K),  $T$  the temperature, (300 K), and  $E_k$  the anode potential (V) at which  $j = j_{\max}/2$ . This equation predicts that the maximum current plateau is reached at an overpotential of around 0.2 V. Here, the overpotential required to reach the maximum plateau was significantly larger, which indicated that electron transfer to the electrode was not fast enough to ensure the Nernst equilibrium. Nevertheless, the electron transfer kinetics of the bioanodes formed in the inoculated synthetic medium was considerably more efficient than that of the electrodes formed in inoculated wastewater. In this case, an overpotential of more than 0.7 V was not sufficient to reach the maximum current. Finally, the voltammetry (R5) confirmed that the bioanodes formed without the activated sludge inoculum did not exhibit significant electroactivity.

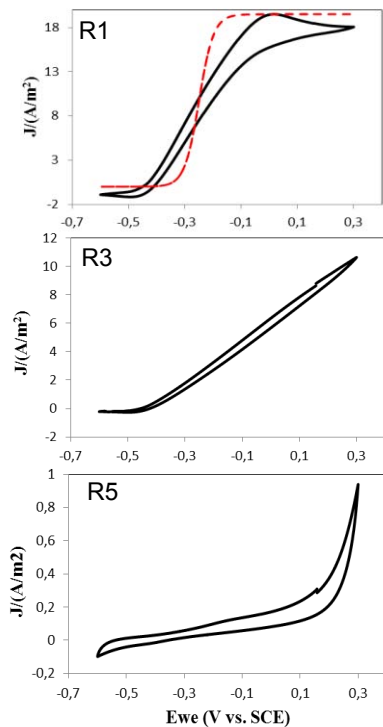


Figure 2: Catalytic voltammeteries recorded on day 37. (R1): Biofilm formed in synthetic medium with activated sludge inoculum; (R3): Biofilm formed in wastewater with activated sludge inoculum; (R5): Biofilm formed in wastewater without the activated sludge inoculum. The dotted sigmoid curve in the R1 CV represents the Nernst-Michaelis equation.

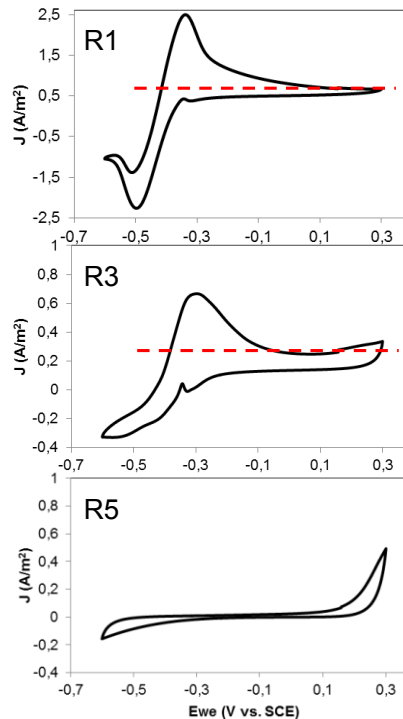


Figure 3: Non-turnover cyclic voltammeteries recorded after almost complete depletion of acetate (day 30). (R1): Biofilm formed in synthetic medium with activated sludge inoculum; (R3): Biofilm formed in wastewater with activated sludge inoculum; (R5): Biofilm formed in wastewater without the activated sludge inoculum. The dotted lines in the R1 and R3 CVs represent the estimation of the catalytic current that was extracted to integrate the current under the anodic peaks.

Non-turnover cyclic voltammeteries were recorded at day 30 when the acetate was almost fully depleted (Figure 3). The bioanodes formed in synthetic medium (R1) exhibited a single well-defined redox system with potential midpoint around -0.4 V vs. SCE, which was also observed, in a slightly less obvious form, with the bioanodes formed in inoculated wastewater (R3). A similar current peak around -0.4 V vs. SCE has already been reported with bioanodes formed from pure cultures of *Geobacter sulfurreducens* and has been attributed to the redox reaction of multiheme cytochrome OmcZ (-0.42 V) or OmcB (-0.39 V) (Zhu et al., 2012). It may consequently be expected that the microbial communities forming these bioanodes contained *Geobacter* related species. Consistently with the catalytic CV, the bioanodes formed without the activated sludge inoculum (R5) did not possess an efficient redox system, below 0.2 V vs. SCE.

The current peaks of non-turnover voltammeteries give an assessment of the redox compounds that can be electrochemically accessed by the electrode. The charge calculated by integrating the current under the anodic peak is proportional to the quantity of redox compounds that can release electrons to the electrode. Here, the charge under the peak was difficult to calculate because of the presence of a remaining catalytic current (exposure of the bioanodes to a stringent substrate deficiency was avoided, as it could have harmed them). Nevertheless, the charge was assessed by integrating the current peak

after extracting the catalytic current, assumed to be the current at 0.15 V vs. SCE. The charge densities were 0.33 and 0.06 C/m<sup>2</sup> for the bioanodes formed in synthetic medium (R1) and wastewater (R3) respectively. Although approximate, this calculation clearly points out the lower electron transfer capability of the bioanodes formed in wastewater with respect to those formed in synthetic medium. Actually, the biofilms formed in wastewater were thicker but they offered the electrode a smaller amount of accessible redox compounds.

The value of 0.33 C/m<sup>2</sup> found in the synthetic medium was close to the values of 0.5 and up to 1 C/m<sup>2</sup> reported in the literature for well-developed *Geobacter sulfurreducens* (Schrott et al., 2011). The secondary bioanodes designed here in synthetic medium confirmed their excellent electrochemical characteristics, which were not far from those of bioanodes composed of *Geobacter sulfurreducens* only. The bioanodes formed in wastewater presented better biofilm coverage and thicker biofilm (see section 3.2) but they produced lower current density and exhibited less efficient electron transfer kinetics (see catalytic voltammetry). The lower electrochemical performance was explained by the smaller amount of accessible redox compounds here. The lower accessible charge in a thicker biofilm also corroborated the possible significant presence of non-electroactive strains in the biofilm microbial community.

### 3.4. Analysis of the microbial communities

The microbial communities of primary and secondary bioanodes and primary and secondary media were analyzed by 16S rRNA pyrosequencing. The activated sludge used as inoculum and the wastewater used as the medium were also analyzed for comparison. The microbial community distribution is given in Table 2 in percentage of total sequences at the phylum level.

**Table 2: Microbial community distributions in percentage of total sequences at the phylum level for primary bioanodes (PB), secondary bioanodes (SB) in reactors R1, R3 and R5, Activated Sludge (AS) used as inoculum and wastewater (WW). Distribution at the class level is given for the Proteobacteria group. The red circles highlight the main classes as determined by pyrosequencing of 16S rRNA.**

Phylum	Proteobacteria %					Bacteroidetes %	Firmicutes %	others	
	α	β	γ	δ	ε				
AS - inoc	5	28	5	3	3	44	38	3	15
WW - effluent	2	18	18	3	19	60	23	9	8
R1-PB	1	3	12	36	18	70	20	3	7
R3-PB	0	3	0	33	21	57	26	5	12
R5-PB	2	20	5	13	3	43	32	12	13
R1-SB	0	1	1	60	0	62	24	4	10
R3-SB	1	2	1	41	4	49	33	5	13
R5-SB	3	14	2	6	43	68	17	5	10

At the phylum level, the activated sludge inoculum was composed of 44% of *Proteobacteria*, 38% of *Bacteroidetes*, and 18% of others. Wastewater microbial composition was also dominated by *Proteobacteria* (60%). The *Proteobacteria* phylum included a majority of *Betaproteobacteria* (28%) for

the activated sludge, while it was divided between *Beta-* *Gamma-* and *Epsilonproteobacteria* for wastewater. These results are consistent with those of other studies that have reported *Proteobacteria* and *Bacteroidetes* as the 2 groups most frequently retrieved in wastewater treatment plants (Wagner et al., 2002).

The microbial communities of the primary and secondary bioanodes were also dominated by the *Proteobacteria*. Inside this phylum, *Deltaproteobacteria* emerged as the dominant class for the bioanodes formed in R1 and R3. Comparison between primary and secondary biofilms indicated an enrichment from 36% to 60% of *Deltaproteobacteria* in R1 and from 33% to 41% in R3. In contrast, *Deltaproteobacteria* represented respectively only 13% and 6% for primary and secondary bioanodes formed in R5 that did not provide significant currents, and did not show improvement from primary to secondary.

Among the *Deltaproteobacteria* class, a majority of *Desulfuromonadales* was identified, which are known to have electroactive representatives. From the primary to the secondary bioanodes, their percentage of total sequences increased from 33 to 59% in R1 and, from 25 to 36 % in R3 while remaining at 1 and 3% in R5 (Figure 4). Going deeper in the taxonomic classification showed that all the *Desulfuromonadales* belonged to the family of *Geobacteraceae*. The strong presence of *Geobacteraceae* in the most efficient bioanodes (R1), their quasi-absence in the poorly performing bioanodes (R5) and the clear enrichment from primary to secondary bioanodes strongly suggested that the bioanode electroactivity was related to the selection of *Geobacteraceae*.

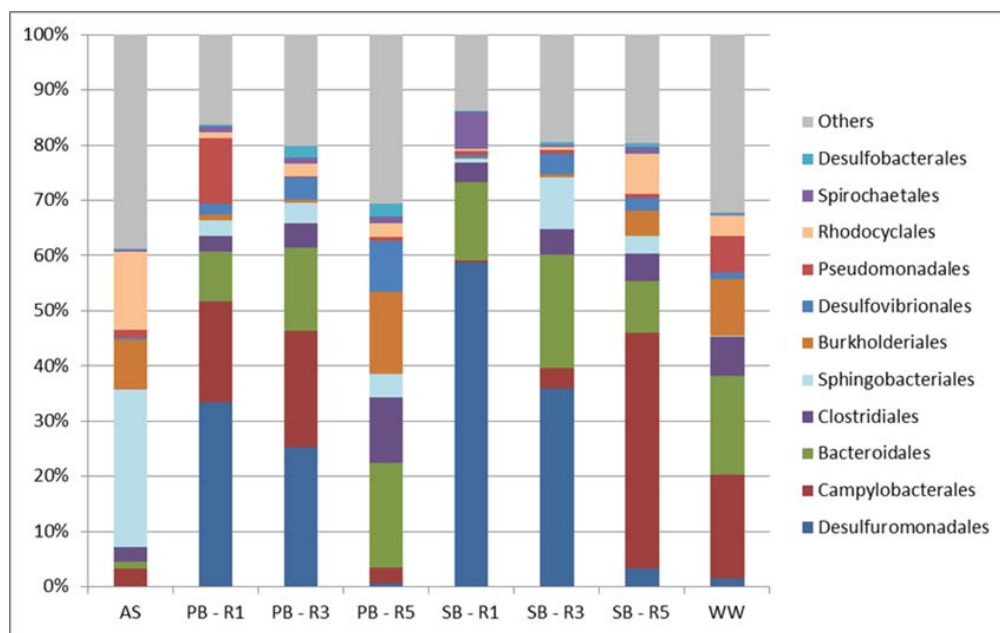


Figure 4: Major bacterial orders identified for primary bioanodes (PB) and secondary bioanodes (SB) of the reactors R1, R3 and R5. Activated sludge (AS) and wastewater (WW) were also analyzed.



Plotting the current density provided by the different bioanodes versus the percentage of *Geobacteraceae* demonstrated a fair correlation between the bioanode performance and the *Geobacteraceae* selection (Figure 5). Enrichment in bacteria belonging to the family *Geobacteraceae* was the essential driving force of the optimization procedure. High current densities have often been reported to be associated with the dominance of *Geobacter*-related species (Kiely et al., 2011; Zhu et al., 2013). However, this observation was confirmed for the first time here by a correlation supported by several values of the current density being a function of *Geobacteraceae* percentage.

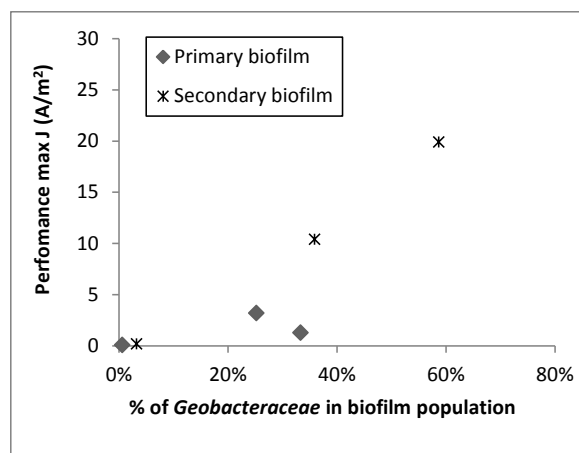


Figure 5: Correlation between the maximal current densities and the percentage of *Geobacteraceae* in bioanode microbial communities.

A maximum-likelihood phylogenetic tree that included several sequences of type species from the order *Desulfuromonadales*, together with sequences from uncultured bacteria closely related to our OTUs was reconstructed and is presented in the supplementary material (Figure S2). The bioanodes from R1 and R3 did not develop the same species among *Geobacteraceae*. In the synthetic medium (R1), OTUs 52989 and 14374 made up more than 50% of the *Desulfuromonadales* identified at the primary bioanode and up to 83% at the secondary. In wastewater (R3), OTU 1660 was dominant, representing more than 70% of the *Desulfuromonadales* in both primary and secondary biofilms.

OTU 52989 corresponds to *Geobacter sulfurreducens*, while OTUs 14374 and 1660 remain as uncultured bacteria in the database. OTU 14374 is close to the branch to which *Geobacter chapellei*, *Geobacter psychrophilus* and *Pelobacter propionicus* belong, whereas OTU 1660 belongs to the same branch as *G. metallireducens*, *G. grbiciae* and *G. hydrogenophilus*.

The medium used to form the bioanodes had a great impact on the microbial species that composed the biofilms: the synthetic medium favoured the growth of *Geobacter sulfurreducens* and OTU 14714 (related to an uncultured *Geobacter* sp.), while growth of another *Geobacter* sp. (OTU 1660) was favoured in wastewater.

Those OTUs make up less than 0.1% in the activated sludge inoculum and less than 1% in wastewater. Only a strong selective pressure can explain their dominance in the bioanodes. The microbial enrichment was also demonstrated by the diversity indexes, calculated for each bioanode and each corresponding

medium (Suppl Material - Table S1). Chao1, estimating total species richness, was higher for each primary bioanode than for the secondary bioanode. It was inversely correlated to the anodic performance. Shannon and Simpson indexes also showed that diversity decreased at the secondary bioanodes, confirming the enrichment in electroactive bacteria. Diversity was systematically lower in the biofilm than in the medium, except for R5, which did not show any enrichment in *Deltaproteobacteria* and did not provide significant current.

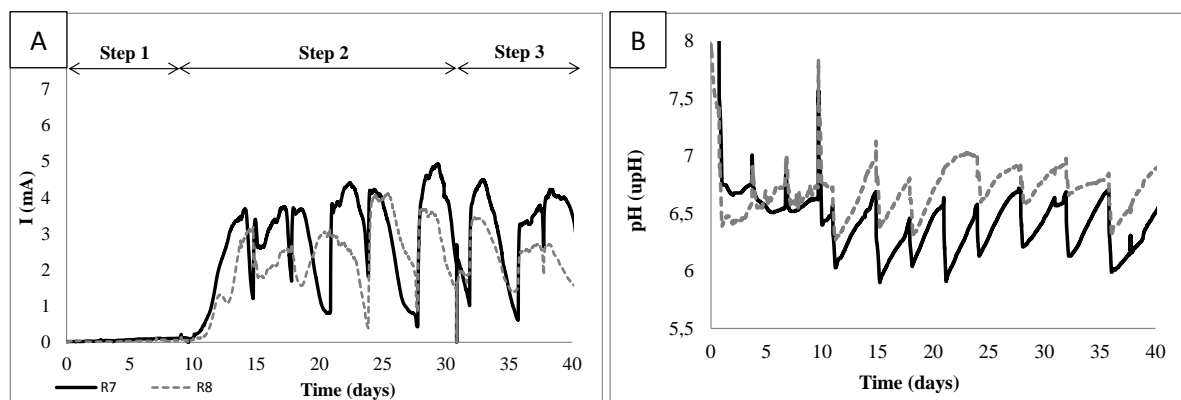
Up to the family level, the formation of bioanodes in synthetic medium or in wastewater obeyed a fairly similar process: the electrochemical pressure selected for *Geobacteraceae* and the electrochemical performance of the bioanodes were roughly related to the percentage of *Geobacteraceae*. The synthetic medium (SB1-Chao1 = 4750) resulted in a more stringent selection than the wastewater medium (SB3-Chao1 = 5586) and resulted in biofilms mainly wrapped around the fibres of the electrode on which electroactive bacteria grew in priority. Wastewater allowed the development of a larger diversity of microbial species, probably including a high number of non-electroactive bacteria. This resulted in the formation of compact biofilms that were able to fill the inter-fibre spaces. These bioanodes produced lower current density, probably because of less efficient mass transfers and electron transfers, as demonstrated by the cyclic voltammetry, which indicated less efficient electron transfer kinetics due to a smaller amount of accessible redox compounds. Surprisingly, at the species level, the bioanodes formed in synthetic medium or in wastewater revealed clearly different features. Among the *Geobacteraceae*, the synthetic medium favoured the growth of *G. sulfurreducens* and OTU 14714 closely related to an uncultured *Geobacter sp.*, while wastewater promoted the development of another *Geobacter sp.* (OTU 1660). Actually the smaller efficiencies of these bioanodes may also be related to the different *Geobacter* species that were involved.

### 3.5. Scalable strategy applied to food wastes

Finally, the interest of the strategy was checked by replacing the acetate substrate by food waste. Two reactors (R7 and 8) were run in parallel (duplicates) in the conditions described above, with wastewater inoculated by activated sludge and following the 3-step procedure (Figure 6A). A food waste dose having a volume of 10 mL was chosen to obtain a COD close to that of 10 mM of acetate (0.65 gO<sub>2</sub>/L). The addition of 10 mL of food waste (43 gO<sub>2</sub>/L) in the 600 mL reactors led to a COD of 0.7 gO<sub>2</sub>/L.

The general trend was similar to the previous results obtained with acetate (Figure 1) and the improvement factor from the primary to the secondary bioanodes was considerable. The current density provided by the primary bioanodes did not exceed 0.2 A/m<sup>2</sup> after three batches, while the secondary bioanodes reached 8.1 (R7) and 5.9 (R8) A/m<sup>2</sup>. This means an improvement by a factor of 35 on average. Here, the primary/secondary procedure proved to be extremely efficient. Actually, a premature and wrong conclusion encouraged by looking at the primary bioanodes only might be that food wastes were not appropriate to feed a microbial anode when wastewater was used as the dilution medium. In contrast, the secondary bioanodes demonstrated the high potential of food wastes combined with wastewater dilution.

pH monitoring revealed that pH decreased by 0.5 unit for each new batch of wastewater supplemented with 10 mL of food wastes (Figure 6B). Then, pH went back to its initial value as the organic acids contained in the waste were consumed. This auto-regulation of the pH was observed with food waste pulses of 0.7 gO<sub>2</sub>/L but was compromised when the concentration of the pulse was doubled (data not shown). The pH decreased to 5.7 with a 20 mL dose of food waste. Organic loading rate (OLR) is an important parameter for optimizing the performance. Goud et al. (2011) have shown that high OLR operation caused a large drop in pH (to 5.5 - 5.6), which suppressed the power generation of their MFC. They suggested enhancing the buffering capacity to improve power yields at higher loading rates. In our system, the buffering capacity of wastewaters remained low and dilution was required to avoid inhibition due to pH decrease. The low cost of wastewater used as dilution medium comes at the price of strict OLR control.



**Figure 6: Current intensities recorded on carbon cloth electrode polarized at 0.15 V vs. SCE (A) and pH values (B) in R7 and R8 (duplicates) fed with food waste in wastewater as dilution medium and inoculated with activated sludge.**

From a practical point of view, wastewater used as dilution medium was shown to be a promising solution for designing scalable bioanodes. With 10 mM acetate as substrate, wastewater ensured 50% of the current density obtained in the optimal synthetic medium. In this last section, replacing acetate by food wastes led to 33% of the current density that was obtained in the ideal case using acetate in synthetic medium. This result is really quite encouraging, given the large gap that exists in the literature between the performance levels reported in synthetic media amended with acetate and in real wastes (see Introduction).

If the objective was to treat large quantities of concentrated wastes, it would not be reasonable to contemplate large-sized electro-microbial technologies requiring huge amounts of phosphate salts and the addition of costly micro-nutriments and vitamins. Here, using low-cost (or even cost-free) wastewater proved to be a fair alternative solution at the cost of an acceptable performance loss and the necessity for careful OLR control to master pH evolution. The causes of the lower performance in wastewater have been identified as the biofilm structure and microbial composition and work should now be pursued on this basis to improve the bioanode electrochemical properties.

#### 4. Conclusion

Bioanodes can be designed by replacing the costly synthetic media commonly used in small-sized reactors by wastewater that can be implemented at very large scale. Obviously, the synthetic medium ensured higher current densities but wastewater succeeded in producing 50% of the performance. In both cases, the electrocatalytic efficiency was correlated with the selection of microbial species of the *Geobacteraceae* family.

The primary/secondary procedure allowed bioanodes able to treat food wastes to be successfully designed using wastewater as the dilution medium. This strategy offers a way to scale-up bioanodes to large size at low cost in order to treat concentrated wastes.

#### Acknowledgements

This work was part of the “BIORARE” project (ANR-10-BTBR-02), partly funded by the French Agence Nationale de la Recherche (ANR) and the Comité des Investissements d’Avenir. The authors thank Marie-Line de Solan (LGC) for her help with the SEM images and Luc Etcheverry (LGC) for helping with activated sludge and wastewater sampling. We also kindly thank Ms. Susan Becker for her help in correcting the English version of the manuscript.

#### Supplementary data / Annexe 1

Supplementary data associated with this article can be found in the online version.

#### References

- [1] Baudler, A., Riedl, S., Schröder, U., 2014. Long-term performance of primary and secondary electroactive biofilms using layered corrugated carbon electrodes. *Bioenergy Biofuels* 2, 30.
- [2] Caporaso, J.G., Bittinger, K., Bushman, F.D., DeSantis, T.Z., Andersen, G.L., Knight, R., 2010a. PyNAST: a flexible tool for aligning sequences to a template alignment. *Bioinformatics* 26, 266–267.
- [3] Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K., Fierer, N., Peña, A.G., Goodrich, J.K., Gordon, J.I., Huttley, G.A., Kelley, S.T., Knights, D., Koenig, J.E., Ley, R.E., Lozupone, C.A., McDonald, D., Muegge, B.D., Pirrung, M., Reeder, J., Sevinsky, J.R., Turnbaugh, P.J., Walters, W.A., Widmann, J., Yatsunencko, T., Zaneveld, J., Knight, R., 2010b. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods* 7, 335–336.
- [4] Cercado-Quezada, B., Delia, M.-L., Bergel, A., 2010. Testing various food-industry wastes for electricity production in microbial fuel cell. *Bioresour. Technol.* 101, 2748–2754.
- [5] Choi, J., Chang, H.N., Han, J.-I., 2010. Performance of microbial fuel cell with volatile fatty acids from food wastes. *Biotechnol. Lett.* 33, 705–714.
- [6] Cole, J.R., Wang, Q., Cardenas, E., Fish, J., Chai, B., Farris, R.J., Kulam-Syed-Mohideen, A.S., McGarrell, D.M., Marsh, T., Garrity, G.M., Tiedje, J.M., 2009. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.* 37, D141–D145.
- [7] Criscuolo, A., Gribaldo, S., 2010. BMGE (Block Mapping and Gathering with Entropy): a new software for selection of phylogenetic informative regions from multiple sequence alignments. *BMC Evol. Biol.* 10, 210.
- [8] Edgar, R.C., 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26, 2460–2461.
- [9] Feng, Y., Wang, X., Logan, B.E., Lee, H., 2008. Brewery wastewater treatment using air-cathode microbial fuel cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 78, 873–880.
- [10] Folorosi, P., Bruni, L., Tamburini, S., Ziglio, G., 2010. Direct quantification of bacterial biomass in influent, effluent and activated sludge of wastewater treatment plants by using flow cytometry. *Water Res.* 44, 3807–3818.

- [11] Goud, R.K., Babu, P.S., Mohan, S.V., 2011. Canteen based composite food waste as potential anodic fuel for bioelectricity generation in single chambered microbial fuel cell (MFC): Bio-electrochemical evaluation under increasing substrate loading condition. *Int. J. Hydrog. Energy* 36, 6210–6218.
- [12] Guindon, S., Gascuel, O., 2003. A Simple, Fast, and Accurate Algorithm to Estimate Large Phylogenies by Maximum Likelihood. *Syst. Biol.* 52, 696–704.
- [13] Haas, B.J., Gevers, D., Earl, A.M., Feldgarden, M., Ward, D.V., Giannoukos, G., Ciulla, D., Tabbaa, D., Highlander, S.K., Sodergren, E., Methé, B., DeSantis, T.Z., Petrosino, J.F., Knight, R., Birren, B.W., 2011. Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons. *Genome Res.* 21, 494–504.
- [14] Kato Marcus, A., Torres, C.I., Rittmann, B.E., 2007. Conduction-based modeling of the biofilm anode of a microbial fuel cell. *Biotechnol. Bioeng.* 98, 1171–1182.
- [15] Ketep, S.F., Bergel, A., Calmet, A., Erable, B., 2014. Stainless steel foam increases the current produced by microbial bioanodes in bioelectrochemical systems. *Energy Environ. Sci.* 7, 1633.
- [16] Ketep, S.F., Fourest, E., Bergel, A., 2013. Experimental and theoretical characterization of microbial bioanodes formed in pulp and paper mill effluent in electrochemically controlled conditions. *Bioresour. Technol.* 149, 117–125.
- [17] Kiely, P.D., Regan, J.M., Logan, B.E., 2011. The electric picnic: synergistic requirements for exoelectrogenic microbial communities. *Curr. Opin. Biotechnol., Energy biotechnology – Environmental biotechnology* 22, 378–385.
- [18] Liu, Y., Harnisch, F., Fricke, K., Sietmann, R., Schröder, U., 2008. Improvement of the anodic bioelectrocatalytic activity of mixed culture biofilms by a simple consecutive electrochemical selection procedure. *Biosens. Bioelectron.* 24, 1006–1011.
- [19] Li, X.M., Cheng, K.Y., Selvam, A., Wong, J.W.C., 2013. Bioelectricity production from acidic food waste leachate using microbial fuel cells: Effect of microbial inocula. *Process Biochem.* 48, 283–288.
- [20] Ludwig, W., Strunk, O., Westram, R., Richter, L., Meier, H., Yadhukumar, Buchner, A., Lai, T., Steppi, S., Jobb, G., Förster, W., Brettske, I., Gerber, S., Ginhart, A.W., Gross, O., Grumann, S., Hermann, S., Jost, R., König, A., Liss, T., Lüßmann, R., May, M., Nonhoff, B., Reichel, B., Strehlow, R., Stamatakis, A., Stuckmann, N., Vilbig, A., Lenke, M., Ludwig, T., Bode, A., Schleifer, K.-H., 2004. ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res.* 32, 1363–1371.
- [21] Miksch, K., Cema, G., Corvini, P.F.-X., Felis, E., Sochacki, A., Surmacz-Górska, J., Wiszniowski, J., Żabczynski, S., 2013. R&D priorities in the field of sustainable remediation and purification of agro-industrial and municipal wastewater. *New Biotechnol.*
- [22] Oh, S., Logan, B.E., 2005. Hydrogen and electricity production from a food processing wastewater using fermentation and microbial fuel cell technologies. *Water Res.* 39, 4673–4682.
- [23] Pant, D., Arslan, D., Van Bogaert, G., Gallego, Y.A., De Wever, H., Diels, L., Vanbroekhoven, K., 2013. Integrated conversion of food waste diluted with sewage into volatile fatty acids through fermentation and electricity through a fuel cell. *Environ. Technol.* 34, 1935–1945.
- [24] Pant, D., Van Bogaert, G., Diels, L., Vanbroekhoven, K., 2010. A review of the substrates used in microbial fuel cells (MFCs) for sustainable energy production. *Bioresour. Technol.* 101, 1533–1543.
- [25] Patil, S.A., Surakasi, V.P., Koul, S., Ijmulwar, S., Vivek, A., Shouche, Y.S., Kapadnis, B.P., 2009. Electricity generation using chocolate industry wastewater and its treatment in activated sludge based microbial fuel cell and analysis of developed microbial community in the anode chamber. *Bioresour. Technol.* 100, 5132–5139.
- [26] Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., Glockner, F.O., 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 41, D590–D596.
- [27] Rimboud, M., Pocaznoi, D., Erable, B., Bergel, A., 2014. Electroanalysis of microbial anodes for bioelectrochemical systems: basics, progress and perspectives. *Phys. Chem. Chem. Phys.*
- [28] Rodrigo, M.A., Cañizares, P., Lobato, J., Paz, R., Sáez, C., Linares, J.J., 2007. Production of electricity from the treatment of urban waste water using a microbial fuel cell. *J. Power Sources, CONAPPICE 2006 Selected Papers Presented at the 2nd National Congress on Fuel Cells (CONAPPICE 2006), Madrid, Spain, 18-20 October 2006.* 169, 198–204.
- [29] Schrott, G.D., Bonanni, P.S., Robuschi, L., Esteve-Nuñez, A., Busalmen, J.P., 2011. Electrochemical insight into the mechanism of electron transport in biofilms of *Geobacter sulfurreducens*. *Electrochimica Acta, Selected Papers from the 61st ISE Meeting, Nice, France, 2010* 56, 10791–10795.

### *Chapitre 3 : Performances électrochimiques de bioanodes formées à partir de différents types de déchets*

- [30] Tenca, A., Cusick, R.D., Schievano, A., Oberti, R., Logan, B.E., 2013. Evaluation of low cost cathode materials for treatment of industrial and food processing wastewater using microbial electrolysis cells. *Int. J. Hydrog. Energy* 38, 1859–1865.
- [31] Torres, C.I., Kato Marcus, A., Rittmann, B.E., 2008. Proton transport inside the biofilm limits electrical current generation by anode-respiring bacteria. *Biotechnol. Bioeng.* 100, 872–881.
- [32] Wagner, M., Loy, A., Nogueira, R., Purkhold, U., Lee, N., Daims, H., 2002. Microbial community composition and function in wastewater treatment plants. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81, 665–680.
- [33] Wang, H., Ren, Z.J., 2013. A comprehensive review of microbial electrochemical systems as a platform technology. *Biotechnol. Adv.* 31, 1796–1807.
- [34] Zhu, X., Yates, M.D., Hatzell, M.C., Ananda Rao, H., Saikaly, P.E., Logan, B.E., 2013. Microbial Community Composition Is Unaffected by Anode Potential. *Environ. Sci. Technol.*
- [35] Zhu, X., Yates, M.D., Logan, B.E., 2012. Set potential regulation reveals additional oxidation peaks of *Geobacter sulfurreducens* anodic biofilms. *Electrochem. Commun.* 22, 116–119.



#### 4.3 Résultats complémentaires : Populations microbiennes dans les réacteurs alimentés en biodéchets comparées aux populations microbiennes sélectionnées sur acétate.

Dans l'article, les populations microbiennes sont comparées entre bioanodes formées en milieu synthétique et bioanodes formées dans des eaux usées avec l'acétate (10 mM) en tant que substrat. L'influence du milieu de dilution a été évaluée sur les populations présentes dans les biofilms. Les performances électrochimiques étaient corrélées au pourcentage de microorganismes de la famille des *Geobacteraceae*, qui était inférieur dans les réacteurs avec eaux usées (41% de la population totale séquencée pour les biofilms secondaires) par rapport aux réacteurs en milieu synthétique (60%).

Les expériences réalisées dans les réacteurs électrochimiques avec les eaux usées alimentées en acétate ont été réalisées dans les mêmes conditions que celles utilisant les biodéchets (700 mg DCO/L) dilués dans les eaux usées. Il est donc possible de comparer l'influence de la nature du substrat sur la population microbienne des biofilms formés en milieu eaux usées, avec le même inoculum initial provenant de boues activées (3%).

La Figure 27 représente sur un même histogramme la répartition des différentes classes pour les populations microbiennes :

- des biofilms primaires et secondaires formés dans un réacteur avec des eaux usées alimenté en acétate de sodium (0.6 gDCO/L) et inoculé avec des boues activées (3.3%) sur une électrode en tissu
- des biofilms primaires et secondaires formés dans un réacteur avec des eaux usées alimenté en biodéchets (0.7 gDCO/L) et inoculé avec des boues activées (3.3%) sur une électrode en tissu
- des milieux prélevés dans les réacteurs électrochimiques en fin d'expérience.
- des différents milieux « témoins » que sont l'inoculum, les eaux usées ou encore un réacteur de contrôle, dans lequel 600 mL d'eaux usées mélangées à 10 mL de biodéchets ont évolué à 27°C pendant 23 jours.



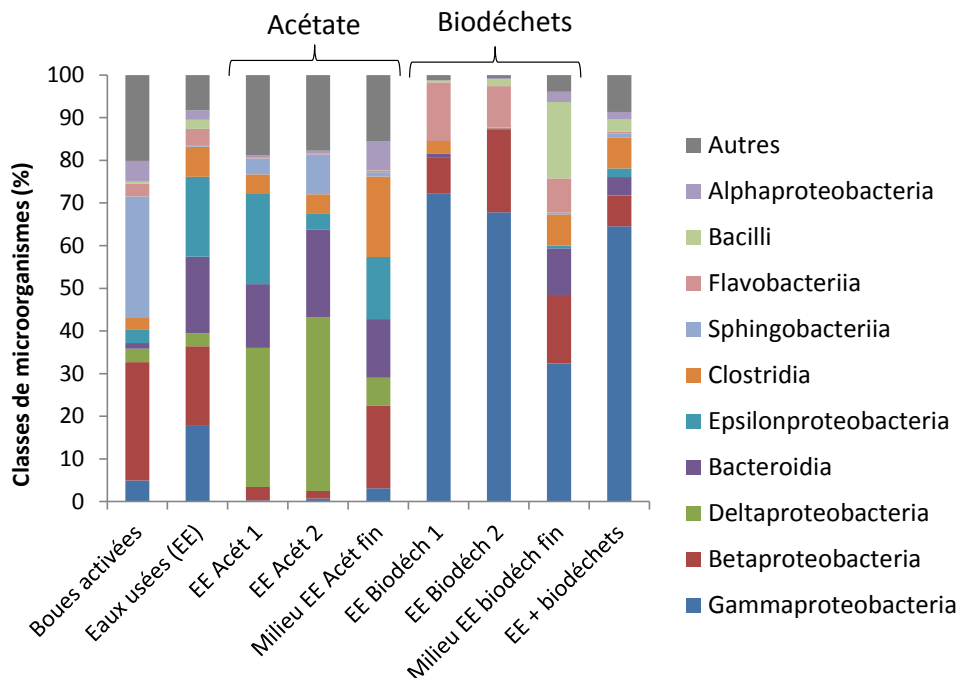


Figure 27 : Répartition des classes de bactéries identifiées dans les différents échantillons prélevés. EE acét 1 et 2 : biofilms primaire et secondaire formés dans les eaux usées alimentées en acétate. EE Biodéch 1 et 2 : biofilms primaire et secondaire formés dans les eaux usées alimentées en biodéchets. Milieu EE fin : microorganismes planctoniques issu des milieux en fin d’expérience. Différents milieux témoins : Boues activées, Eaux usées et Eaux usées supplémentées avec 10 mL de biodéchets.

Avec le substrat acétate de sodium, le groupe des Deltaproteobacteria était sélectionné à l’anode et cet enrichissement était corrélé aux bonnes performances catalytiques des biofilms. Cette sélection n’est pas observée dans les réacteurs alimentés en biodéchet, dans lesquels les Gammaproteobacteria dominant tandis que les Deltaproteobacteria représentent moins de 1% de la population identifiée. Pourtant, l’électroactivité a bien été démontrée pour les réacteurs alimentés en biodéchets (Figure 6 dans l’article). Ces résultats indiquent que le type de substrat a une forte influence sur la population bactérienne capable de se développer, et que le développement de Deltaproteobacteria (dont le genre *Geobacter* fait partie) n’est pas une condition obligatoire pour obtenir une électroactivité à l’anode. D’autres espèces, notamment dans la famille des Gammaproteobacteria, sont connues pour leur électroactivité comme par exemple *Shewanella putrefaciens* et *Aeromonas hydrophila*.

Nos résultats concordent avec certaines études ayant déjà suggéré que la nature du substrat a beaucoup d’influence sur la population microbienne, sans doute plus importante que la source d’inoculum (Chang et al., 2006; Freguia et al., 2010a; Kim et al., 2006).

Le pH a également une influence sur la population microbienne sélectionnée (Patil et al., 2011). Pour les réacteurs contenant les eaux usées alimentés en acétate, le pH était compris entre 7.1 et 8.2 tandis que l’alimentation en biodéchets conduit à un pH plus acide compris entre 6.3 et 7.3. Or *G. sulfurreducens*, identifié sur acétate mais pas sur biodéchets, a un taux de croissance maximal pour un pH de 7, qui est drastiquement réduit à pH 6 (Franks et al., 2008).

## 5 Taux de traitement du biodéchet

Pour évaluer les performances de traitement du biodéchet dans les réacteurs bioélectrochimiques, un suivi de la demande chimique en oxygène (DCO) a été effectué sur 2 réacteurs pendant un cycle après un ajout de 10 mL de biodéchet correspondant à une charge de 800 mgDCO/L. Les résultats étaient reproductibles. En parallèle, deux types de contrôle ont été réalisés et suivis :

- un réacteur de contrôle sans électrode, contenant 600 mL d'eaux usées mélangées à 10 mL de biodéchets
- un même réacteur sans électrode, mais inoculé avec des boues activées (3.3%)

Sur la Figure 28 sont présentés les suivis de la DCO mesurée pour (1) un réacteur bioélectrochimique avec une électrode colonisée et polarisée à +0.15 V/ECS après un ajout de biodéchet, (2) le réacteur de contrôle non inoculé et (3) le réacteur de contrôle additionné de 20 mL de boues activées (3.3% v/v).

Dans le réacteur de contrôle non inoculé, la vitesse moyenne de dégradation de la DCO est de 30.9 mgDCO/L/jour. Dans les réacteurs bioélectrochimiques, cette vitesse est multipliée par un facteur 5.5 (171 mgDCO/L/jour en moyenne). Pour le réacteur de contrôle inoculé avec des boues activées, la vitesse de dégradation de la DCO atteint 94.8 mgDCO/L/jour, soit 3 fois plus importante que le réacteur de contrôle non inoculé, et 2 fois inférieure à la vitesse de dégradation obtenue dans les réacteurs bioélectrochimiques.

Pour les réacteurs bioélectrochimiques, il est courant d'exprimer la vitesse de dégradation de la matière organique par rapport à la surface projetée de l'anode, étant donné que la surface est un des facteurs essentiels dans tout procédé électrochimique. Dans notre étude, cette valeur est de 17 mgDCO/cm<sup>2</sup>/jour avec un ratio surface d'électrode/volume de réacteur de 1 m<sup>2</sup>/m<sup>3</sup>. Avec le même biodéchet et le même ratio surface/volume de 1 m<sup>2</sup>/m<sup>3</sup>, Bridier et al., (2015) obtiennent environ 5 mgDCO/cm<sup>2</sup>/jour. Ce taux de dégradation est intéressant d'un point de vue traitement. En effet, en considérant un ratio surface/volume de 40 m<sup>2</sup>/m<sup>3</sup> comme rapporté pour des réacteurs bioélectrochimiques de volume supérieurs au litre (Janicek et al., 2014), le taux de traitement atteindrait 2 à 6 kgDCO/m<sup>3</sup>/jour, ce qui correspond au taux de traitement des procédés de station d'épuration, comme le traitement avec les boues activées (~2 kg DCO/m<sup>3</sup>/j) ou les systèmes anaérobies à fortes charges (~8–20 kg DCO/m<sup>3</sup>/jour) (René A. Rozendal et al., 2008).

Sur la base des différentes vitesses obtenues dans les 3 conditions de nos expériences et en considérant la dégradation de la DCO par 3 types de populations distinctes, il est possible d'attribuer la part de la DCO dégradée par chacune de ces populations dans les réacteurs bioélectrochimiques : 18% de la DCO serait dégradé par les microorganismes contenues dans les eaux usées mélangées au biodéchet, 37% par les microorganismes planctoniques introduit par l'inoculum de boues activées et 45% par le biofilm développé à l'anode. Le calcul du rendement faradique associé à la dégradation des 10 mL de biodéchets (9.5%) indique, lui, que seulement 9.5% des électrons extraits du substrat sont échangés à l'anode. Ainsi, le biofilm dégradant la DCO à l'anode n'utilise pas forcément l'anode comme accepteur final d'électrons.

Des conditions d'anaérobiose plus poussée seraient préférables pour augmenter les rendements faradiques dans nos essais.

Cette analyse, même si elle est très simplifiée, montre l'intérêt du système bioélectrochimique qui permet le traitement de l'effluent en condition anaérobie, à température peu élevée (27°C) avec une vitesse 2 fois plus importante qu'un système inoculé sans électrode, et 5 fois plus importante qu'un système non inoculé.

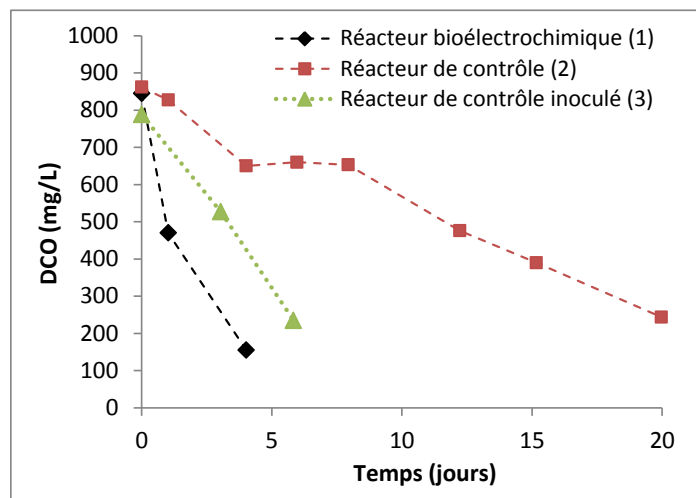


Figure 28 : Suivi de l'évolution de la DCO après un ajout de 10 mL de biodéchets (800 mg DCO/L) dans 580 mL d'eaux usées pour un réacteur de contrôle non inoculé, un réacteur de contrôle additionné de 20 mL de boues activées, un réacteur bioélectrochimique avec une électrode de tissu colonisée et polarisée à +0.15 V/ECS.

Au sein de la DCO soluble, les substrats carbonés, facilement assimilables par les microorganismes et pouvant être dégradés en  $\text{CO}_2$  par un biofilm électroactif à l'anode, sont les acides gras à courte chaîne ou acides gras volatils. L'analyse des échantillons par HPLC permet d'identifier la part des AGV dans la DCO (Figure 29). Initialement dans le réacteur de contrôle, du lactate est détecté (12% de la DCO), mais il est rapidement consommé. L'acétate et le propionate sont alors produits et représentent jusqu'à 52% de la DCO soluble au jour 6 avant d'être re-consommés. La présence de ces métabolites est caractéristique de l'activité de bactéries hydrolytiques et acidogènes dans un premiers temps puis leur reconsommation traduit une activité acétogène et / ou méthanogène. Dans le réacteur bioélectrochimique, les AGVs sont re-consommés dès qu'ils sont produits. Le biofilm développé à l'anode accélère les cinétiques de dégradation de la DCO. Les AGVs ne s'accumulent pas dans le milieu et leur taux maximal correspond à 17% de la DCO soluble (au jour 1).

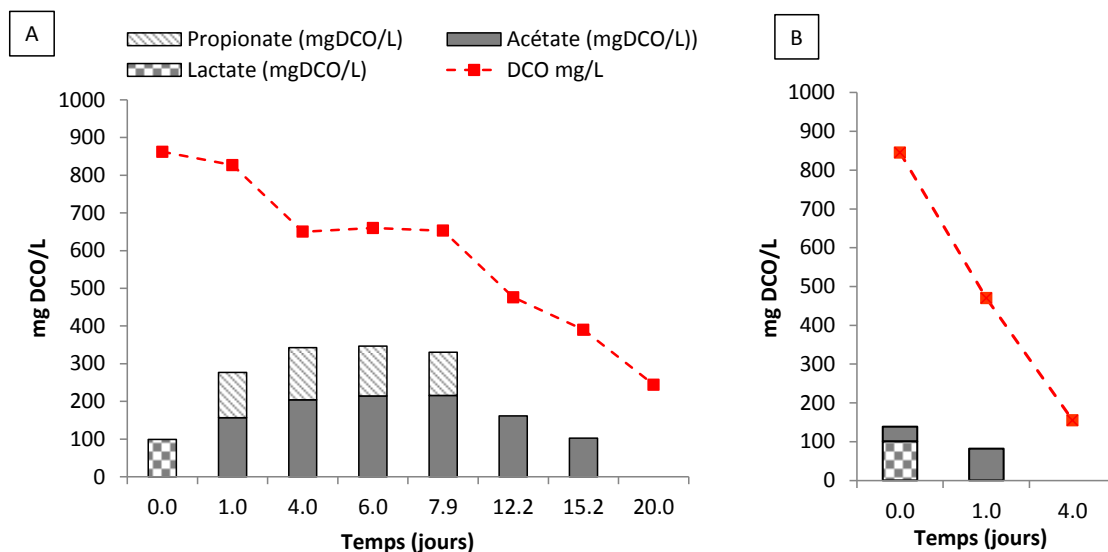


Figure 29 : Evolution de la DCO et des AGVs pour des réacteurs contenant 600 mL d'eau usée et 10 mL de biodéchets : (A) le réacteur de contrôle et (B) un réacteur bioélectrochimique avec une anode colonisée par un biofilm électroactif.

## 6 Conclusions du chapitre 3

Parmi les déchets testés pour servir de matière organique et de sources de microorganismes électroactifs à l'anode, seules les boues biologiques se sont avérées être directement adaptées pour une utilisation à l'anode avec des performances atteignant jusqu'à  $10 \text{ A/m}^2$ . Cependant, nos résultats n'étaient que très peu reproductibles. Nos efforts se sont ensuite tournés vers la mise en œuvre de biodéchets. Ils représentent un gisement intéressant de matière organique très concentrée et leur valorisation est aujourd'hui obligatoire. Les biodéchets bruts se sont avérés difficilement utilisables pour la formation de bioanodes, à cause de leur acidité et charge organique trop importantes. Leur dilution est apparue nécessaire.

Les essais se sont alors orientés vers le développement d'une stratégie pour permettre à la fois d'améliorer les performances de la bioanode ainsi que la reproductibilité des essais. Dans un premier temps, la procédure, dite en trois étapes, a été développée en milieu synthétique. Les densités de courant obtenues avec les biofilms secondaires ont atteint un maximum de  $19 \text{ A/m}^2$  avec des fluctuations inférieures à 20%. Dans un second temps, pour se rapprocher de conditions extrapolables en station d'épuration, la méthode a été adaptée avec un milieu réel (eaux usées) dans lequel les biodéchets sont dilués. La bioanode ainsi formée alimentée en biodéchets atteint une densité de courant maximale de  $7 \text{ A/m}^2$ , ce qui représente un progrès d'un facteur 4 par rapport aux meilleures études utilisant des biodéchets à l'anode (Goud et al., 2011).

Finalement, les suivis de DCO ont montré l'intérêt des TEM pour le traitement des biodéchets. L'extrapolation de nos vitesses donne un taux de traitement similaire à celui des procédés de station d'épuration, comme le traitement avec les boues activées ou les systèmes anaérobies à fortes charges.



# Chapitre 4 :

## Comparaison de structures 2D et 3D d'électrodes en fibres de carbone



## 1 Objectifs

Un examen rapide de la bibliographie montre que de nombreux auteurs se penchent sur la comparaison des structures d'électrode à la complexité croissante (Ghasemi et al., 2013; Xie et al., 2015) et sur la modification chimique ou physique des électrodes commerciales (Both Engel et al., 2015) dans l'objectif (1) d'augmenter l'affinité des microorganismes EA pour le matériau d'électrode, (2) d'optimiser la surface biodisponible (maximum de biocatalyseur par rapport à l'encombrement de l'électrode), (3) d'améliorer les propriétés d'échange électronique à l'interface. L'approche que nous proposons dans Biorare, et qui a déjà été développée au cours des projets passés au LGC, s'inscrit plutôt dans le point (2). Après le travail effectué sur électrodes planes (2D) en jouant sur des paramètres tels que la composition de l'électrolyte ou la source d'inoculum, il s'agit de considérer des électrodes tridimensionnelles (3D) dont l'épaisseur n'est plus négligeable et pour lesquelles de nouveaux phénomènes comme la pénétration du biofilm, le transport de matières, le colmatage de la structure 3D doivent être pris en compte.

Jusqu'ici, dans le cadre du projet Biorare, toutes les expérimentations (dont celles reportées dans ce manuscrit) ont été effectuées avec du tissu de carbone comme matériau d'anode. Avant d'envisager l'insertion des anodes microbiennes dans un pilote d'électrosynthèse microbienne, nous avons tenté d'augmenter les densités de courant en passant d'une électrode 2D à une électrode 3D.

Nous avons considéré le tissu de carbone d'épaisseur  $z \approx 0.5\text{mm}$  comme électrode 2D et le feutre de carbone ( $z \approx 5\text{mm}$ ) comme électrode 3D. En considérant des électrodes poreuses, les hypothèses à l'origine de ces considérations sont schématisées dans la Figure 30.

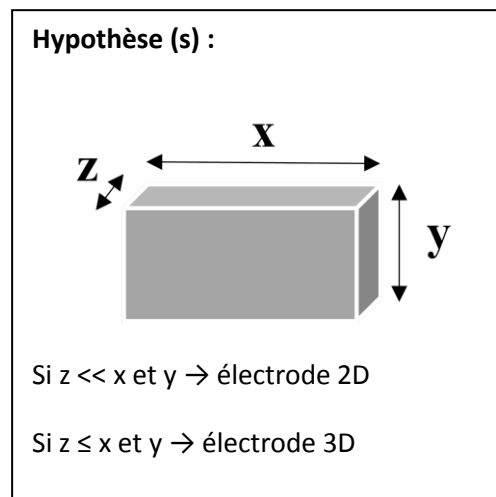


Figure 30 : Schéma d'une électrode : lorsque l'épaisseur (z) du matériau est négligeable par rapport à sa largeur (y) et sa longueur (x), il est considéré 2D. Si l'épaisseur (z) n'est pas négligeable par rapport à x et y, le matériau est considéré 3D

Les deux types d'électrodes (tissu ou feutre) sont constitués de fibres de carbone de diamètre voisin de  $10\ \mu\text{m}$  (Figure 31). Le tissu a une structure de fibres serrées tandis que le feutre présente une plus grande ouverture avec un espace inter-fibres entre 20 et  $200\ \mu\text{m}$ . Il semble logique d'envisager que la



surface spécifique disponible pour la formation du biofilm électroactif soit proportionnelle à l'épaisseur (z) de l'électrode.

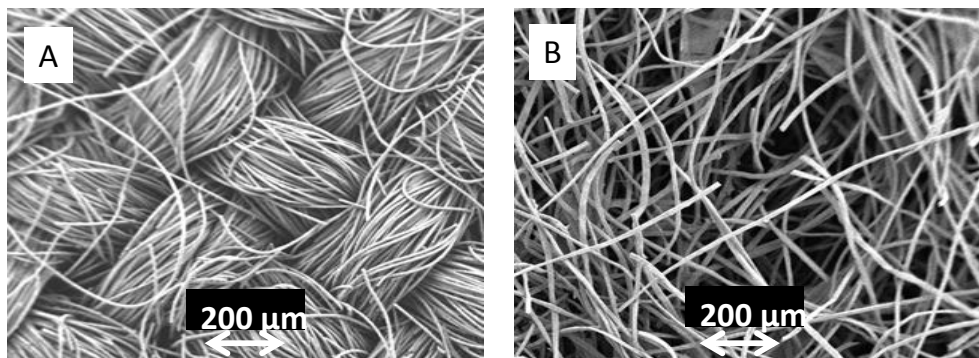


Figure 31 : Photographies MEB d'électrodes vierges en tissu (A) ou feutre (B) de carbone.

## 2 Bilan sur les travaux réalisés au LGC avant la thèse avec le tissu et le feutre de carbone

Voici un bilan des résultats obtenus en se limitant aux travaux déjà réalisés sur ces deux structures d'électrodes au LGC :

- Le tissu de carbone a été comparé avec du feutre de graphite et une plaque de graphite comme support de bioanode dans un milieu synthétique contrôlé (Starkey sans extrait de levure) inoculé avec des sédiments de marais salants avec 40 mM d'acétate (Thèse de Raphaël Rousseau). Quelle que soit la structure d'électrode utilisée, les performances bioélectrochimiques étaient alors identiques pendant les 15 premiers jours de l'expérience. Après les 15 premiers jours, les performances des bioanodes obtenues sur la plaque de graphite et le tissu de carbone diminuaient progressivement, alors que la bioanode formée sur le feutre de carbone voyait sa densité de courant augmenter pour se stabiliser à  $14 \text{ A/m}^2$ .
- Le tissu de carbone a été comparé avec des électrodes 2D de graphite et d'acier inoxydable en conditions identiques pour la formation de bioanodes en potentiel imposé à  $-0.2 \text{ V/ECS}$ , dans du lixiviat de terreau alimenté par additions successives de 20 mM d'acétate (Thèses de Diana Pocaznoi et Bibiana Cercado). Le tissu de carbone avait permis d'obtenir les meilleures performances ( $34 \text{ A/m}^2$ ) (Pocaznoi et al., 2012a). Dans l'étude de Cercado et al., (2013), le tissu de carbone (2D) avait été comparé au feutre de carbone (3D). De façon non expliquée, les densités de courant maximales obtenues à partir des deux structures d'électrodes étaient les mêmes ( $8.9 \text{ A/m}^2$  en lixiviat de terreau alimenté avec 10 mM acétate).

En conclusion, nous constatons ici deux comportements distincts en fonction des conditions expérimentales (milieu, inoculum) pour la formation des bioanodes étudiées. Dans le cas d'une bioanode « primaire » formée à partir de lixiviat de terreau et d'acétate, le passage à une électrode 3D ne semble pas permettre d'augmenter les performances de la bioanode. Pourtant, le plus souvent, l'état de l'art sur les structures d'électrodes (voir chapitre 1) indique que le passage d'une

électrode 2D à une électrode 3D permet d'augmenter la surface active de l'électrode, donc d'augmenter la colonisation par le biofilm et par conséquent les densités de courant (calculées par rapport à la surface géométrique projetée).

Voici quelques questionnements à l'origine de la méthodologie expérimentale mise en place dans ce chapitre :

- Les biofilms primaires sont parfois peu reproductibles. Si les expériences avaient été toutes répliquées, les conclusions auraient-elles été les mêmes ?
- Les différents inocula mis en œuvre associés à différents électrolytes sont-ils les paramètres à l'origine des résultats contradictoires ?
- La structure 3D du feutre permet-elle au biofilm de coloniser toute l'électrode ?
- Si non, la profondeur de pénétration du biofilm peut-elle être estimée ?
- Quel type de colonisation sera observé dans nos conditions de culture, avec un substrat réel de type biodéchet dilué dans des eaux usées et non un substrat synthétique de type acétate ?

Il a été choisi de comparer les performances électrochimiques de bioanodes sur tissus et feutres de carbone en répliquant dans nos conditions particulières (Milieu : eaux usées ; inoculum : boues activées ; substrat : biodéchets 700 mg DCO/L), en prenant soin de comparer les biofilms formés grâce à l'observation microscopique (MEB et épifluorescence) et à l'analyse des communautés microbiennes par pyroséquençage des ARN 16S.

In fine, la comparaison plus approfondie entre tissu et feutre de carbone sur notre système d'étude particulier apportera des connaissances à deux points de vue :

- d'un point de vue théorique, pour mieux comprendre et cerner les limitations lors du passage du tissu au feutre et pouvoir ainsi expliquer les contradictions observées,
- d'un point de vue pratique, pour déterminer s'il est possible ou non d'augmenter les performances anodiques de notre procédé en conditions réelles via l'utilisation du feutre de carbone (3D).

### **3 Comparaison du tissu de carbone et du feutre de carbone comme matériau support de la formation de bioanodes**

Les 2 matériaux (tissu et feutre) sont comparés en conditions identiques en suivant la procédure en trois étapes développée précédemment (Chapitre 3). L'expérience a été réalisée en utilisant 4 réacteurs bioélectrochimiques, identiques 2 à 2, avec des montages à 3 électrodes. L'électrode de travail, polarisée à +0.15 V/ECS est soit du tissu de carbone d'épaisseur 0.5 mm et de surface 6 cm<sup>2</sup> (dénomination cloth1 et cloth2), soit du feutre de graphite de surface équivalente (6 cm<sup>2</sup>) avec une épaisseur de 5 mm (felt1 et felt2).

Les bioanodes primaires sont formées avec 3 renouvellements successifs du milieu (eaux usées) complété avec 10 mL de biodéchets et supplémenté avec 3.3% (v/v) de boues activées en tant qu'inoculum. A la suite de ces 3 batchs (15 jours), une électrode vierge est ajoutée proche de la

bioanode primaire. Le milieu complété avec 10 mL de biodéchets est alors renouvelé, mais sans ajout d'inoculum. La bioanode secondaire est formée uniquement à partir de la bioanode primaire pendant 12 jours puis la bioanode primaire est retirée. La bioanode secondaire est alors étudiée seule pendant 10 jours.

Les résultats sont décrits dans l'article soumis pour publication dans le journal *Electrochemistry Communications*.

**3.1 Publication 2 : Les mêmes performances électrocatalytiques sont obtenues pour une bioélectrode alimentée en biodéchets, qu'elle soit formée sur du tissu de carbone 2D ou du feutre de carbone 3D**

## Two-dimensional carbon cloth and three-dimensional carbon felt perform similarly to form bioanode fed with food waste

Elise Blanchet, Marie-Line De Solan, Benjamin Erable and Alain Bergel

*Submitted to Electrochemistry Communications in January 2016*

### Abstract

Two-dimensional carbon cloth and three-dimensional carbon felt were compared for their capacity to form bioanodes for food waste treatment. Wastewater was used as the dilution medium instead of a synthetic solution in order to be close to industrial conditions. Both electrodes displayed similar electrochemical performance. In both cases, microorganisms were mainly wrapped around the fibres of the electrodes. The biofilms were around 80-120  $\mu\text{m}$  thick with a 39.3% microbial volume ratio on carbon cloths. On carbon felt, the biofilms showed a lower microbial volume ratio of 16.3% on the upper layers but with a penetration depth of 200-800  $\mu\text{m}$ . The biofilm patterns were different but they resulted in similar current density, around 3.5  $\text{A}/\text{m}^2$ . When chemically-rich media have to be implemented, 2D cloth offers a worthwhile solution that can equal 3D porous materials..

**Keywords :** Microbial anode, carbon felt, biofilm structure, porous electrode, microbial electrochemical technology.

### 1. Introduction

Treating the wastes produced by food industries is a necessity for environmental, safety and economic reasons [1]. In this context, microbial electrochemical technologies (MET) may be seen as a promising way to treat food waste by converting the chemical energy it contains into electrical energy [2–4]. A few studies have described the formation of microbial anodes with raw food wastes in conditions close to those found in industry [5–7]. In particular, replacing the phosphate buffer solution used in laboratory-oriented studies with wastewater, which costs nothing and is widely available in large amounts, ensured promising current densities of up to 5  $\text{A}/\text{m}^2$  [5].

It has been widely shown that using porous 3-dimensional structures can lead to efficient bioanodes, e.g. with graphite felt [8–10], carbon foams made from the pyrolysis of natural products [11,12], stainless steel foam [13], etc., but direct comparisons of two-dimensional (2D) and three-dimensional (3D) microbial anodes in identical conditions remain very rare [14,15]. Moreover, most of the bioanodes studied so far have been implemented in synthetic media using acetate as the substrate. In some cases, the substrate is a small volume of real waste diluted in the synthetic medium. These conditions give worthwhile results that advance fundamental knowledge but would be difficult to scale-up to large-size industrial processes because of the large amount of salts that are required to prepare the dilution.

The purpose of the present study was to assess the suitability of 3D electrode versus 2D electrodes when they are formed in close-to-industrial conditions, i.e. using food waste as the substrate and wastewater as the dilution medium [5]. No synthetic medium was used, only food waste and domestic water

effluent. 2D and 3D structures were compared using cloth and felt structures both made from similar 10- $\mu\text{m}$  diameter carbon fibres.

## **2. Materials and methods**

### **2.1. Electrochemical setup**

Working electrodes of  $2 \times 3 \text{ cm}^2$  geometric surface area were implemented in 600 mL three-electrode set-ups with a saturated calomel reference electrode (SCE, Radiometer Analytical, +0.24 V/SHE) and a  $2 \times 3 \text{ cm}^2$  platinum grid used as the auxiliary electrode. The working electrode was either carbon cloth (0.5 mm thick, Paxitech, Grenoble, France) or carbon felt (5 mm thick, RVG 4000, Mersen, France). It was located at around 10 cm from the auxiliary electrode and less than 0.5 cm to the reference electrode. The working electrode was polarized at 0.15 V/SCE using a VSP potentiostat (Bio-Logic SA, EC-Lab software) and the current was recorded every 10 minutes. Cyclic voltammetry was recorded at 1 mV/s in the -0.6 to +0.3 V/SCE range.

The reactors were continuously lightly stirred (100 rpm) and maintained at  $27^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$  in a water bath. They were initially purged with nitrogen for 15 minutes to remove oxygen.

### **2.2 Inoculum, wastewater and food wastes**

Activated sludge with a chemical oxygen demand (COD) of 4100 mgO<sub>2</sub>/L was collected from a wastewater treatment plant (Castanet-Tolosan, France).

Wastewater collected from the same wastewater treatment plant served as the medium. The average soluble COD was about 390 mg/L, with 48 mg/L ammonium, and nitrate and sulfate concentrations were less than 0.5 mg/L and 27 mg/L, respectively. The average pH was 7.8.

Food wastes were prepared with common food components in a reproducible way as described elsewhere [5]. The final pH was 3.4 and soluble COD 42.6 gO<sub>2</sub>/L.

Fed-batches were run with successive additions of 10 mL food waste leachate into the 600 mL of wastewater, which corresponded to 700 mg/L COD.

### **2.3 Bioanode formation**

Experiments were carried out in duplicate using the enrichment procedure described previously [5,14]. Primary bioanodes were formed with 3 consecutive batches, replacing the whole solution that contained wastewater, 10 mL of food waste leachate and the inoculum (3.3% v/v activated sludge) for each batch. After 15 days, a secondary electrode was introduced into each reactor and polarized at the same potential (0.15 V/SCE). Successive batches were run with wastewater medium and food waste only, without the addition of activated sludge. Finally, the primary bioanodes were removed from the reactors at the 27th day. At the end of the experiments (37 days) the secondary bioanodes were cut into three portions to be imaged by SEM and epifluorescence microscopy.

### **2.4 Chemical analyses**

The solution was regularly sampled and COD was measured using an LCK514 kit (Hach Lange, range 100-2000 gO<sub>2</sub>/L). Volatile fatty acids composition was analysed using an HPLC (Thermo Scientific, France) equipped with a Rezex ROA-Organic acid H<sup>+</sup> (8%), 250\*4.6 mm phase-reverse column (Phenomenex, France) thermostated at 30°C and associated with a refractive index detector in series with a UV detector. Elution was performed at 170 µL/min with sulfuric acid 10 mM (pH 2.2). Before analysis, samples were thawed and filtered at 0.2 µm. The column was calibrated with a mixture of methanoate, acetate, lactate, propionate and butyrate, in the analysis concentration range.

## 2.5 Microscopy imaging

Scanning electron microscopy (SEM). Bioanodes were fixed as described elsewhere [15] and observed with a LEO 435 VP scanning electron microscope.

Epifluorescence microscopy. Biofilms were stained with acridine orange 0.01% (A6014 Sigma) for 10 minutes, then carefully washed and dried at ambient temperature. The samples were imaged with a Carl Zeiss Axioimager M2 microscope equipped for epifluorescence with an HBO 50 W ac mercury light source and the Zeiss 09 filter (excitor HP450-490, reflector FT 10, Barrier filter LP520). Images were acquired with a monochrome digital camera (evolution VF) along the z-axis and processed with the Axiovision<sup>®</sup> software. The proportion of the electrode surface covered by the biofilm was assessed by grey scale level analysis. The grey intensity threshold between biofilm-covered and non-covered areas was set manually.

Microbial volume ratio. Each calculation was based on a stack of 30 images taken from the upper surface along the z-axis of the bioanode with a distance ( $\delta$ ) of 3.9 µm between successive focal planes. The local microbial volume was assessed for each image by multiplying the biofilm-covered surface area by the thickness  $\delta$ . The sum of the 30 local microbial volumes divided by the total volume of the 30 layers ( $30*\delta*$  image area) gave the so-called "microbial volume ratio". This value indicated the volume that contained intracellular or extracellular nucleic acid in the 117-µm-thick upper biofilm layer.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Electrochemical characteristics

Four reactors were run in parallel under applied potential of 0.15 V/SCE; two were equipped with a carbon cloth anode and two with a carbon felt anode. Evolutions of the current intensities were reproducible for each duplicate (for clarity, only one curve is plotted in Figure 1.A) and were similar for both kinds of electrode. The primary bioanodes started to provide current after 4 days and reached  $1.8 \pm 0.2$  A/m<sup>2</sup> at the third batch. The secondary bioanodes gave a maximum current density of  $3.5 \pm 0.8$  A/m<sup>2</sup>. The electrocatalytic improvement from the primary to the secondary bioanode corresponded to a multiplication factor of 2, as already reported using acetate as the substrate [16,18].

The turnover cyclic voltammeteries (CV) of carbon cloth and carbon felt bioanodes showed a similar sigmoidal shape with zero-current potential around -0.40 V/SCE and an overpotential of around 0.50 V required for the maximum current be reached (Figure 1B-C). The 2-dimensional carbon cloth electrodes and the 3-dimensional carbon felt electrodes led to similar electrochemical characteristics.

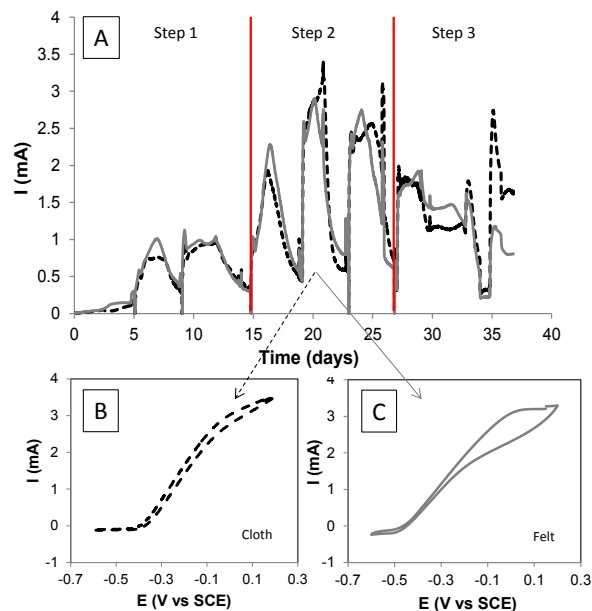


Figure 1: Current intensity versus time for carbon cloth (dotted line) and carbon felt (solid line) bioanodes polarized at +0.15 V/SCE and fed with food waste (A). Cyclic voltammeteries (1 mV/s) performed on the 21st day under turnover conditions on carbon cloth (B) and carbon felt (C).

### 3.2 Electrode and Biofilm Imaging

SEM imaging of the clean electrodes showed that both structures were composed of the same 10  $\mu\text{m}$  diameter fibers (Figure 2A-B). Carbon cloth had a very tight network of interwoven threads. In contrast, carbon felt presented an open structure with space between fibers ranging from around 20 to 200  $\mu\text{m}$ . At the end of the chronoamperometry (37 days) SEM showed an almost uniform biofilm on carbon cloth, while the carbon felt surface was only partly clogged (Figure 2C-D).

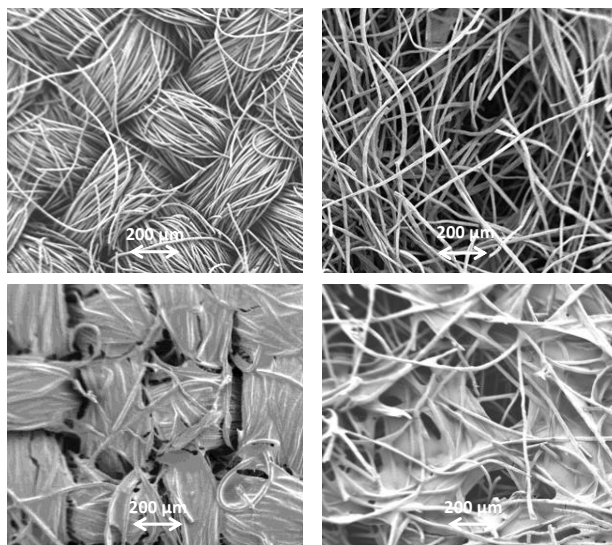
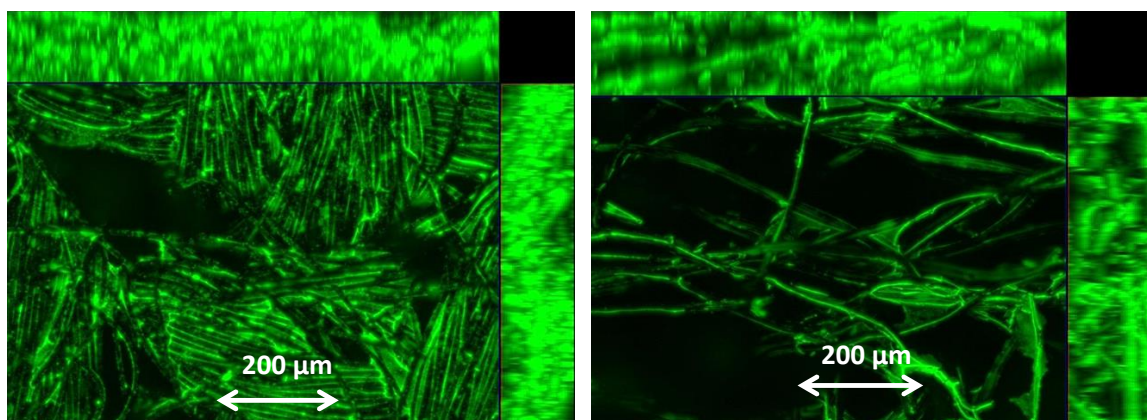


Figure 2: SEM images of clean electrodes of A/carbon cloth, B/carbon felt, and secondary bioanodes on C/carbon cloth and D/carbon felt formed at +0.15 V/SCE (day 37)

Primary and secondary bioanodes were characterized by three-dimensional epifluorescent microscopy (Figure 3A-B). The microbial volume ratios were  $27 \pm 6.8\%$  and  $12 \pm 4.4\%$  on carbon cloth and carbon felt, respectively, for the primary bioanodes. The secondary bioanodes showed a significant microbial volume increase to  $39.3 \pm 1.1\%$  and  $16.3 \pm 2.7\%$  on carbon cloth and carbon felt, respectively. Improvement of the current density from the primary to the secondary bioanodes corresponded to a significant microbial volume increase. The current density provided by the electrodes was straightforwardly linked to the microbial volume ratio.



**Figure 3: 3D epifluorescent microscopy of secondary bioanodes formed under polarization at +0.15 V/SCE on A/carbon cloth and B/carbon felt (day 37)**

Carbon cloth has a surface fully accessible for the microorganisms and led to an almost uniform biofilm with a thickness of the order of 80 to 120  $\mu\text{m}$  and a microbial volume ratio of  $39.3 \pm 1.1\%$ . Carbon felt led to microbial volume ratio of only  $16.3 \pm 2.7\%$ . The epifluorescent images showed that the nucleic acids were mainly accumulated around the electrode fibers (Figure 3). The microbial volumes were consequently higher on the cloth than on the felt structure because the fibers were denser in the cloth configuration.

Sectional cuts of the carbon felt bioanodes (Figure 4) showed that fibers on the surface are completely covered with a biofilm wrapped around them, while the fibers in the center are not colonized at all. The biofilm penetration depth measured in several spots of the sectional cut view was in the range from 200 to 800  $\mu\text{m}$ . As the biofilm was settled on the two sides of the felt, which has a total thickness of 5000  $\mu\text{m}$ , it can be concluded that the biofilm colonized only 8% to 32% of the total felt volume.

It must be recalled that the microbial volume ratios were measured only on the 117- $\mu\text{m}$ -thick upper layer of the bioanodes (see section 2.5). On the felt electrode, the 117- $\mu\text{m}$  upper part of the biofilm had a lower microbial volume ( $16.3 \pm 2.7\%$ ) than the biofilm formed on the cloth ( $39.3 \pm 1.1\%$ ) but the biofilm penetrated 200 to 800  $\mu\text{m}$  inside the felt electrode. The biofilm penetration inside the felt compensated for the lower microbial volume, and resulted in similar electrochemical performance for both structures.



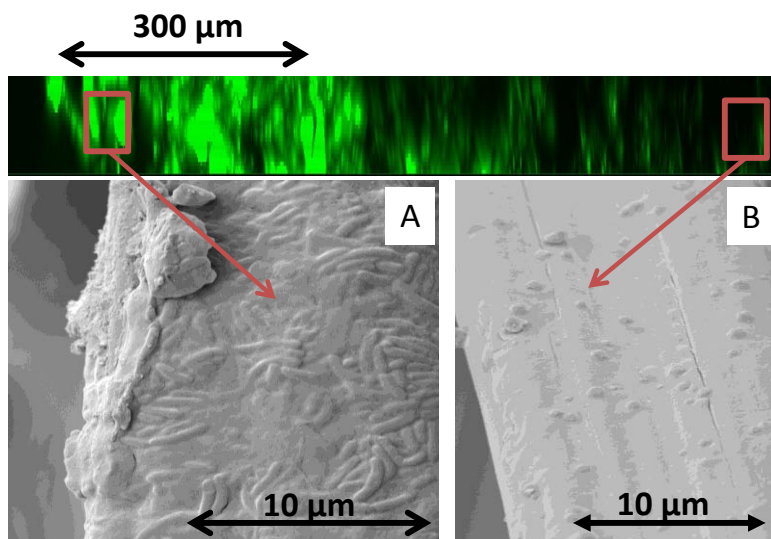


Figure 4: Sectional views of a carbon felt secondary bioanode (day 37) observed by epifluorescence microscopy (top) and SEM of two different fibres (A) on the surface of the carbon felt and (B) 1 mm deep in the carbon felt.

For both structures, SEM showed a biofilm on the electrode surfaces (Figure 2C-D), which partly clogged the porosity of the felt electrode. This surface biofilm can explain the weak biofilm penetration in the felt. A previous study has shown that bioanodes formed on the same carbon felt provided current density as high as 80 A/m<sup>2</sup> in highly saline media (45 g/L NaCl) [19]. Such hard conditions led to the strong selection of halotolerant species, resulting in a biofilm mainly wrapped around the fibers inside the felt structure [20]. In contrast, in the chemically-rich medium used here, the non-selective conditions led to the easy formation of a surface biofilm that hindered deep internal colonization and explained the modest performance of the 3D felt.

This result is similar to that reported recently with pure cultures of *Geobacter sulfurreducens* [15]. Activated carbon was compared to graphite felt and, unexpectedly, the surface area of the electrode material proved to have negligible influence on the electrochemical performance. The thick biofilm formed by *G. sulfurreducens* was assumed to be an element of the explanation [15]. This previous study, performed with a model system, and the present work, carried out in close-to-industrial conditions, similarly evidenced that the biofilm pattern is a major parameter controlling the bioanode performance. The biofilm pattern can annihilate the advantage of 3D porous electrodes that has been postulated a priori so far. This issue now deserves dedicated investigations.

#### 4. Conclusion

Bioanodes were formed in wastewater used as the medium and fed with food wastes. In this context, 2D cloth performed similarly to 3D felt. The higher efficiency of 3D electrodes, which has generally been postulated a priori so far, should now be called into question depending on the operating conditions. The study has shown that the biofilm pattern is a major parameter that controls the electrochemical performance and can annihilate the advantage of 3D porous electrodes. In industrially-scalable

conditions, 2D electrodes should now be considered as a worthwhile solution, particularly with the objective of subsequently designing multilayer electrodes.

### Acknowledgements

This work was part of the "BIORARE" project (ANR-10-BTBR-02), partly funded by the French Agence Nationale de la Recherche (ANR) and the Comité des Investissements d'Avenir. The authors thank Luc Etcheverry for collecting the activated sludge and wastewater used in the experiments. We also thank Ms. Susan Becker for her help in correcting the English version of the manuscript.

### References

- [1] M. Kosseva, C. Webb, *Food Industry Wastes: Assessment and Recuperation of Commodities*, Academic Press, 2013.
- [2] B. Cercado-Quezada, M.-L. Delia, A. Bergel, Electrochemical micro-structuring of graphite felt electrodes for accelerated formation of electroactive biofilms on microbial anodes, *Electrochem. Commun.* 13 (2011) 440–443. doi:10.1016/j.elecom.2011.02.015.
- [3] B. Cercado-Quezada, M.-L. Delia, A. Bergel, Testing various food-industry wastes for electricity production in microbial fuel cell, *Bioresour. Technol.* 101 (2010) 2748–2754. doi:10.1016/j.biortech.2009.11.076.
- [4] A. ElMekawy, S. Srikanth, S. Bajracharya, H.M. Hegab, P.S. Nigam, A. Singh, et al., Food and agricultural wastes as substrates for bioelectrochemical system (BES): The synchronized recovery of sustainable energy and waste treatment, *Food Res. Int.* 73 (ElMekawy et al., 2015) 213–225. doi:10.1016/j.foodres.2014.11.045.
- [5] E. Blanchet, E. Desmond, B. Erable, A. Bridier, T. Bouchez, A. Bergel, Comparison of synthetic medium and wastewater used as dilution medium to design scalable microbial anodes: Application to food waste treatment, *Bioresour. Technol.* 185 (2015) 106–115. doi:10.1016/j.biortech.2015.02.097.
- [6] D. Pant, D. Arslan, G. Van Bogaert, Y.A. Gallego, H. De Wever, L. Diels, et al., Integrated conversion of food waste diluted with sewage into volatile fatty acids through fermentation and electricity through a fuel cell, *Environ. Technol.* 34 (2013) 1935–1945. doi:10.1080/09593330.2013.828763.
- [7] A. Tenca, R.D. Cusick, A. Schievano, R. Oberti, B.E. Logan, Evaluation of low cost cathode materials for treatment of industrial and food processing wastewater using microbial electrolysis cells, *Int. J. Hydrog. Energy.* 38 (2013) 1859–1865. doi:10.1016/j.ijhydene.2012.11.103.
- [8] S. Chen, G. He, A.A. Carmona-Martinez, S. Agarwal, A. Greiner, H. Hou, et al., Electrospun carbon fiber mat with layered architecture for anode in microbial fuel cells, *Electrochem. Commun.* 13 (2011) 1026–1029. doi:10.1016/j.elecom.2011.06.009.
- [9] K. Guo, A.H. Soeriyadi, S.A. Patil, A. PrévotEAU, S. Freguia, J.J. Gooding, et al., Surfactant treatment of carbon felt enhances anodic microbial electrocatalysis in bioelectrochemical systems, *Electrochem. Commun.* 39 (2014) 1–4. doi:10.1016/j.elecom.2013.12.001.
- [10] T.H.J.A. Sleutels, R. Lodder, H.V.M. Hamelers, C.J.N. Buisman, Improved performance of porous bio-anodes in microbial electrolysis cells by enhancing mass and charge transport, *Int. J. Hydrog. Energy.* 34 (2009) 9655–9661. doi:10.1016/j.ijhydene.2009.09.089.
- [11] S. Chen, Q. Liu, G. He, Y. Zhou, M. Hanif, X. Peng, et al., Reticulated carbon foam derived from a sponge-like natural product as a high-performance anode in microbial fuel cells, *J. Mater. Chem.* 22 (2012) 18609. doi:10.1039/c2jm33733a.
- [12] S. Chen, G. He, X. Hu, M. Xie, S. Wang, D. Zeng, et al., A Three-Dimensionally Ordered Macroporous Carbon Derived From a Natural Resource as Anode for Microbial Bioelectrochemical Systems, *ChemSusChem.* 5 (2012) 1059–1063. doi:10.1002/cssc.201100783.
- [13] S.F. Ketep, A. Bergel, A. Calmet, B. Erable, Stainless steel foam increases the current produced by microbial bioanodes in bioelectrochemical systems, *Energy Environ. Sci.* 7 (2014) 1633. doi:10.1039/c3ee44114h.
- [14] M. Epifanio, S. Inguva, M. Kitching, J.-P. Mosnier, E. Marsili, Effects of atmospheric air plasma treatment of graphite and carbon felt electrodes on the anodic current from *Shewanella* attached cells, *Bioelectrochemistry Amst. Neth.* 106 (Epifanio et al., 2015) 186–193. doi:10.1016/j.bioelechem.2015.03.011.

- [15] E. Kipf, R. Zengerle, J. Gescher, S. Kerzenmacher, How Does the Choice of Anode Material Influence Electrical Performance? A Comparison of Two Microbial Fuel Cell Model Organisms, *ChemElectroChem*. 1 (Kipf et al., 2014) 1849–1853. doi:10.1002/celc.201402036.
- [16] Y. Liu, F. Harnisch, K. Fricke, R. Sietmann, U. Schröder, Improvement of the anodic bioelectrocatalytic activity of mixed culture biofilms by a simple consecutive electrochemical selection procedure, *Biosens. Bioelectron*. 24 (2008) 1006–1011. doi:10.1016/j.bios.2008.08.001.
- [17] B. Erable, M.-A. Roncato, W. Achouak, A. Bergel, Sampling Natural Biofilms: A New Route to Build Efficient Microbial Anodes, *Environ. Sci. Technol*. 43 (2009) 3194–3199. doi:10.1021/es803549v.
- [18] A. Baudler, S. Riedl, U. Schröder, Long-term performance of primary and secondary electroactive biofilms using layered corrugated carbon electrodes, *Front. Energy Res*. 2 (2014) 30. doi:10.3389/fenrg.2014.00030.
- [19] R. Rousseau, X. Dominguez-Benetton, M.-L. Délia, A. Bergel, Microbial bioanodes with high salinity tolerance for microbial fuel cells and microbial electrolysis cells, *Electrochem. Commun*. 33 (2013) 1–4. doi:10.1016/j.elecom.2013.04.002.
- [20] R. Rousseau, C. Santaella, W. Achouak, J.-J. Godon, A. Bonnafous, A. Bergel, et al., Correlation of the Electrochemical Kinetics of High-Salinity-Tolerant Bioanodes with the Structure and Microbial Composition of the Biofilm, *ChemElectroChem*. 1 (2014) 1966–1975. doi:10.1002/celc.201402153.

### 3.2 Commentaires sur la publication 2

Les performances électrochimiques du biofilm anodique obtenues avec tissus ou feutres de carbone comme support se sont avérées être les mêmes, avec une densité de courant maximale de 3.5 A/m<sup>2</sup> pour le biofilm secondaire.

Pour expliquer ces résultats, l'analyse des biofilms par microscopie a révélé 2 éléments majeurs : (1) une faible pénétration du biofilm dans le feutre malgré une structure ouverte présentant un espace de 20 à 200 µm entre les fibres et (2) un taux d'occupation du biofilm en surface de l'électrode plus faible sur le feutre comparé au tissu. Voici ci-après quelques éléments non présentés dans l'article sur ces 2 paramètres moteurs des performances électrochimiques de nos bioanodes.

#### 3.2.1 Pénétration du biofilm dans les électrodes de feutre

Comme indiqué dans l'article, la pénétration du biofilm dans l'épaisseur de l'électrode 3D semble limitée aux 500 premiers µm (moyenne de la pénétration mesurée entre 200 et 800 µm sur 7 spots). Les pistes avancées pour expliquer cette faible profondeur de pénétration du biofilm sont celles du colmatage de la porosité de l'électrode par le développement du biofilm mais surtout par les particules et les polymères organiques amenés par le substrat biodéchet. Les études associant l'utilisation du feutre avec de bonnes performances (Aelterman et al., 2008; Rousseau et al., 2013) se déroulent uniquement dans des milieux synthétiques « propres ». Dans ces milieux peu chargés en matières en suspension ou en matières organiques complexes, il ne semble pas y avoir de problème d'encrassement des pores du feutre. Toute la surface active, ou au moins une large majorité, peut alors être colonisée.

Autre point marquant, les biofilms formés dans des milieux à forte salinité, ont pour caractéristique de gainer les fibres de carbone de l'électrode (Rousseau et al., 2014), laissant alors les pores libres pour le transport de matière depuis le milieu liquide (électrolyte) vers l'intérieur de l'électrode. Cela n'est pas le cas pour notre étude puisque nous n'utilisons pas de milieu synthétique mais un milieu liquide complexe, de l'eau usée de station d'épuration (MES = 0.24 g/L) supplémentée avec du biodéchet. Les observations de la surface des électrodes de feutre colonisées en MEB ou en microscopie à épifluorescence (vue de dessus) montrent clairement que le biofilm (et autres particules et polymères) recouvre la structure du feutre et colmate une part importante des pores (Figure 32). Le marquage pré-observation des électrodes à l'acridine orange permet de visualiser spécifiquement les acides nucléiques qu'ils soient intra ou extracellulaires. Les images obtenues en microscopie à épifluorescence permettent donc de juger de la densité cellulaire bactérienne et des polymères extracellulaires qui renferment des acides nucléiques au sein de la porosité. Les observations en MEB donnent une idée plus globale du colmatage réel puisque qu'elles ne font aucune distinction entre la biomasse bactérienne, les particules organiques et inorganiques, et les polymères. Le colmatage semble encore plus marqué sur les images MEB (Figure 32.B), montrant ainsi qu'en milieu complexe réel, la croissance microbienne n'est pas l'unique cause du colmatage observé.

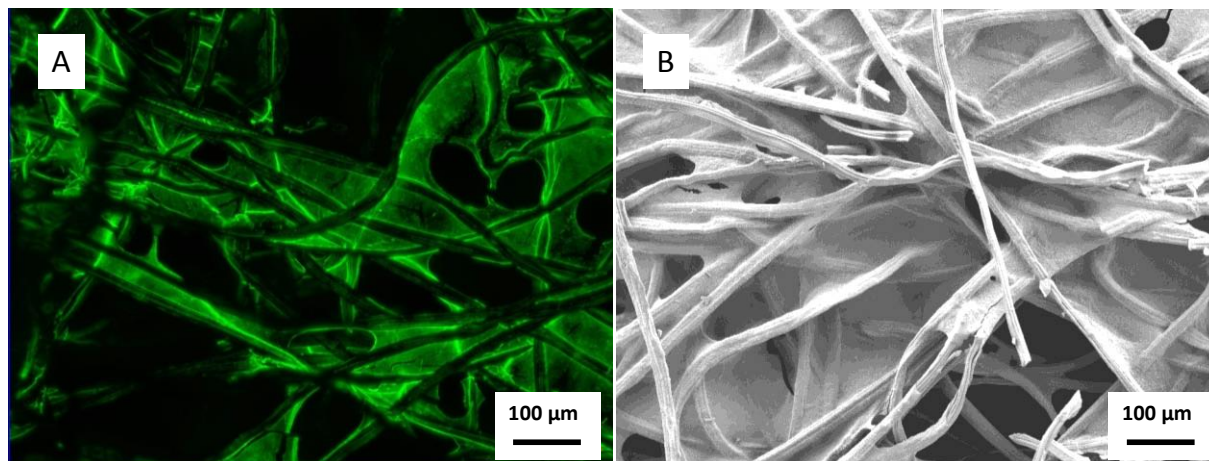


Figure 32 : Observation de la colonisation et du colmatage d'une électrode polarisée à +0.15 V/ECS et exposée à de l'eau usée alimentée en biodéchets pendant 23 jours. (A) Observation au microscope à épifluorescence (B) Observation au microscope électronique à balayage.

Une raison supplémentaire pour laquelle le biofilm ne pénètre pas dans la totalité du feutre pourrait être liée à son hydrophobicité initiale. Des études ont déjà montré qu'une surface hydrophile était plus propice à la formation d'un biofilm électroactif (Guo et al., 2013). Or, pour notre étude, deux indices indiquent que le feutre de carbone est hydrophobe :

- des difficultés ont été observées pour le mouillage initial du feutre dans le milieu et aucun prétraitement n'a été mis en œuvre avant inoculation, contrairement à Kim et al., (2002), qui font bouillir l'électrode dans de l'eau distillée avant de s'en servir.
- Les voltammétries cycliques initiales indiquent la présence d'air au sein de la structure 3D du feutre puisque le courant de réduction correspondant à la vague de réduction de l' $O_2$  est beaucoup plus important sur le feutre que sur le tissu (Figure 33).

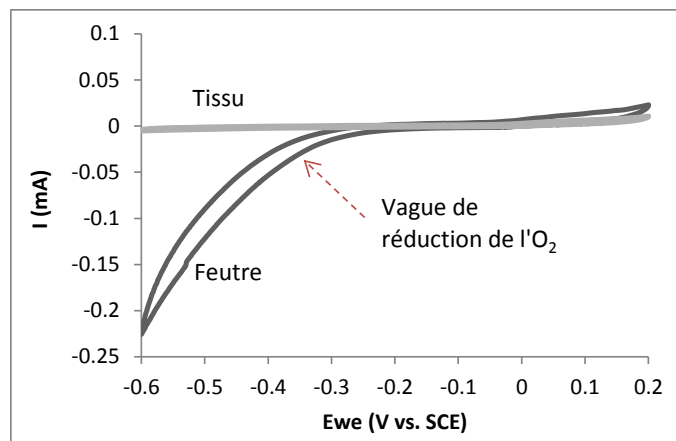


Figure 33 : Voltammogrammes réalisés sur électrode de feutre ou de tissu au début de l'expérience avant ajout de l'inoculum et avant ajout de biodéchet, entre +0.2 V et -0.6 V/ECS. La vitesse de balayage en potentiel est de 1 mV/sec. pH = 8.1

Il serait intéressant de vérifier l'hypothèse d'hydrophobicité avec des expériences supplémentaires mettant en œuvre du feutre de carbone prétraité pour augmenter sa mouillabilité.

### 3.2.2 Taux d'occupation du biofilm en surface de l'électrode et calcul des biovolumes

L'estimation des taux de recouvrement grâce à la microscopie à épifluorescence a permis le calcul des taux d'occupation du biofilm sur une épaisseur de 117  $\mu\text{m}$  en surface des différents matériaux. Dans l'article, la moyenne des taux d'occupation par le volume microbien est donnée. L'histogramme de la Figure 34 donne les résultats pour chaque biofilm (primaire et secondaire) de chaque réacteur (duplicat sur tissu et duplicat sur feutres).

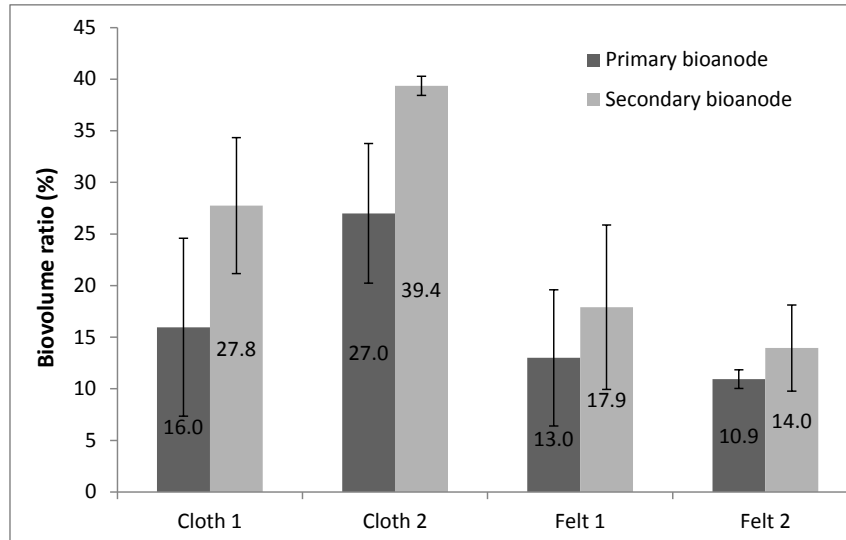


Figure 34 : Taux d'occupation par le volume microbien calculés sur chaque électrode (primaire et secondaire). Le biovolume est calculé sur 3 spots pour chaque électrode.

La détermination du taux d'occupation du biofilm dans les 117 premiers  $\mu\text{m}$  de l'épaisseur des électrodes, effectué sur 3 champs d'observation pour chaque électrode, donne deux informations principales :

- les taux d'occupation moyens calculés pour les biofilms secondaires sont supérieurs à ceux des biofilms primaires. Ce résultat indique que l'augmentation des densités de courant d'un facteur 2 entre les biofilms primaires et les biofilms secondaires serait liée à l'augmentation du taux d'occupation. Les biofilms secondaires qui ont 23 jours sont plus denses que les biofilms primaires, qui ont pourtant 27 jours.
- les taux d'occupation du biofilm déterminés sur le tissu colonisé (sur 117  $\mu\text{m}$  de profondeur à partir de la surface de l'électrode) sont plus importants ( $33.6 \pm 7.7$  % en moyenne) que sur le feutre ( $16.3 \pm 6.4$  % en moyenne). Comme mentionné dans l'article, les acides nucléiques sont accumulés autour des fibres, indiquant une colonisation par le volume microbien seulement à proximité des fibres. La structure plus serrée et plus compacte du réseau de fibres du tissu favorise donc une colonisation dense de l'électrode. La structure plus relâchée du feutre, c'est à dire qui comporte des fibres plus espacées, permet une pénétration plus profonde du biofilm au sein de la structure poreuse de l'électrode 3D, mais la densité du biofilm est plus faible dans la partie supérieure de l'électrode 3D (117  $\mu\text{m}$  à partir de la surface) que dans celle de l'électrode 2D.

Pour rappel, l'observation microscopique en MEB d'une coupe transversale d'une électrode 3D a montré que le feutre d'épaisseur 5 mm était majoritairement colonisé en surface jusqu'à une profondeur moyenne de 500 µm sur chacune des faces.

Le biovolume est calculé comme suit :

$$\text{Biovolume} = \text{Taux d'occupation du biofilm} * \text{Volume occupé par le biofilm}$$

Pour le feutre, le volume occupé ( $x*y*z$ ) est la surface de l'électrode ( $6 \text{ cm}^2$ ) multipliée par la profondeur de pénétration du biofilm ( $z$ ), estimé à 500 µm sur chacune des faces =  $0.05*2*6 = 0.6 \text{ cm}^3$ . Le taux d'occupation étant de 16% en moyenne pour le feutre, le biovolume est alors estimé à :

$$\text{Biovolume (feutre)} = 16\% * 0.6 \text{ cm}^3 = 0.1 \text{ cm}^3$$

Pour le tissu, d'épaisseur ( $z$ ) 0.05 cm, le volume occupé par le biofilm est de :  $0.05 * 6 = 0.3 \text{ cm}^3$ . Le taux d'occupation étant de 34% en moyenne pour le feutre, le biovolume est alors estimé à :

$$\text{Biovolume (tissu)} = 34\% * 0.3 \text{ cm}^3 = 0.1 \text{ cm}^3$$

Ainsi il y a la même quantité de biofilm, c'est-à-dire de biocatalyseurs sur toutes les électrodes, ce qui peut expliquer que les performances électrochimiques soient similaires.

Contrairement à la supposition initiale, il n'y a donc pas de proportionnalité entre la surface spécifique disponible pour la formation du biofilm et l'épaisseur ( $z$ ) de l'électrode, puisque le cœur de l'électrode n'est pas colonisé, faute de pouvoir être atteint par les microorganismes.

### **3.3 Comparaison des populations microbiennes des biofilms formés sur tissu ou feutre de carbone**

En complément des résultats présentés dans l'article, les populations microbiennes des biofilm et des milieux ont été identifiées grâce au pyroséquençage des ARN 16S. La diversité microbienne d'un réacteur de contrôle (10 mL de biodéchets dilué dans 600 mL d'eau usée) a également été analysée pour comparaison.

Le prélèvement des différents échantillons analysés est représenté sur la Figure 35.

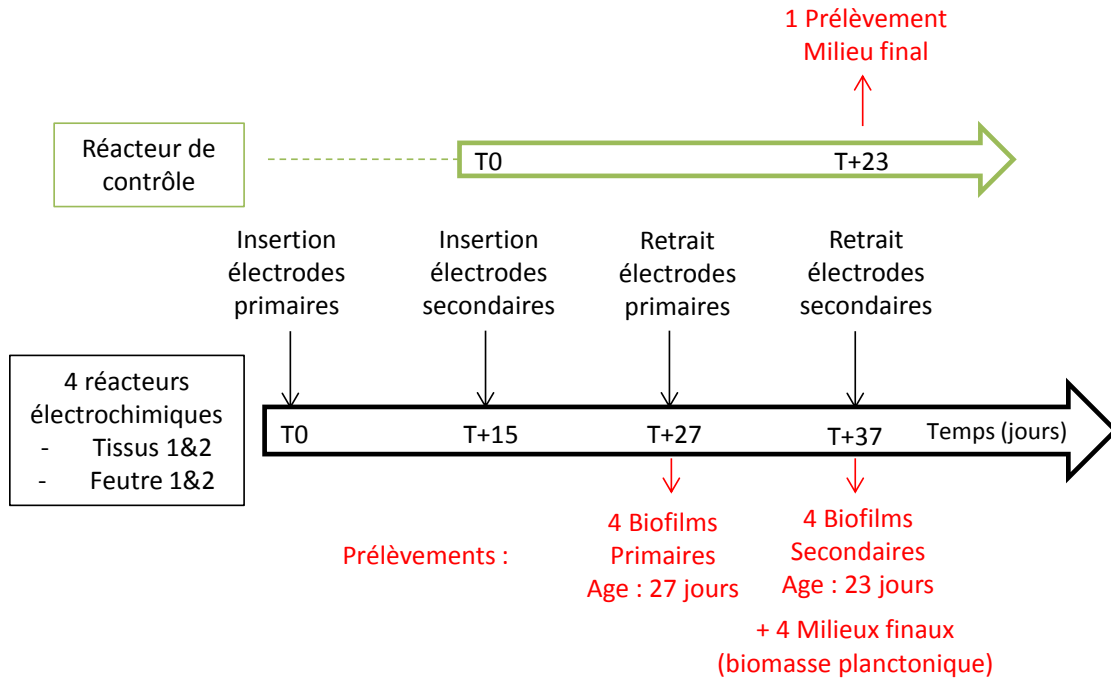


Figure 35 : Chronologie des différents prélèvements pour l'analyse de la population microbienne des biofilms et des milieux.

La population microbienne au niveau du phylum est donnée dans le Tableau 8, en pourcentage de la totalité des séquences identifiées. Les résultats obtenus avec les biofilms primaires ne sont pas donnés dans le tableau. L'analyse, en partie présentée au Chapitre 3 (section 3.5), a révélé que les populations obtenues étaient très similaires entre biofilms primaires et biofilms secondaires, sans effet de sélection particulière lorsque le substrat est du biodéchets dilué dans des eaux usées. Seuls les échantillons prélevés en fin d'expérience (biofilms secondaires et milieux finaux) sont présentés dans le tableau, ainsi que les populations présentes dans l'inoculum initial (boues activées) et celles du réacteur de contrôle (eau usée avec 10 mL de biodéchets) pour comparaison.

Le phylum des Proteobacteria est le plus abondant sur toutes les électrodes et dans la solution de tous les réacteurs, ainsi que dans le réacteur de contrôle. Parmi les Proteobacteria, les classes des  $\gamma$ - et  $\beta$ -Proteobacteria dominent clairement, surtout parmi les populations des biofilms. Les Bacteroidetes sont le second grand phylum dominant dans tous les échantillons. Aucune différence significative n'est observée entre les populations colonisant le tissu et celles colonisant le feutre. En fait, la diversité microbienne retrouvée dans les 4 réacteurs électrochimiques est proche de celle du réacteur de contrôle sans électrode, à l'exception des Bacteroidetes, dont l'enrichissement semble être favorisé dans les réacteurs électrochimiques (25% en moyenne contre seulement 6% dans le réacteur de contrôle). Ce phylum bactérien est un phylum majoritaire rencontré dans des échantillons provenant de station d'épuration (Ariesyady et al., 2007; Wagner et al., 2002) et a été introduit en quantité importante dans les réacteurs électrochimiques via notre inoculum initial de boues activées qui en comporte 38%. Le réacteur de contrôle n'ayant pas été inoculé avec les boues, il apparaît logique de ne pas retrouver autant de bactéries appartenant à ce phylum.



**Tableau 8 : Population microbienne des échantillons prélevés en fin d'expérience et analysés par pyroséquençage. Le tableau regroupe les analyses au niveau du phylum. Le sous-groupe des Proteobacteria (classe) est détaillé. Les résultats sont donnés en pourcentage des séquences totales identifiées.**

	Proteobacteria %					total	Bacteroidetes %	Firmicutes %	others
	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$	$\delta$	$\epsilon$				
Inoculum (Blanchet et al. 2015)	5	28	5	3	3	44.0	38	3	15.0
Réacteur de contrôle	1.8	7.1	64.5	0.1	2.0	75.5	6.0	10.8	7.7
Tissus 1	0.3	10.9	57.6	0.0	0.0	68.8	29.0	1.6	0.6
Milieu 1	3.9	41.4	6.7	0.0	0.1	52.1	23.6	17.3	7.0
Tissus 2	0.3	19.4	67.8	0.0	0.0	87.5	10.1	2.2	0.2
Milieu 2	2.4	15.8	32.3	0.0	0.6	51.1	19.9	25.7	3.3
Feutre 1	1.1	18.0	39.4	0.6	0.2	59.3	32.1	6.4	2.2
Milieu 3	1.4	7.0	30.9	0.0	11.3	50.6	29.6	17.0	2.8
Feutre 2	1.5	31.2	21.9	0.0	10.7	65.3	29.3	4.1	1.3
Milieu 4	0.8	3.2	13.1	0.0	11.2	28.3	23.9	34.2	13.6

En portant l'analyse au niveau des ordres, parmi les Proteobacteria, une majorité de Pseudomonadales et de Burkholderiales ont été identifiés, et au sein des Bacteroidetes, c'est une majorité de Flavobacteriales (Figure 36). Que ce soit sur tissu ou feutre de carbone, ces trois ordres sont majoritaires, ils représentent en moyenne  $75.3\% \pm 8.8\%$  de la population formant les biofilms. La diversité microbienne des populations planctoniques des milieux réactionnels est plus importante que celle des biofilms. En effet, les mêmes ordres (Pseudomonadales, Burkholderiales et Flavobacteriales) sont présents dans les milieux liquides, mais il faut leur adjoindre les Clostridiales, les Bacteroidales et les Lactobacillales pour atteindre également  $74.8\% \pm 9.6\%$  de la population totale identifiée. Ces ordres bactériens renferment majoritairement des bactéries hydrolytiques et fermentatives qui jouent probablement dans nos expériences un rôle important dans la biodégradation du biodéchet en acides gras volatils (AGVs). Les AGVs produits servent alors de substrat aux biofilms électroactifs adhérents à l'anode.

Globalement, entre les populations développées sur le tissu et celles développées sur le feutre, seule la distribution entre les 3 ordres majoritaires Pseudomonadales / Flavobacteriales / Burkholderiales est différente. Elle est répartie comme suit :

- Sur tissu : 48.1% / 19.5% / 13.7%
- Sur feutre : 18.8% / 27.5% / 24.3%

Le groupe des Flavobacteriales, relativement important à la fois dans les biofilms et dans les milieux des réacteurs électrochimiques, n'est pas détecté dans le réacteur de contrôle, ce qui peut indiquer que cet ordre bactérien est sélectionné et favorisé par l'électrode, et qu'il doit renfermer des espèces bactériennes pouvant utiliser cette électrode en tant qu'accepteur final d'électrons (bactéries électroactives). La prolifération des *Flavobacteria* associée à celle des *Pseudomonas* (Pseudomonadales) est connue pour causer le rancissement des produits alimentaires (Forsythe, 2011). Leur présence s'explique comme une réponse à la pression de sélection exercée par l'ajout répété de biodéchets qui contiennent exclusivement des produits alimentaires.

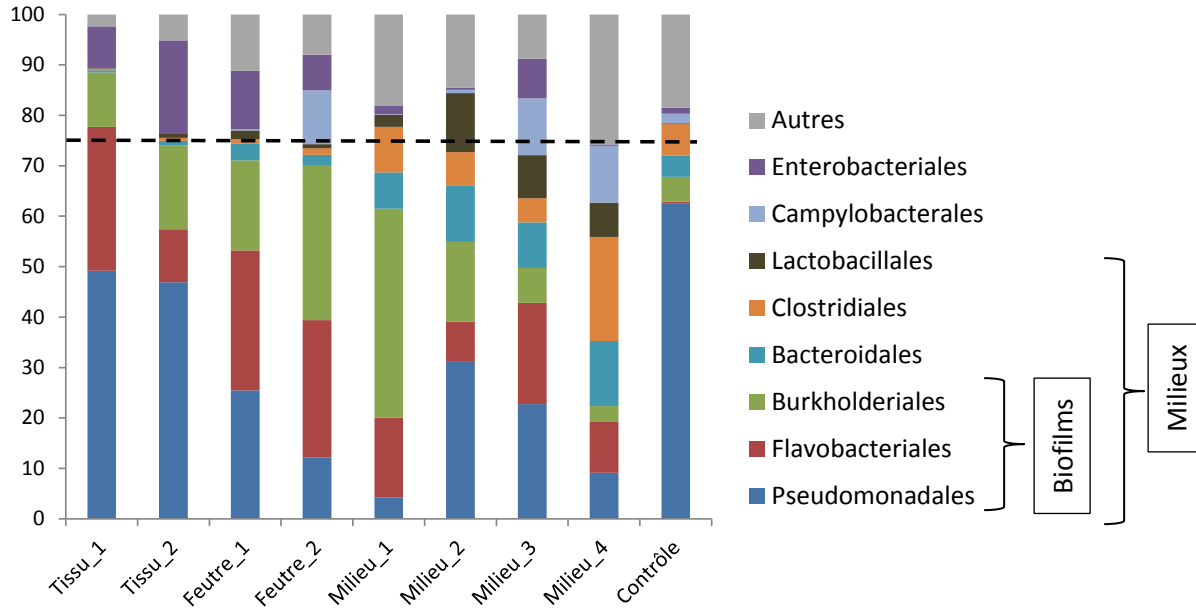


Figure 36 : Population microbienne en pourcentage des séquences totales identifiées au niveau taxonomique de l'ordre.

En progressant dans la classification taxonomique, au niveau du genre, *Acinetobacter* et *Pseudomonas* (appartenant à l'ordre des Pseudomonadales), *Chryseobacterium* (Flavobacteriales) et *Delftia* (Burkholderiales), couvrent 50% de la population totale des biofilms pour les 4 réacteurs (Figure 37). Sur les tissus, *Acinetobacter* et *Pseudomonas* sont majoritaires tandis que les genres *Delftia* et *Chryseobacterium* dominent les populations sur les feutres. Dans le réacteur de contrôle, Le genre *Acinetobacter* (45%) et le genre *Pseudomonas* (17%) sont également retrouvés, tandis que *Chryseobacterium* et *Delftia* ne représentent pas plus de 1% de la population totale identifiée.

Les espèces du genre *Acinetobacter* ont la particularité de pouvoir assimiler les AGVs et de les stocker sous forme de polyhydroxybutyrate (PHB), constituant alors une réserve d'énergie disponible en période de stress (Rustrian et al., 1997). Ce type de métabolisme donne un avantage compétitif à cette espèce, qui est capable de survivre, même lorsque les acides gras volatils du milieu sont tous consommés. De même, certaines espèces de *Delftia* isolée de boues activées (comme *Delftia acidovorans*, anciennement *Comamonas acidovorans*) peuvent produire du PHB à partir d'AGVs (Saito and Doi, 1994). Le genre *Pseudomonas*, quant à lui, est constitué de bactéries ubiquistes largement retrouvées dans l'environnement dans lequel elles participent activement aux cycles de dégradation (sites et sols pollués, eaux, denrées alimentaires...).

La comparaison des genres bactériens entre les biofilms formés sur tissu et sur feutre indique que le genre *Delftia* prolifère plus spécifiquement sur le feutre (20.8% en moyenne), alors qu'il ne représente que 2.4% sur les tissus et moins de 2% dans les milieux. Le rôle des *Delftia sp.* en relation avec le feutre de carbone est inconnu.

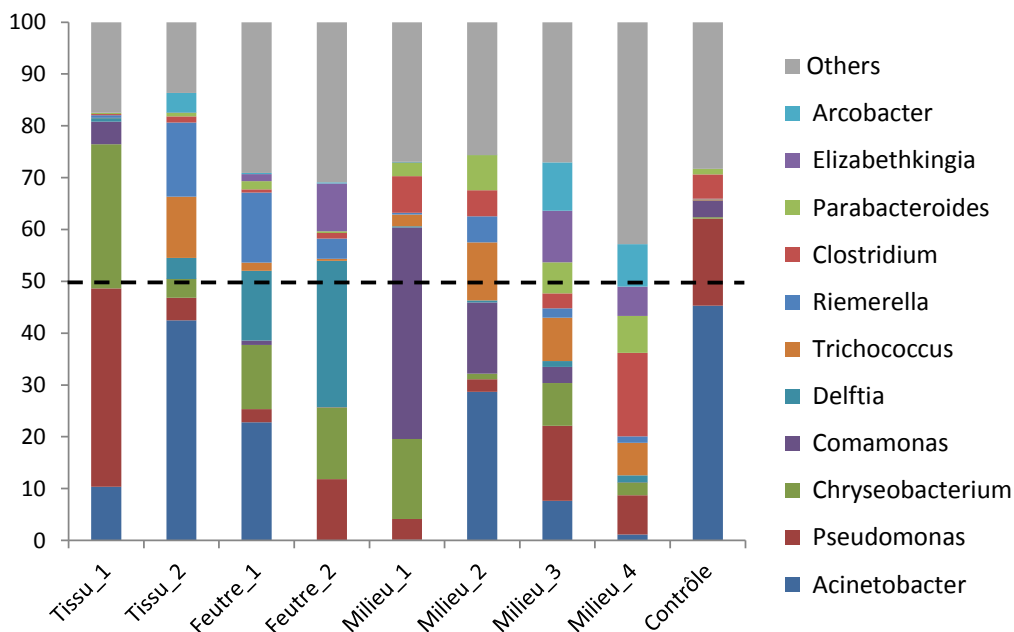


Figure 37 : Population microbienne en pourcentage des séquences totales identifiées au niveau taxonomique du Genre.

En conclusion, la comparaison des populations microbiennes entre les quatre réacteurs indique qu'il n'y a pas de différence significative entre les biofilms formés sur tissus et ceux formés sur feutres. Les espèces retrouvées au sein des biofilms ainsi que dans les milieux sont caractéristiques des espèces associées à la dégradation des produits d'origine alimentaire (*Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Chryseobacterium*, *Clostridium*...). Leur présence dans le milieu réactionnel et surtout leur enrichissement sur les anodes est sans nul doute imputable à l'utilisation du substrat « biodéchet » comme source de matière organique oxydable.

#### 4 Conclusions du chapitre 4 :

Finalement, les conclusions à retenir sur ce chapitre sont :

- Pour les bioanodes formées dans des eaux usées et alimentées avec des biodéchets, les performances obtenues sont les mêmes sur tissu de carbone ou feutre de carbone.
- Le postulat selon lequel les performances des bioélectrodes 3D sont supérieures doit être remis en question en fonction des conditions opératoires appliquées.
- La structure du biofilm sur l'électrode est un paramètre majeur qui contrôle les performances électrochimiques et peut annuler les avantages des électrodes tridimensionnelles poreuses.
- Le travail en conditions réelles (substrat complexe non synthétique) implique de prendre en compte l'encrassement et le colmatage potentiel de l'électrode par les particules et colloïdes du milieu.
- Le matériau d'anode employé doit avoir une surface hydrophile pour une meilleure colonisation de l'électrode par le biofilm.

- Pour les mêmes conditions opératoires, la même population microbienne se développe, que ce soit sur une électrode de tissu ou sur une électrode de feutre de carbone. Trois ordres étaient majoritaires : Pseudomonadales / Flavobacteriales / Burkholderiales qui sont caractéristiques des groupes bactériens associées à la dégradation des produits d'origine alimentaire.
- Pour le futur développement industriel, les électrodes 2D doivent être considérées comme étant une solution intéressante, particulièrement pertinente si l'objectif est de concevoir des électrodes constituées de plusieurs couches ou des ensembles membrane-électrode (Membrane Electrode Assembly – MEA).



# Chapitre 5 :

## L'électrosynthèse microbienne et les réactions cathodiques



## 1 Objectifs

Dans un procédé d'électrosynthèse microbienne, la génération des produits se fait le plus souvent à la cathode par catalyse microbienne. L'utilisation d'une bioanode permet de minimiser la différence de potentiel entre l'anode et la cathode et donc de minimiser l'énergie à fournir au système pour la production cathodique.

Après avoir développé une procédure pour la formation d'un biofilm électroactif capable d'oxyder les biodéchets en transférant les électrons extraits à l'anode, il convient maintenant de s'intéresser aux réactions du compartiment cathodique.

Le biofilm formé à la cathode doit permettre la réduction d'une source carbonée en molécules d'intérêts à partir des électrons fournis par la cathode. Dans le cadre du projet Biorare, la technologie de bioélectrosynthèse est couplée à une unité de méthanisation. Ainsi, le procédé peut tirer parti des effluents sortant de la digestion anaérobie en :

- déviant une fraction de biodéchets fermentés pour servir de substrat à l'anode
- utilisant le CO<sub>2</sub> issu de la méthanisation comme source de carbone à la cathode, pour la synthèse de molécules d'intérêts pour le marché de la chimie verte.

Il s'agit donc de réduire du dioxyde de carbone grâce au biofilm cathodique, pour la production de formiate, d'acétate ou d'autres molécules d'intérêts. Les molécules organiques visées par le procédé Biorare ont été définies par Suez-Environnement ; il s'agit de cinq molécules organiques d'intérêt, qui ne sont pas détaillées ici pour des raisons de confidentialité.

Ce chapitre est organisé en trois parties. Une première partie décrit une stratégie originale pour former un biofilm cathodique à partir d'une culture mixte pour la catalyse de la réduction du CO<sub>2</sub> seul ou du CO<sub>2</sub> et du fumarate. Dans une deuxième partie sont présentées les tentatives pour mettre en œuvre une culture pure du microorganisme modèle *Geobacter sulfurreducens*. Finalement, l'article « Importance of the hydrogen route in up-scaling electrosynthesis for microbial CO<sub>2</sub> reduction » publié dans le journal *Energy & Environmental Science* est inséré et commenté dans la dernière partie. Cet article met en évidence que la réduction microbienne du CO<sub>2</sub> dans le compartiment cathodique d'un réacteur électrochimique est souvent médiée par l'hydrogène. Dans ces conditions de transfert indirect d'électrons, le travail met en lumière l'intérêt de remplacer le bioréacteur électrochimique par un biocontacteur gaz-liquide alimenté en CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>.

## 2 Electrode réversible pour la formation d'un biofilm cathodique de réduction du CO<sub>2</sub>

Le développement d'un biofilm cathodique est lent et le biofilm formé est très peu épais, notamment sur les électrodes d'acier pour la réduction de l'oxygène (Erbil et al., 2010). Pour remédier au problème et obtenir un recouvrement plus important avec un biofilm plus épais, une stratégie consiste à former le

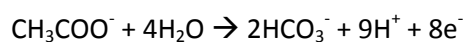


biofilm électroactif en condition hétérotrophe d'oxydation d'un substrat carboné (bioanode) avant de l'employer ensuite en condition cathodique.

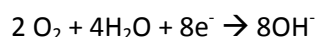
Il est supposé que les mêmes groupes de bactéries, qui peuvent échanger des électrons directement à l'anode, pourraient également catalyser des réactions cathodiques (Cheng et al., 2010). Par exemple, le microorganisme modèle *Geobacter sulfurreducens*, largement décrit et mis en oeuvre pour ses propriétés anodophiles (Bond and Lovley, 2003; Dumas et al., 2008), catalyse également la réduction du fumarate grâce aux électrons fournis par une cathode (Dumas et al., 2008; Gregory et al., 2004).

## 2.1 Electrode réversible pour la réduction d'oxygène à la cathode (Publication 3)

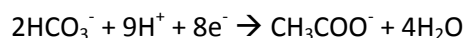
La stratégie de l'électrode réversible a déjà permis d'obtenir des biocathodes de réduction d'oxygène à partir d'une bioanode d'oxydation d'acétate, ce qui a fait l'objet d'une communication intitulée « Protons accumulation during anodic phase turned to advantage for oxygen reduction during cathodic phase in reversible bioelectrodes » publiée dans le journal *Bioresource Technology* (Publication 3 en ANNEXE 2). Dans cet article, nous avons montré que le même biofilm issu de lixiviat de terreau était capable de catalyser successivement les réactions d'oxydation d'acétate :



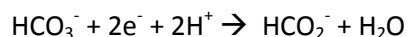
et de réduction d'oxygène :



Il est décidé de tenter d'adapter cette méthode d'électrode réversible pour former une cathode de réduction du  $\text{CO}_2$ . Le  $\text{CO}_2$  aqueux est un diacide. Il se dissocie en ions hydrogénocarbonates  $\text{HCO}_3^-$  ( $\text{pKa}(\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-)=6.3$ ) qui, lui-même se dissocie en ions carbonate  $\text{CO}_3^{2-}$  ( $\text{pKa}(\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-})=10.3$ ) selon le pH. Dans une gamme de pH entre 7 et 9, l'espèce prédominante en solution est l'ion hydrogénocarbonate. La réduction du  $\text{CO}_2$  pourrait par exemple aboutir à la formation d'acétate :



Ou à la formation de formiate :



## 2.2 Electrode réversible formée en milieu « terreau » pour la réduction du $\text{CO}_2$

Dans un premier temps, il est choisi de garder le terreau comme source de microorganismes, car il a déjà démontré son intérêt pour la formation d'électrodes réversibles.

Le dispositif utilisé est un réacteur à double compartiments (décrit dans le Chapitre 2). L'électrode de travail est en tissu de carbone ( $15\text{ cm}^2$ ) dans 600 mL de milieu « terreau » (lixiviat de terreau dans une solution de KCl, 60 mM). Cette surface d'électrode est plus grande que lors de nos travaux précédents sur l'anode, pour pouvoir détecter la présence de molécules organiques potentiellement produites à la cathode. En effet, il s'agit de maximiser la synthèse de molécules en maximisant le courant, et donc en

augmentant la surface d'électrode. La contre-électrode est une grille de platine de même surface plongée dans une solution à 60 mM de KCl. La référence au calomel, saturée (ECS) est placée à proximité de l'électrode de travail. Le séparateur entre les 2 compartiments est une membrane échangeuse de cations (Fumasep, FKE), pour éviter, ou tout au moins limiter, la perte d'acides organiques (acétate, formiate...) vers le compartiment de la contre-électrode.

Quatre réacteurs sont utilisés en parallèle et dans les mêmes conditions. L'électrode de travail est polarisée à -0.2 V/ECS. Les réacteurs sont placés dans une étuve à 40°C.

La formation du biofilm anodique est réalisée avec 3 ajouts successifs d'acétate (20 mM, 20mM puis 10 mM). Les résultats sont reproductibles avec des courants d'oxydation qui augmentent rapidement après 1.5 jours. Les densités de courant maximales de 2.8 à 4.6 A/m<sup>2</sup> sont obtenues après le deuxième ajout d'acétate, au 8ème jour (Figure 38). Notons que ces densités de courant sont de 4 à 7 fois inférieures à celles obtenues dans des réacteurs avec un seul compartiment et une surface d'électrode de 8 cm<sup>2</sup> dans les mêmes conditions, comme décrit dans la publication 3 (Annexe 2, Figure 1– 19A/m<sup>2</sup>).

L'hypothèse majeure qui explique les moins bonnes performances obtenues dans les réacteurs à double compartiment est l'acidification du milieu, liée à la réaction anodique d'oxydation d'acétate qui n'est pas compensée par la réaction à la contre-électrode, contrairement à la mise en œuvre dans un réacteur à compartiment unique. En effet, 3 jours après le deuxième ajout d'acétate, le pH diminue jusqu'à 5.9 dans le compartiment anodique du réacteur double-compartiments (Figure 38) alors qu'il est de 8.2 dans le réacteur simple (Annexe 2, Figure 1). Le pH faible inhibe l'activité microbienne et n'est pas favorable à la réaction anodique d'un point de vue thermodynamique.

Tout comme dans la publication 3, les rendements faradiques sont faibles : 15±2% pour le premier pic et 21 ± 4% pour les deuxièmes et troisième pics. Ces valeurs correspondent au ratio entre l'acétate consommé par le processus dit de respiration anodique (qui utilise l'anode comme accepteur d'électrons) et les autres processus métaboliques de consommation d'acétate utilisant des accepteurs d'électrons alternatifs. Comme discuté ailleurs (Cercado et al., 2013), un milieu riche tel que le lixiviat de terreau contient des accepteurs d'électrons alternatifs (nitrate, sulfate, etc.). Par ailleurs, l'oxygène dissous a sans doute joué un rôle particulièrement important ici, car le réacteur double-compartiments est très peu étanche au gaz et aucune précaution autre que les 15 minutes initiales de bullage d'azote n'a été prise durant la phase anodique pour assurer l'anaérobiose. La présence d'oxygène dissous est visible sur les voltammétries initiales présentant une importante vague de réduction de l'oxygène (Figure 39A). Cette réduction abiotique commence à partir de -0.25V/ECS, puis est limitée par la diffusion de l'oxygène avec des densités de courant maximales de 400 à 500 mA/m<sup>2</sup>.

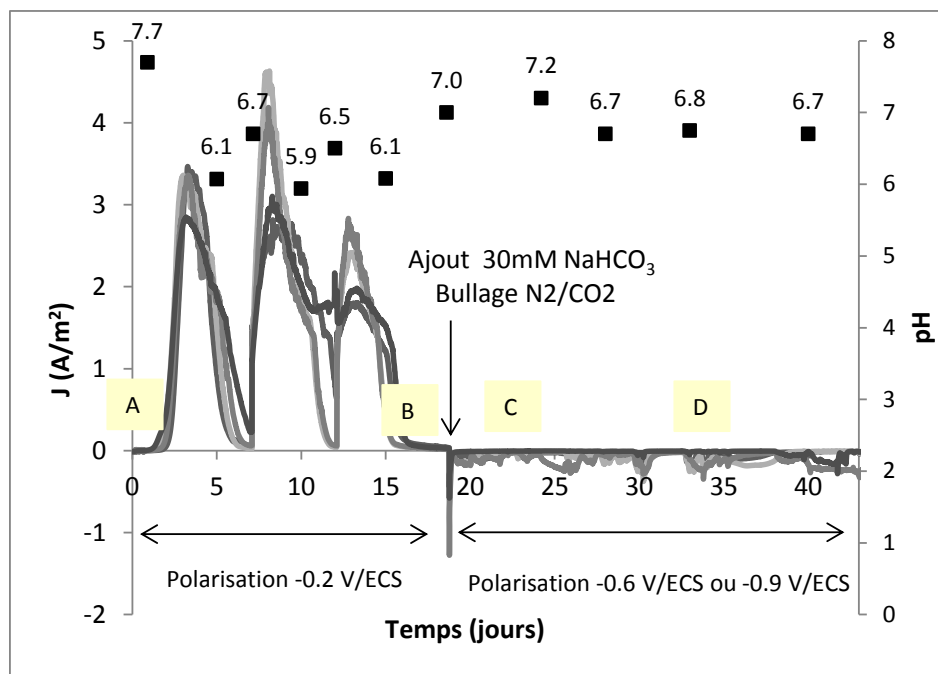


Figure 38 : Mise en œuvre de la stratégie « électrode réversible » dans un milieu terreau pour la formation d'un biofilm de réduction du  $CO_2$ . Evolution des densités de courant pour les 4 réacteurs en parallèle. En phase anodique pendant les 19 premiers jours les réacteurs sont alimentés en acétate et l'électrode de travail polarisée à  $-0.2$  V/ECS. Dans la phase cathodique qui suit, les réacteurs sont alimentés en  $CO_2$  et les électrodes polarisées à  $-0.6$  V/ECS pour 2 des réacteurs et  $-0.9$  V/ECS pour les 2 autres. Le pH est suivi tout au long de l'expérience pour le réacteur 4, représentatif de l'ensemble des réacteurs. Les lettres A,B,C et D correspondent aux moments où sont effectuées les voltammétries cycliques, présentées en Figure 39.

Après 19 jours lorsqu'il n'y a plus d'acétate dans le milieu et que le courant est revenu à zéro, 30 mM de carbonate de sodium sont ajoutés et un flux gazeux de  $N_2-CO_2$  est injecté dans le réacteur à l'aide d'une canne plongeante. Le potentiel de l'électrode de travail est fixé à  $-0.6$  V/ECS dans 2 réacteurs, et à  $-0.9$  V/ECS dans les 2 autres réacteurs. Des prélèvements de milieux sont effectués dans tous les réacteurs aux jours 19, 23, 26, 29 et 33 pour des analyses HPLC.

Les voltammétries effectuées en fin de phase anodique (Figure 39B) montrent un système redox centré autour de  $-0.4$  V/ECS. Ce système correspond à l'équipement redox du biofilm qui assure le transfert des électrons extraits de l'acétate vers l'anode. Le biofilm formé est donc électroactif et constitue un catalyseur efficace puisque son potentiel redox ne se situe qu'à environ 130 mV de celui de l'oxydation de l'acétate ( $E^{0'}_{CO_2/acétate} = -0.53$  V/ECS à pH 7 – cf Chapitre 1).

Pendant la phase cathodique, que ce soit aux potentiels de  $-0.6$  V ou  $-0.9$  V/ECS, très peu de courant de réduction est observé. En fait, le courant varie entre 25 et  $100$   $mA/m^2$  au potentiel de  $-0.6$  V et entre 50 et  $250$   $mA/m^2$  au potentiel de  $-0.9$  V. Ce courant est corrélé aux fluctuations du pH, qui varie à cause des variations de débit de l'alimentation en  $N_2-CO_2$ . Le flux de gaz était difficile à réguler car l'alimentation des réacteurs est effectuée en parallèle avec une seule vanne de réglage sur l'arrivée du gaz. Avec ce système, des dérèglements peuvent survenir qui ont pour conséquence l'arrêt du bullage dans certains réacteurs pendant que le débit de gaz augmente pour les autres réacteurs.

L'augmentation du flux de dioxyde de carbone se traduit par une acidification du milieu tandis que la diminution du flux gazeux entraîne une augmentation du pH et une augmentation en oxygène dissous.

On observe que le courant de réduction diminue (en valeur absolue) suite à une augmentation du flux de  $N_2-CO_2$ . Ainsi, il peut être conclu que les faibles courants de réduction observés ne correspondent pas à la réduction du  $CO_2$ , mais plus probablement à la réduction d'oxygène dissous, voire à la réduction de l'eau pour les réacteurs avec la cathode polarisée à -0.9 V/ECS.

Par ailleurs, aucune molécule n'est détectée en HPLC, ce qui indique l'échec de la synthèse de molécules organiques.

Les voltammétries cycliques réalisées durant la phase cathodique aux jours 22 (Figure 39C) et 33 (Figure 39D) montrent que le système redox présent en fin de phase anodique est toujours présent 3 jours après le passage en condition cathodique puis disparaît presque après 14 jours. Les systèmes redox en jeu pour l'oxydation de l'acétate ne sont plus utilisés, ce qui peut expliquer qu'ils ne soient plus accessibles pour l'électrode. La vague de réduction de l'oxygène disparaît, suite au bullage de gaz  $N_2-CO_2$  qui permet une meilleure anaérobiose. Le début d'une vague de réduction à -0.8 V/ECS correspond à la réduction de l'eau.

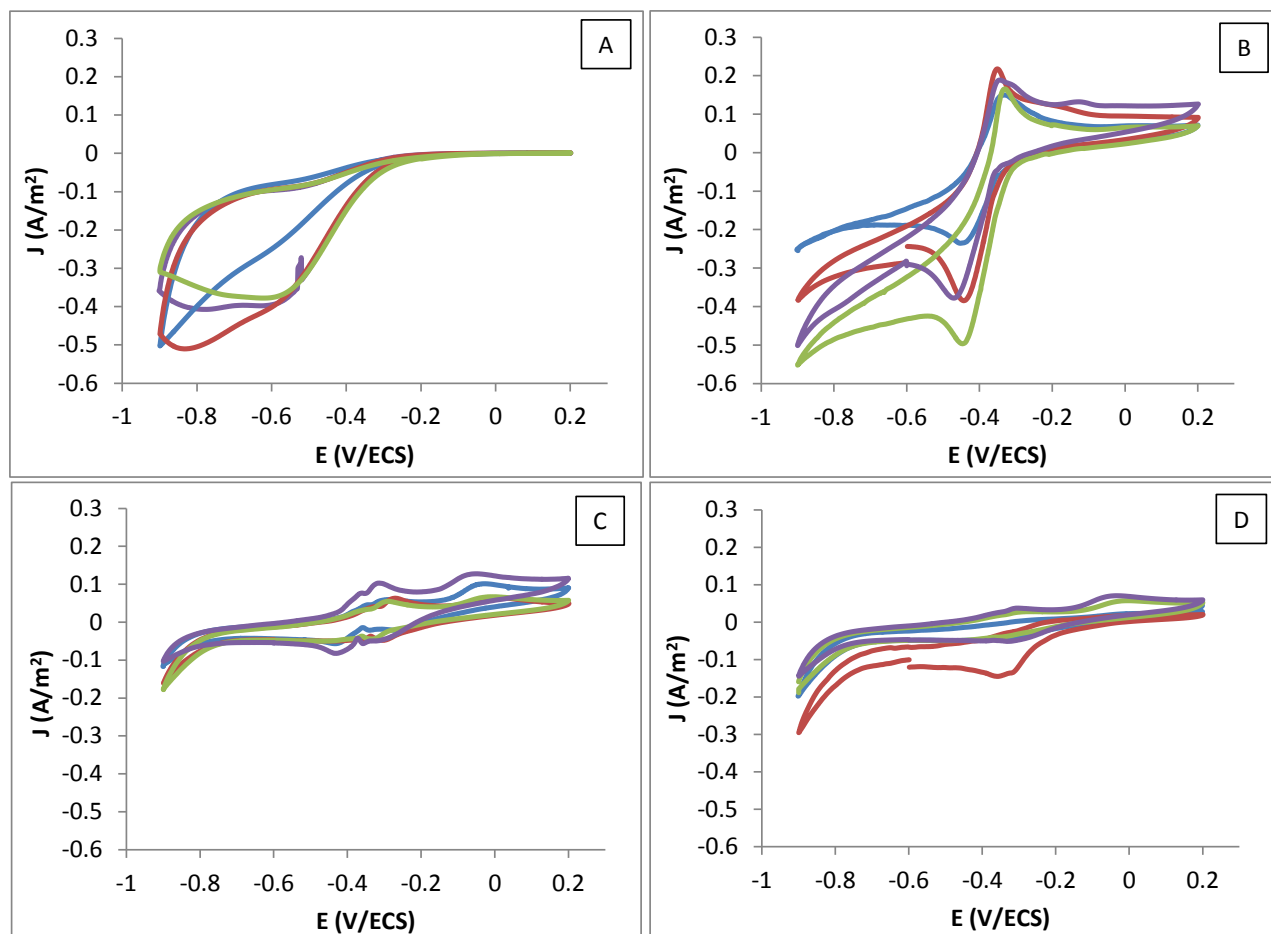


Figure 39 : Voltammétries cycliques réalisées à la vitesse de 1 mV/s pour les 4 réacteurs au temps initial sur les électrodes vierges (A), après 19 jours de formation des biofilms en conditions anodiques (B), 3 jours après avoir remplacé les conditions anodiques par des conditions cathodiques (C), 14 jours après avoir remplacé les conditions anodiques par des conditions cathodiques (D). Les conditions anodiques correspondent à un potentiel de -0.2 V/ECS et une alimentation en acétate. Les conditions cathodiques correspondent à un potentiel de -0.6 V/ECS ou -0.9 V/ECS et une alimentation en carbonate ainsi qu'un flux gazeux de  $N_2$ - $CO_2$ .

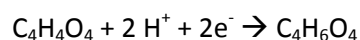
L'utilisation d'une électrode colonisée par un biofilm électroactif catalysant l'oxydation de l'acétate en  $CO_2$  n'a pas permis de catalyser la réaction inverse de réduction du  $CO_2$ , même dans des conditions thermodynamiquement favorable à cette réduction.

Cette stratégie originale de l'électrode réversible n'a pas permis d'obtenir des cathodes de réduction du  $CO_2$  à partir de l'inoculum « lixiviat de terreau ». On peut penser que le type de métabolisme recherché, celui des bactéries autotrophes facultatives (par exemple, *Pseudomonas*) ne s'est pas exprimé. L'étude a été poursuivie en changeant l'inoculum terreau par un inoculum de boues biologiques.

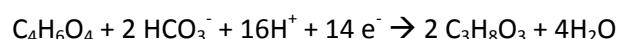
### 2.3 Electrode réversible formée à partir d'un inoculum provenant de boues pour la réduction du fumarate et du $CO_2$

La réduction du  $CO_2$  par un biofilm grâce aux électrons fournis par une cathode a déjà été mise en évidence au laboratoire. Cependant, cette réduction n'a pas été montrée pour un organisme autotrophe

utilisant le CO<sub>2</sub> comme seule source de carbone mais pour *Geobacter sulfurreducens*, avec le CO<sub>2</sub> associé au fumarate comme accepteur d'électrons. *G. sulfurreducens* ne peut pas croître en autotrophie (Coppi et al., 2004; Mahadevan et al., 2006; Speers and Reguera, 2012), mais il a été montré que la réduction du fumarate et du CO<sub>2</sub>, qui aboutit à la production de glycérol, correspond à la fixation de 2 moles de CO<sub>2</sub> par mole de fumarate (Soussan et al., 2013). Il s'agirait en fait d'une succession de 2 réactions métaboliques utilisant la cathode comme donneur d'électrons. La première est la réduction du fumarate en succinate :



et la deuxième serait la réduction du succinate et du CO<sub>2</sub> en glycérol :



Les courants de réduction du fumarate et du CO<sub>2</sub> étaient reproductibles et atteignaient 30 A/m<sup>2</sup> sur des électrodes en acier à un potentiel de -0.53 V/ECS. Ces densités de courant sont les densités maximales obtenues avec une biocathode polarisée à un potentiel qui exclue l'évolution de l'hydrogène.

Pour répondre à l'objectif initial de formation d'une biocathode de fixation du CO<sub>2</sub>, il est décidé de tenter de reproduire cette réduction concomitante de fumarate et de CO<sub>2</sub> en travaillant avec une culture mixte, riche en bactéries électroactives de la famille des *Geobacteraceae*.

La stratégie adoptée est la suivante :

- Former une bioanode, polarisée à +0.1 V/ECS, alimentée en acétate dans les conditions optimales avec la méthode de sélection décrite au chapitre 3, pour obtenir un biofilm épais et riche en *Geobacteraceae*.
- Changer la polarisation de l'anode à -0.6 V pour la transformer en cathode en remplaçant l'alimentation en acétate par une alimentation en CO<sub>2</sub> et fumarate.

Deux séries d'expériences sont réalisées dans les conditions définies au chapitre 3 pour la formation de bioanodes : les réacteurs utilisés ont un compartiment unique avec une électrode de travail en tissu de 6 cm<sup>2</sup> dans le milieu synthétique S1 pour la phase anodique puis le milieu synthétique S2 pour la phase cathodique.

### 2.3.1 Résultats pour la première série d'expériences

Sur la Figure 40 sont présentées l'évolution des densités de courant pour les électrodes réversibles des deux réacteurs en duplicat. La première phase anodique a permis de former un biofilm capable d'utiliser l'électrode pour l'oxydation de l'acétate avec une densité de courant jusqu'à 20 A/m<sup>2</sup>.

Les conditions sont basculées en phase cathodique au jour 41 : le milieu est changé avec un milieu propre S2 correspondant au milieu de culture de *Geobacter* avec des carbonates (30 mM) et 25 mM de fumarate. Un flux de N<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> est injecté dans les réacteurs. La polarisation de l'électrode est changée de +0.1 V/ECS à -0.6 V/ECS. Un courant de réduction apparaît alors dans les deux réacteurs. Ce courant est plus important pour le premier réacteur (R1) et atteint 3 A/m<sup>2</sup> en 1.5 jours. Cependant le courant de

réduction revient très rapidement à zéro pour les deux réacteurs. La charge passée entre la cathode et le biofilm, relevée en intégrant la densité de courant est d'environ 200 Coulomb pour le réacteur R1 et 40 Coulomb pour R2. Cela correspond à la charge nécessaire pour la réduction de la concentration en fumarate calculée selon la formule :

$$[\text{fumarate}] = Q / nFV$$

avec Q = la charge transférée en Coulombs (200 et 40 Cb, pour R1 et R2) ; n = nombre d'électrons transférés par mole de fumarate réduite (2) ; F = la constante de Faraday (96 485 C/mol) ; V = le volume de milieu (0.6L) ; soit 1.7 et 0.34 mM respectivement pour R1 et R2.

Un maximum de 1.7 mM de fumarate sont donc réduits grâce aux électrons fournis à la cathode, soit seulement 6.8% de la quantité de fumarate introduite (25 mM). A partir du jour 43, plus aucun courant n'est détecté au potentiel de -0.6 V/ECS.

Les voltammétries effectuées aux jours 44 et 48 (Figure 41), montrent l'oxydation d'un composé à partir de -0.4 V/ECS pour les deux réacteurs, jusqu'à 7 A/m<sup>2</sup> au potentiel de -0.2 V/ECS pour R1 au jour 44 (CV-B). La densité de courant maximale diminue ensuite au jour 48, ce qui semble indiquer que le composé oxydé dans le milieu s'épuise. Compte tenu du potentiel auquel il est oxydé, le composé est probablement de l'acétate. Cette hypothèse est rapidement confirmée grâce au dosage par HPLC des métabolites présents dans le milieu, qui indique la présence d'acétate jusqu'à 13 mM (Figure 42).

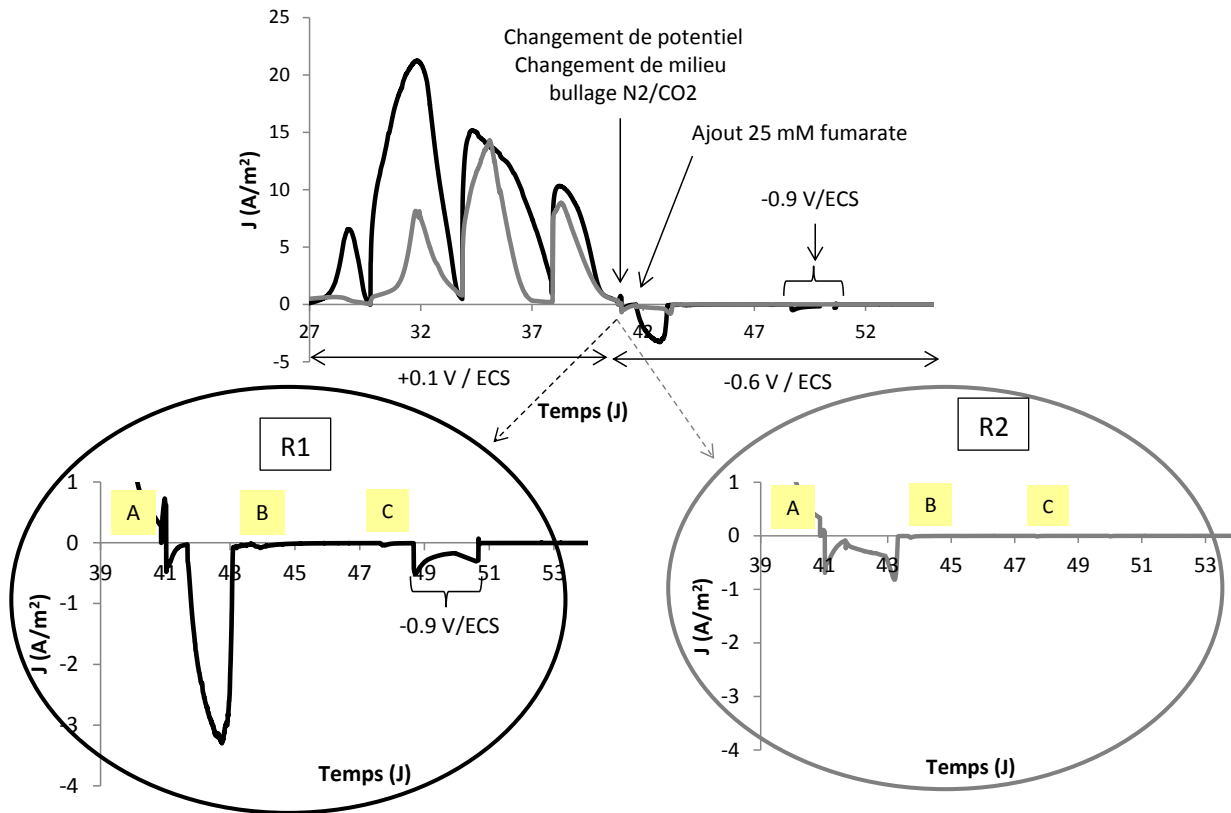


Figure 40 : Evolution des densités de courant pour deux électrodes formées selon la méthode en 3 étapes (décrite au chapitre 3) à partir de boues biologiques. Au jour 41, la bioanode d'oxydation d'acétate est transformée en biocathode de réduction du fumarate. Zoom sur la réduction entre les jours 39 et 53. Les lettres A,B,et C correspondent aux moments où sont effectuées les voltammétries cycliques, présentées Figure 41.

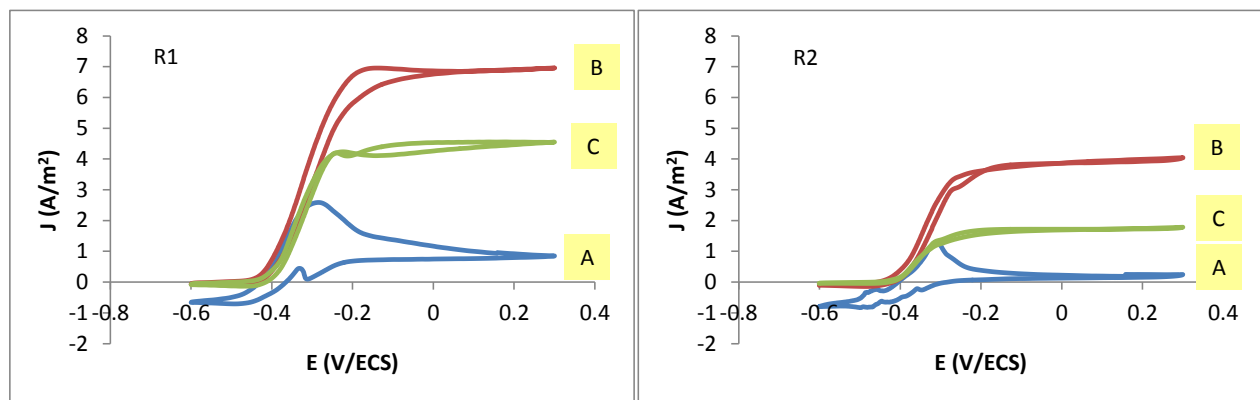


Figure 41 : Voltammétries cycliques enregistrées à 1 mV/s pour les électrodes réversibles colonisées par un biofilm électroactif lors d'une phase anodique préalable. (A) CV en fin de phase anodique ; (B) CV effectuée 3 jours après le passage en conditions cathodiques (potentiel de -0.6V/ECS et ajout de fumarate) ; (C) CV effectuée 7 jours après le passage en conditions cathodiques



Les analyses HPLC permettent de suivre la consommation de fumarate et la production de métabolites dans le milieu (Figure 42).

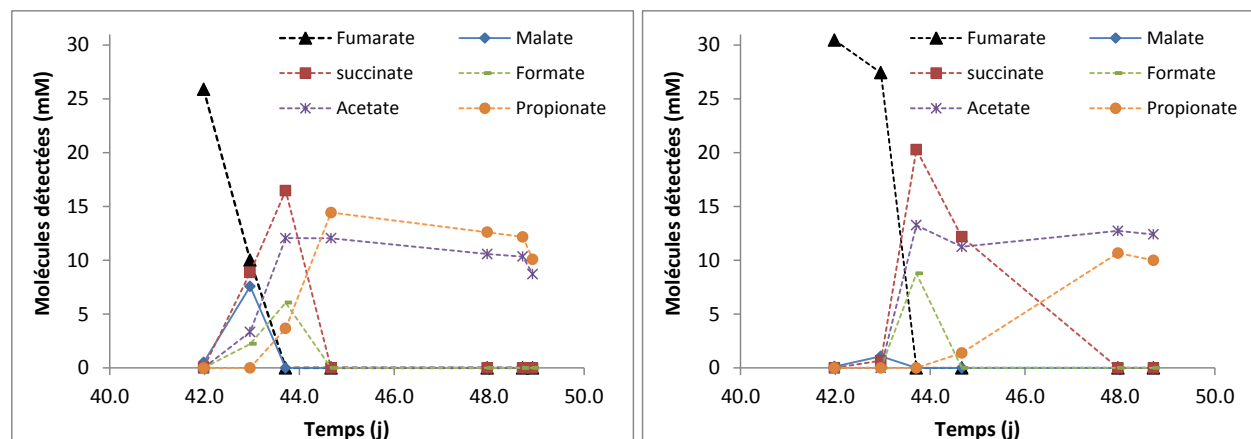


Figure 42 : Evolution des concentrations mesurées par HPLC durant la phase cathodique à  $-0.60$  V/ECS pour les réacteurs R1 et R2, avec une électrode réversible colonisée par un biofilm électroactif lors d'une phase anodique préalable.

La diminution du courant de réduction correspond à l'épuisement du fumarate. Celui-ci est entièrement consommé en 2 jours, mais seulement 6.8% et 1.3% du fumarate introduit est réduit à l'électrode pour R1 et R2 respectivement.

Il semble donc que le biofilm trouve rapidement un donneur alternatif d'électrons dans le milieu. Par ailleurs, les mêmes métabolites sont retrouvés après un renouvellement du milieu avec 25 mM de fumarate et sans polariser l'électrode (laissée en circuit ouvert). Les réactions sont donc indépendantes de la polarisation de l'électrode.

Du succinate mais également du malate, du formiate, de l'acétate et du propionate ont été quantifiés dans les milieux. En revanche, aucune trace de glycérol n'a été détectée. Les travaux reportés précédemment (Soussan et al., 2013) supposaient que le glycérol était stocké à l'intérieur des cellules microbiennes et n'était libéré qu'à la faveur d'un stress, en l'occurrence une augmentation du potentiel qui ne permettait plus aux cellules d'utiliser la cathode comme source d'électrons. Ici aucune trace de glycérol n'a été détectée même après le stress infligé au jour 49 dans le réacteur R1. Les produits finaux indiquent que la réaction attendue de réduction du succinate et du  $\text{CO}_2$  en glycérol n'a pas eu lieu.

La réduction initiale du fumarate en succinate peut être attribuée à des protéobactéries de la famille des *Geobacter*, mais la production concomitante de malate, acétate et formiate fait intervenir des voies cataboliques d'autres microorganismes. La production de propionate semble correspondre à la reconsumation du succinate : cette conversion est une réaction de décarboxylation génératrice d'énergie.

Ces observations suggèrent que plusieurs voies métaboliques entrent en jeu impliquant plusieurs groupes bactériens, ce qui ne permet pas de faire la synthèse désirée à la cathode. L'acétate et le propionate sont les produits finaux des réactions métaboliques mises en jeu.

### 2.3.2 Résultats pour la deuxième série d'expériences

Une nouvelle tentative avec une série de trois nouveaux réacteurs est entreprise, en préparant des bioanodes avec la méthode de sélection et en ne passant à la phase cathodique que lorsqu'une densité de courant d'au moins  $20 \text{ A/m}^2$  a été atteinte. Il a été montré précédemment que l'enrichissement du biofilm en bactéries de la famille des *Geobacteraceae* était corrélé aux performances anodiques (Blanchet et al., 2015). L'objectif est donc d'obtenir une proportion plus importante de *Geobacter sp.* dans le biofilm, avant de passer à la phase de réduction du fumarate et du  $\text{CO}_2$ . L'inoculum est de la boue biologique prélevée le jour même du démarrage de l'expérience dans le bassin aéré de la station d'épuration de Castanet (31).

Des densités de courant de 25 à  $35 \text{ A/m}^2$  (Figure 44) ont été atteintes en 20 à 30 jours pour les bioanodes alimentées en acétate et une teinte rouge est apparue (Figure 43).

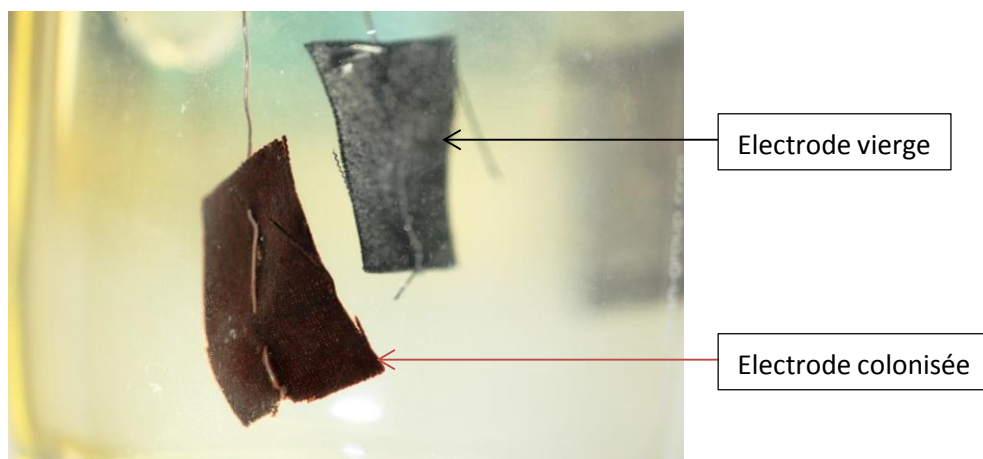


Figure 43 : La bioanode colonisée avec des performances catalytiques maximales de  $35 \text{ A/m}^2$  prend une teinte rouge.

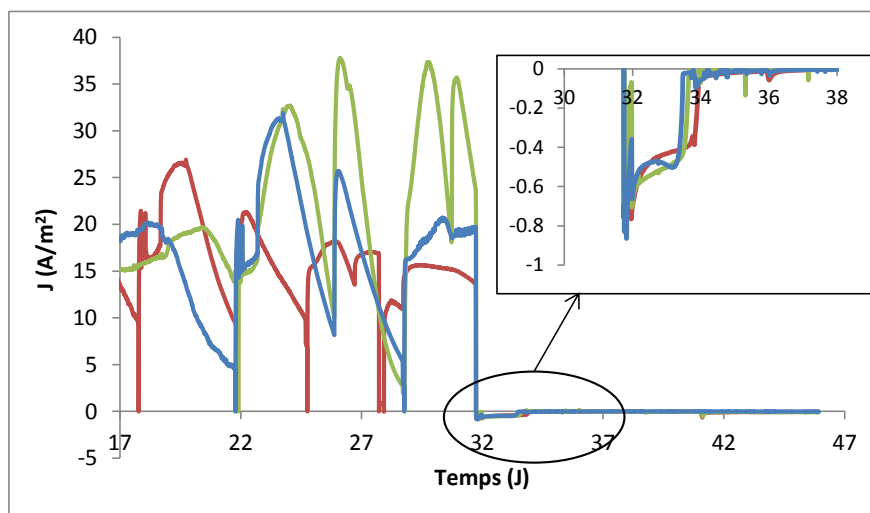


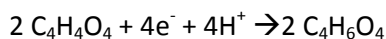
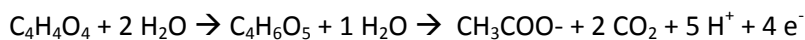
Figure 44 : Evolution des densités de courant pour les électrodes secondaires d'une série de trois réacteurs. L'électrode est d'abord polarisée à  $+0.1 \text{ V/ECS}$  pendant 32 jours avec une alimentation en acétate, puis le potentiel est changé à  $-0.6 \text{ V/ECS}$  avec une alimentation en fumarate.

Au jour 32, le milieu est remplacé par un milieu propre S2 et un flux de N<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> alimente le réacteur. 25 mM de fumarate sont ajoutés. Un courant de réduction de 0.8 A/m<sup>2</sup> est obtenu pour les trois réacteurs mais le courant revient à zéro en 48h.

Les analyses des métabolites des milieux révèlent les mêmes résultats que pour les expériences de la série 1 : la consommation rapide du fumarate en 2 jours et la production simultanée de succinate, malate, formiate et acétate. Le malate est un intermédiaire reconstitué très rapidement qui n'est plus détecté lorsque le fumarate est épuisé. Le formiate et le succinate sont reconstitués en moins de 8 jours. La consommation du succinate est concomitante à la production de propionate. L'acétate et le propionate sont les produits finaux. Ainsi, sur les trois expériences en triplicat, l'introduction de 23 ± 2 mM de fumarate (correspondant à 92 mM de carbone) abouti à la formation de 9 ± 1 mM d'acétate (18 mM de carbone) et 13 ± 1 mM de propionate (39 mM de Carbone). Ainsi 62% du carbone introduit se retrouve dans les produits finaux, et le reste est soit intégré dans la biomasse soit respiré pour la maintenance. L'acétate n'est pas reconstitué, sauf si le potentiel de l'électrode est de nouveau changé au potentiel de +0.15 V/ECS, qui lui permet d'être un accepteur d'électrons.

La réduction du fumarate et du CO<sub>2</sub> en glycérol avec l'électrode comme donneur d'électrons ne paraît pas possible en culture mixte, même après une étape de sélection de bactéries électroactives de la famille des *Geobacteraceae*.

L'utilisation du fumarate en tant qu'accepteur d'électrons (respiration du fumarate) peut, suivant les conditions de culture, se rencontrer chez une multitude de microorganismes. Il peut être réduit en succinate ou hydraté en malate. Pour forcer l'utilisation des électrons de la cathode, aucun donneur d'électron n'avait été ajouté dans le milieu. Pourtant le fumarate a bien été réduit en succinate et seul 1.5% des électrons nécessaires ont été apportés par la cathode. On peut supposer une réaction de dismutation du fumarate en succinate acétate et CO<sub>2</sub>, comme décrit chez *Clostridium formicoaceticum* (Dorn et al., 1978). Dans leur étude, (Dorn et al., 1978) précisent que les microorganismes pouvant fermenter le fumarate seul sont rares mais citent néanmoins en exemple *Enterobacter aerogenes* ou encore *Desulfovibrio gigas*. Les demi- réactions pour la dismutation du fumarate sont proposées comme suit :



Ce qui donne la réaction suivante : 3 fumarate + 2H<sub>2</sub>O → 2 succinate + acétate + 2 CO<sub>2</sub> + H<sup>+</sup>

Cette réaction prévoit la production de 15 mM de succinate et 8 mM d'acétate à partir de 23 mM de fumarate, ce qui est plausible compte tenu des dosages HPLC.

La piste de l'électrode réversible est donc abandonnée, car elle ne permet ni l'utilisation de la cathode par un biofilm, ni la synthèse de glycérol désirée. Il est décidé d'utiliser une culture pure de *Geobacter sulfurreducens*.

### 3 Mise en œuvre de *Geobacter sulfurreducens*

L'objectif est de reproduire les résultats obtenus précédemment au laboratoire (Soussan et al., 2013) pour la réduction du  $\text{CO}_2$ , mais en utilisant un réacteur à double compartiments afin d'isoler la contre-électrode pour vérifier que celle-ci n'influence pas les réactions qui ont été montrées précédemment à l'anode. Il a en effet été rapporté que la contre-électrode de platine était également colonisée par *Geobacter sulfurreducens* lors des cultures en réacteurs électrochimiques avec un seul compartiment.

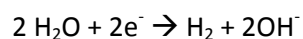
L'électrode de travail est polarisée à  $-0.6 \text{ V/ECS}$ . Deux matériaux sont testés : une électrode en tissu de carbone de  $6 \text{ cm}^2$  ou une électrode en acier inoxydable de  $20 \text{ cm}^2$  (plaque d'épaisseur  $0.1 \text{ cm}$  en acier 254SMO). L'électrode de référence est insérée proche de l'électrode de travail et la contre-électrode est une grille de platine positionnée dans l'autre compartiment, séparé par une membrane échangeuse de cations. Chaque élément est stérilisé séparément, et le montage est réalisé sous un poste de sécurité microbiologique (PSM) avant d'être placé dans une étuve à  $30^\circ\text{C}$ . L'anaérobiose est assurée par un flux de  $\text{N}_2\text{-CO}_2$  dans le compartiment cathodique inoculé et un flux de  $\text{N}_2$  dans le compartiment abiotique de la contre-électrode. Ces flux subissent des variations liées aux fluctuations sur le réseau. La Figure 45 présente le dispositif avant inoculation. Le milieu utilisé est le milieu de référence pour *Geobacter* (Milieu S2). Initialement  $35 \text{ mM}$  de fumarate sont ajoutés.



Figure 45 : Réacteur à double-compartiments utilisés pour la culture de *Geobacter sulfurreducens*. L'inoculum est introduit dans le compartiment cathodique. L'électrode de travail est une électrode en tissu de  $6 \text{ cm}^2$  ou une plaque d'acier inoxydable de  $20 \text{ cm}^2$  polarisée à  $-0.6 \text{ V/ECS}$ . L'électrode de référence (ECS) est insérée proche de l'électrode de travail et la contre-électrode est une grille de platine positionnée dans l'autre compartiment, séparé par une membrane échangeuse de cations.

Malheureusement, nos systèmes n'ont pas permis un travail en conditions totalement stériles et les réacteurs sont constamment contaminés, même avec un taux d'inoculation à 10%. A plusieurs reprises l'inoculum lui-même est suspecté d'être contaminé, car un flacon témoin stérile, préparé dans les mêmes conditions que les précultures, se trouble après 6 jours à 30°C.

A -0.6 V/ECS, aucun courant n'est détecté sur acier, et seul un faible courant est détecté sur tissu alors que le fumarate est entièrement consommé et transformé en malate et succinate dans les deux cas. Succinate et acétate sont les produits finaux et le succinate n'est pas converti en propionate comme c'était le cas avec un biofilm de culture mixte (section V.1.2). Les faibles courants détectés sur tissu correspondent à un rendement faradique de 2 à 6% par rapport au fumarate introduit. La grande majorité du fumarate est donc consommée sans utiliser la cathode comme donneur d'électrons. Compte tenu de la variation de la densité de courant obtenue sur tissu (Figure 46), il semble qu'il y ait tout de même la catalyse biologique d'une réaction de réduction à la cathode. Il est probable que cette réduction soit la réduction de l'eau, via les hydrogénases d'un microorganisme contaminant, selon :



Après l'enregistrement de voltammétries cycliques au jour 12, le courant de réduction revient rapidement à zéro. Le biofilm ou les enzymes ont probablement été écartés ou désactivés en surface du tissu. Le courant se rétablit après une nouvelle inoculation, et revient à zéro lorsque le fumarate est épuisé dans le milieu. La production d'hydrogène serait donc dépendante de la présence de fumarate. On peut supposer qu'il existe une syntrophie entre un catalyseur de production d'hydrogène à l'électrode et un consommateur d'hydrogène dans le milieu pour la réduction du fumarate. Lorsque le fumarate est épuisé, l'hydrogène n'est plus consommé et la catalyse de sa production s'arrête alors faute de conditions thermodynamiquement favorables. Il n'est également pas impossible que les ions phosphates du milieu soit impliqués dans la catalyse, comme cela a déjà été démontré (Da Silva et al., 2004; De Silva Muñoz et al., 2007; Munoz et al., 2010).

Il convient de noter que seul 2 à 6% de la consommation du fumarate peut être associée à l'utilisation de l'hydrogène produit, compte tenu des rendements faradiques calculés plus hauts. Il faut donc faire l'hypothèse de la réduction du fumarate via d'autres donneurs d'électrons non identifiés ou par dismutation.

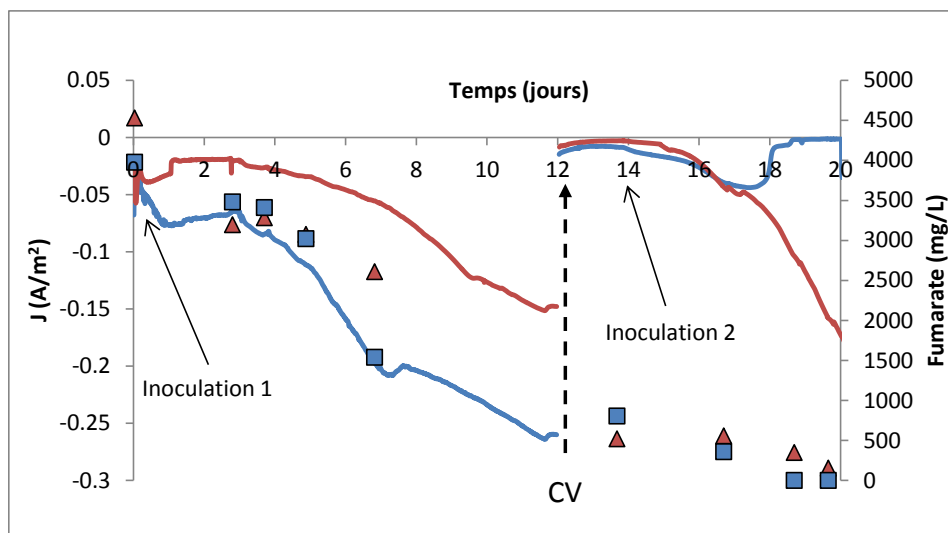


Figure 46 Chronoampérométrie enregistrée pour deux réacteurs double-compartiments, dont le compartiment cathodique est inoculé avec une pré-culture de *Geobacter sulfurreducens* (5%v/v). L'électrode de travail en tissu de 6 cm<sup>2</sup> est polarisée à -0.6 V/ECS. Au jour 12 est effectuée une série de trois voltammétries cycliques (CV). Initialement 35 mM (4 g/L) de fumarate sont introduits. La concentration en fumarate dans le compartiment cathodique est régulièrement mesurée par un dosage HPLC et reportée sur le graphique, avec des marqueurs de forme triangulaire (réacteur 1) ou carrés (réacteur 2).

Après 20 jours d'expérience, des prélèvements de biomasse sont effectués dans le compartiment biotique (Figure 47) pour déterminer les microorganismes contaminants qui se développent à partir du fumarate. Les prélèvements sont analysés par pyroséquençage du gène codant pour l'ARNr 16S. Les essais réalisés avec une cathode en tissu ont permis de récupérer suffisamment de biofilm pour que l'extraction d'ADN soit possible. Par contre, les cathodes en acier sont trop faiblement colonisées pour permettre d'extraire l'ADN provenant du biofilm. Seuls les milieux ont donc été prélevés pour l'étude avec les cathodes en acier. Un échantillon prélevé dans la pré-culture témoin contaminée est également envoyé pour analyse des populations bactériennes.

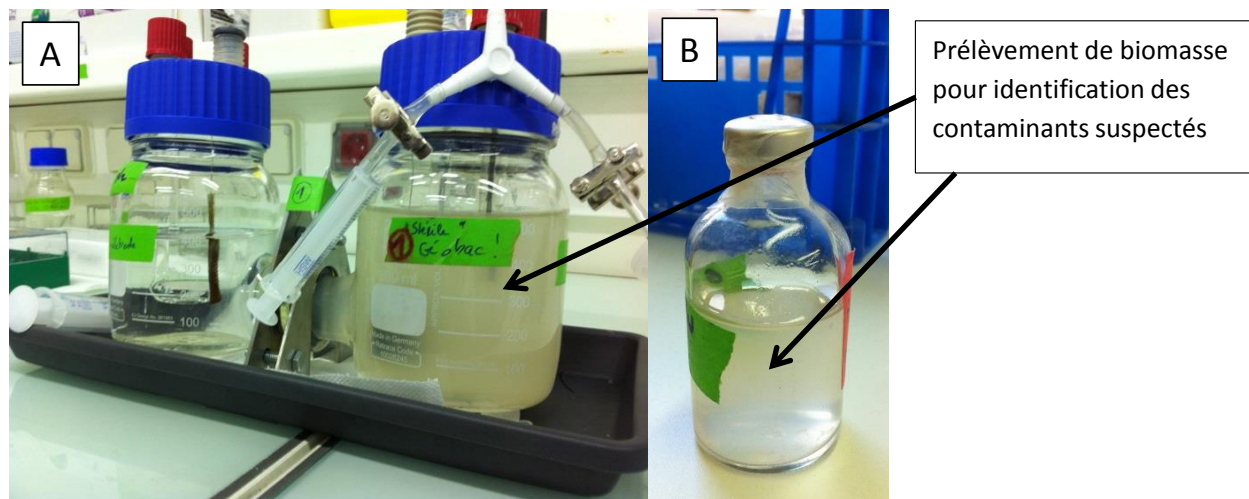


Figure 47 : (A) Réacteur électrochimique à double compartiments pour la culture de *Geobacter sulfurreducens* ; (B) Témoin de pré-culture contaminé.

Les résultats de l'analyse de diversité (Figure 48) révèlent une contamination du flacon témoin par *Citrobacter freundii* (99.9%) et une contamination dans les réacteurs par deux espèces majoritaires : *Citrobacter freundii* et *Comamonas testosteroni*. Ces deux espèces sont des protéobactéries à Gram négatif. *Citrobacter freundii* est une espèce anaérobie facultative et *Comamonas testosteroni* est aérobie. Cette dernière est appelé 'testosteroni' car elle peut croître sur un milieu ne contenant que la testostérone comme source de carbone.

Ces deux espèces sont retrouvées dans une multitude d'environnements : les sols, les eaux, les égouts, la nourriture. *Citrobacter* se retrouve aussi dans le tractus digestif, il fait partie de la famille des entérobactéries, tandis que *Comamonas testosteroni* appelés autrefois *Pseudomonas testosteroni* est de la famille des *Burkholderiales*. Au niveau des biofilms développés sur tissu, une nette dominance d'une espèce de *Brevundimonas* est observée. Celle-ci n'a pas été identifiée, mais on peut penser que cette espèce est le catalyseur de la production d'hydrogène à la cathode.

Une particularité du genre *Citrobacter* est de fermenter le fumarate uniquement en succinate en présence d'hydrogène ou de formate (Lütgens and Gottschalk, 1982), ce qui est cohérent avec les observations bioélectrochimiques et renforce l'hypothèse de la production d'hydrogène à la cathode par le genre *Brevundimonas*. Les dosages finaux des métabolites contenus dans les réacteurs qui détectent uniquement du succinate et de l'acétate sont également en accord avec la présence dominante du genre *Citrobacter*. *Comamonas testosteroni* utilise, lui, un large spectre de sources de carbone dont le fumarate, le succinate et le malate (Tamaoka et al., 1987) pour se développer.

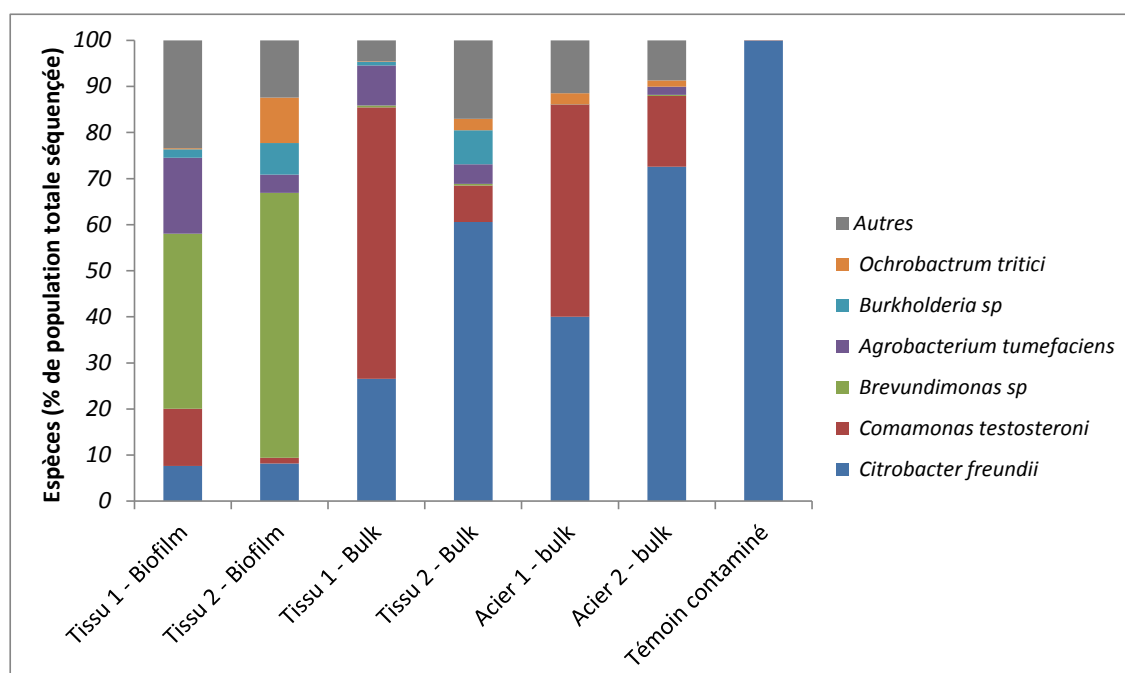


Figure 48 : Résultats de l'analyse par pyroséquencage du gène codant pour l'ARNr 16S: Espèces bactériennes en pourcentage de la population totale séquencée pour les réacteurs électrochimiques ensemencés avec *G. sulfurreducens* après 20 jours d'incubation avec 35 mM de fumarate : deux réacteurs (duplicat) avec une électrode de travail en tissu de carbone, deux réacteurs (duplicat) avec une électrode de travail en acier. Un prélèvement dans une culture témoin contaminée est également analysé par pyroséquencage.

L'utilisation d'une culture pure de *G. sulfurreducens* pour la réduction du CO<sub>2</sub> et du fumarate en glycérol a échoué à cause de la contamination des systèmes à deux compartiments qui n'ont pas pu être utilisés en conditions suffisamment stériles. Si l'expérience devait être renouvelée, nous pensons qu'une bonne piste serait d'appliquer la procédure de l'électrode réversible : implanter *G. sulfurreducens* en conditions anodiques, pour lesquelles ce microorganisme possède des avantages compétitifs pour travailler ensuite en conditions cathodiques. Par manque de temps, cette option n'a pas pu être testée.

En résumé, la réduction du CO<sub>2</sub> n'a pas été possible ni en culture mixte, ni en culture pure. Un courant de réduction jusqu'à 3 A/m<sup>2</sup> a été obtenu avec un biofilm sélectionné, mais uniquement en présence de fumarate et pendant un maximum de 48h.

#### **4 Publication 4 : Importance de l'intermédiaire hydrogène pour la réduction microbienne du CO<sub>2</sub> par le procédé d'électrosynthèse microbienne.**

Il est choisi de revenir vers des stratégies plus classiques d'électrosynthèse comme celles présentées dans la bibliographie avec des cultures pures ou mixtes. Dans les études conventionnelles, aucune formation préalable d'un biofilm n'est réalisée et le compartiment cathodique est inoculé à partir d'un consortium issu par exemple d'eaux usées de brasserie (LaBelle et al., 2014; Marshall et al., 2012), de boues activées (Jiang et al., 2013; Su et al., 2013), ou de cultures enrichies en homoacétogènes (Mohanakrishna et al., 2015). Les souches pures mises en œuvre sont des acétogènes comme *Sporomusa ovata* (Nevin et al., 2010; Nie et al., 2013; T. Zhang et al., 2013) ou *Clostridium Ljungdahlia* (Bajracharya et al., 2015; Nevin et al., 2011).

Pour nos essais, les expériences sont réalisées dans les réacteurs à double-compartiments avec un inoculum issu de boues biologiques ou un inoculum constitué de sédiments de marais salants. Les boues biologiques sont acclimatées 5 jours à 30°C avec une alimentation en CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub> pour enrichir la population en microorganismes acétogènes et les sédiments de marais salants sont utilisés directement, car ils ont déjà démontré d'excellentes performances électrocatalytiques (Rousseau et al., 2013).

La cathode est une plaque d'acier inoxydable polarisée, soit à -0.6 V/ECS, soit à -0.9 V/ECS. Ces deux potentiels permettent la réduction du CO<sub>2</sub> d'un point de vue thermodynamique ( $E^{\circ'}_{(CO_2/ \text{acétate})} = -0.55$  V/ECS à pH 7) mais seul le potentiel de -0.9 V/ECS permet l'évolution de l'hydrogène à la cathode ( $E^{\circ'}_{(H_2O/H_2)} = -0.66$  V/ECS à pH 7).

Les principaux résultats présentés dans l'article sont les suivants :

- lorsque la cathode est polarisée à -0.6 V/ECS, aucun courant, ni aucune production de molécule organique n'est détectée avec les deux inocula testés en réacteurs électrochimiques,
- lorsque la cathode est polarisée à -0.9 V/ECS, un courant stable de 2 A/m<sup>2</sup> est enregistré mais aucune production de molécule organique n'est détectée avec l'inoculum issu de sédiments de marais salants,
- lorsque la cathode est polarisée à -0.9 V/ECS un courant stable de 1 à 1.5 A/m<sup>2</sup> est détecté et jusqu'à 244 mg/L d'acétate sont produits avec l'inoculum issu des boues,



- La mise en œuvre des mêmes inocula mixtes dans des bioréacteurs, de type contacteur gaz-liquide, alimentés en CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub> permet la synthèse de molécules : jusqu'à 2500 mg/L d'acétate avec l'inoculum issu de boues et jusqu'à 380 mg/L de formiate avec l'inoculum issu de sédiments de marais salants.
- La mise en œuvre d'une culture pure de *Sporomusa ovata* dans les contacteurs gaz-liquide alimentés en H<sub>2</sub> et CO<sub>2</sub> permet d'obtenir une concentration d'acétate 5 fois plus importante (2904 mg/L) et une cinétique maximale 13 fois supérieure (14.7 mM/jour) comparé aux résultats de la bibliographie en réacteurs électrochimiques.
- Une production inattendue d'éthanol jusqu'à 1411 mg/L a été obtenue après 10 jours de culture de *S. ovata* dans les contacteurs gaz-liquide.

La fenêtre de potentiels pour laquelle la réduction du CO<sub>2</sub> est possible sans évolution de l'hydrogène à la cathode est étroite (entre -0.55 et -0.66 V/ECS). Pour le développement du procédé à plus grande échelle, un courant important doit être atteint, ce qui induira la production d'hydrogène dès une surtension de 110 mV et gênera la formation d'un biofilm, voire même interdira toute colonisation microbienne de la surface de l'électrode. Cela est incompatible avec un transfert direct d'électron entre cathode et biofilm. Cette conclusion serait évidemment différente avec une réaction de réduction qui aurait un potentiel supérieur comme celle de la conversion de CO<sub>2</sub> et fumarate en glycérol (-0.18 V/ECS à pH 7). Cette réaction permet une surtension de plus de 400 mV avant d'atteindre l'évolution de l'hydrogène.

La conclusion majeure de l'article est la suivante : pour la réduction du CO<sub>2</sub>, il est plus intéressant de mettre en œuvre la voie hydrogène dans des bioréacteurs dédiés qui maximisent le transfert de gaz entre les bactéries et le milieu, pour obtenir des productivités élevées en molécules organiques d'intérêt.

### Importance of the hydrogen route in up-scaling electrosynthesis for microbial CO<sub>2</sub> reduction

Elise Blanchet, François Duquenne, Yan Rafrafi, Luc Etcheverry, Benjamin Erable and Alain Bergel

*Received 04/15, Received in revised form1 07/15, Received in revised form2 10/15 Accepted 29/10/2015, Published 30/10/2015.*

*Energy&Environmental Science (2015), 8, 3731-3744*

#### Broader context

In the context of CO<sub>2</sub> conversion to fuels and chemicals, the association of electrochemistry with microbial catalysis has opened up promising new routes to reduce CO<sub>2</sub> to acetate and other multi-carbon compounds. The present paper points out that some of these electro-microbial processes are based on two consecutive steps: firstly the electrochemical production of hydrogen by water electrolysis and, secondly, the reduction of CO<sub>2</sub> by microbial species that use the hydrogen produced. In consequence, the implementation of homoacetogenic microorganisms with direct CO<sub>2</sub> and hydrogen gas supply should now be considered as a worthwhile strategy for CO<sub>2</sub> conversion. Hydrogen can be produced in optimal conditions by conventional electrolysis, preferentially fed with electrical energy harvested using renewable strategies, and then used to drive CO<sub>2</sub> conversion in an H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> gas-liquid bioreactor.

#### Abstract

Microbial electrochemical reduction of CO<sub>2</sub> was carried out under two different applied potentials, -0.36 V and -0.66 V vs. SHE, using biological sludge as the inoculum. Both potentials were thermodynamically appropriate for converting CO<sub>2</sub> to acetate but only -0.66 V enabled hydrogen evolution. No acetate production was observed at -0.36 V, while up to 244 ± 20 mg/L acetate was produced at -0.66 V vs. SHE. The same microbial inoculum implemented in gas-liquid contactors with H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> gas supply led to acetate production of 2500 mg/L. When salt marsh sediment was used as the inoculum, no reduction was observed in the electrochemical reactors, while supplying H<sub>2</sub>+CO<sub>2</sub> gas led to formate and then acetate production. Finally, pure cultures of *Sporomusa ovata* grown under H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> gas feeding showed acetate production of up to 2904 mg/L, higher than reported so far in the literature for *S. ovata* implemented in bioelectrochemical processes. Unexpected ethanol production of up to 1411 mg/L was also observed. All these experimental data confirm that hydrogen produced on the cathode by water electrolysis is an essential mediator in the microbial electrochemical reduction of CO<sub>2</sub>. Implementing homoacetogenic microbial species in purposely designed gas-liquid biocontactors should now be considered as a relevant strategy for developing CO<sub>2</sub> conversion.

**Keywords:** Carbon dioxide, electrochemical reduction, microbial electrosynthesis, bioelectrochemical system, hydrogen.

## 1. INTRODUCTION

Bulk chemicals and liquid fuels are currently produced almost exclusively from petrochemical feedstock. In the light of emission reduction targets, the production of chemicals from CO<sub>2</sub> or other renewable resources may play an important role in decreasing our environmental impact. There are several advantages to using CO<sub>2</sub> as a reactant, such as unlimited availability (atmosphere, waste gas, etc.), land-independence, ease of handling and limited toxicity [1]. In this framework, electrochemical processes offer various options for converting CO<sub>2</sub> to fuels and commodities. Reducing CO<sub>2</sub> by electrochemistry is a way of converting electrical energy harvested with renewable strategies, such as solar or wind, into chemical forms that can be stored and then distributed on demand. Various electro-catalysts have been designed with some success for the reduction of CO<sub>2</sub> to methanol or formate [2], including enzymes [3]. More specific attempts have also been reported, including the reduction to H<sub>2</sub>+CO syngas mixtures [4] and even reduction to carbon by molten salt electrolysis [5].

Over the past decade, microbial electrosynthesis has emerged as an additional option for the electro-reduction of CO<sub>2</sub> to fuels and commodities [6,7]. In this case, microorganisms act as an electro-catalyst by taking electrons from the cathode to reduce CO<sub>2</sub>. Various multi-carbon products have thus been synthesized from CO<sub>2</sub> [8], acetate being the most frequently obtained (Table 1).

**Table 1: Summary of biocathodes reported for reduction of carbon dioxide to acetate and other products.**

Cathode material	Polarization (V vs. SHE)	Biocatalyst	Electrode surface (cm <sup>2</sup> )	Catholyte volume (L)	Main product	Max production rate (mM.day <sup>-1</sup> )	Max production (mg/L)	Other products detected	Ref
Plain graphite felt	No	Sludge from phototrophic anode	8	0.036	electricity	(750 mW/m <sup>2</sup> )	-	-	[9]
Carbon cloth + Pt catalyst	No	<i>Chlorella vulgaris</i>	48	0.22	electricity + algae	(5.6 W/m <sup>3</sup> )	-	-	[10]
Unpolished graphite sticks	-0.4	<i>Sporomusa ovata</i>	65	0.2	acetate	0.8	300	oxo-butyrate	[8]
Unpolished graphite sticks	-0.4	<i>Clostridium Ljungdahlii</i>	65	0.2	acetate	0.08	33	oxo-butyrate	[11]
Unpolished graphite sticks	-0.4	<i>Sporomusa sphaeroides</i>	65	0.2	acetate	0.04	16	oxo-butyrate	[11]
Chitosan coated carbon cloth	-0.4	<i>Sporomusa ovata</i>	47	0.2	acetate	1.07	600	-	[12]
Granular graphite	-0.59	Brewery waste	n.a.	0.075	acetate	4	1710	CH <sub>4</sub> , H <sub>2</sub>	[13]
Granular graphite	-0.59	Enriched culture from previous MES	n.a.	0.075	acetate	17.25	10500	H <sub>2</sub>	[14]
Stainless steel	-0.4	<i>Geobacter sulfurreducens</i>	2.5	0.45	glycerol	0.67	800	succinate	[15]

Chapitre 5 : L'électrosynthèse microbienne et les réactions cathodiques

Carbon felt	-0.7 -0.9	Activated sludge	20	0.15	acetate	0.38 2.35	114 n.a	CH <sub>4</sub> , H <sub>2</sub>	[16]
Carbon felt	-0.750 -0.950	Activated sludge	49	0.245	acetate	0 1.6	0 96	CH <sub>4</sub> , H <sub>2</sub>	[17]
Nickel nanowire-coated graphite	-0.4	<i>Sporomusa ovata</i>	40	0.2	acetate	1.12	540	-	[18]
Graphite plates	Cathode as								
Anode poised at +0.5 V	auxiliary electrode	<i>Sporomusa ovata</i>	46	0.25	acetate	0.92	180	-	[19]
Carbon cloth	-0.8	<i>Clostridium sp.</i>	9	0.12	acetate butyrate	2.05 0.37	1200 330	ethanol butanol	[20]
Graphite granules	-0.6 -0.8	Enriched culture from brewery	n.a	0.05	acetate hydrogen acetate hydrogen	15 1000 52 1300	5220 - 8770 -	formate butyrate formate butyrate	[21]
Graphite rod	-0.4	Enriched homoacetogenic culture	30	0.5	acetate	9.5	4127	-	[22]
Assembly of graphite felt and stainless steel	-0.9 -0.7	Mixed culture <i>C.ljungdahlii</i>	10 15	0.4 0.2	Acetate Acetate	1.3 0.94	630 559	H <sub>2</sub> / CH <sub>4</sub> Ethanol / H <sub>2</sub>	[23]

Pure cultures and multispecies inocula have both been shown to be capable of catalysing the electrochemical reduction of CO<sub>2</sub>. Among the pure cultures, *Sporomusa ovata* is the most efficient species reported so far. Using a surface-modified carbon cathode polarized at -0.4 V vs. SHE, Zhang et al. [11] obtained 600 mg/L of acetate after 9 days and Nie et al. [18] 540 mg/L of acetate in 8 days. Multispecies inocula have given similar or better performance but it is difficult to compare the various studies reported as they were carried out in different conditions and at different applied potentials. The highest acetate production rate was obtained by Marshall et al. [14], who used granular graphite as the cathode and an enriched culture from a previously established acetogenic biocathode as the inoculum. Their cathodes were polarized at -0.59 V vs. SHE, and rates of acetate production reached 17.25 mM/day with accumulation to 10500 mg/L over 20 days. Hydrogen was also produced by the cathode, at rates reaching 100 mM/d.

The electron transfer (ET) pathway from the cathode to the microbial cells that achieve CO<sub>2</sub> reduction has not been clearly deciphered yet. It has been speculated that microbial cells could gain electrons from the cathode by direct ET through membrane-bound redox systems [6]. Similar direct ET from solid electron donors to microbial species has been identified in natural processes, especially in acidic environments such as mine drainage systems, where oxidation of solid iron (II) and sulfur are dominant microbial activities. For example, *Acidithiobacillus ferrooxidans* is commonly found in deep caves or acid mine drains and thrives in a pH range of 1.5 - 2.5. It has been shown to be able to accept electrons directly from solid Fe(II) minerals (e.g. pyrite) through c-type cytochrome C<sub>yc2</sub> contained in its outer

membrane [24]. Electrons are thus extracted from insoluble minerals and transferred to oxygen, used as the final electron acceptor, which results in minerals being converted to their soluble state.

On the other hand, mediation by hydrogen has also often been suggested. The cathode produces hydrogen by water electrolysis and the microbial species use hydrogen to reduce carbon dioxide to acetate [7,16,17]. In this case, electrosynthesis proceeds in two consecutive steps: firstly, the electrochemical production of hydrogen by water electrolysis and, secondly, the microbial reduction of CO<sub>2</sub>, which uses hydrogen.

Actually, microbial reduction of CO<sub>2</sub> to acetic acid using hydrogen as an electron donor is a well-known reaction called homoacetogenic fermentation [25]. First reported by Fischer et al. [26], the discovery was followed by the isolation of the acetogenic strain *Clostridium aceticum* [27], an obligate anaerobic species, which grows either chemolithotrophically with H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> or chemoorganotrophically with compounds such as fructose, malate or pyruvate. Unfortunately, *C. aceticum* was lost soon after the third paper concerning it was published in 1948 [28]. All attempts to re-isolate a chemolithotrophic acetogen failed until the purification of *Acetobacterium woodii* [29].

In the context of microbial electrochemical conversion of CO<sub>2</sub>, it is still difficult to establish whether ET is achieved by a direct pathway or indirectly by homoacetogenic species that use hydrogen produced at the cathode. This is obviously an important fundamental question, the answer to which should considerably impact the way the technology develops toward large-sized industrial equipment.

The purpose of the present work was to assess the possible involvement of the hydrogen route in the microbial electrochemical reduction of CO<sub>2</sub>. Two multispecies inocula were used to form microbial cathodes under two different applied potentials: -0.36 and -0.66 V vs. SHE. Both potentials were thermodynamically low enough to ensure CO<sub>2</sub> transformation to acetate, but -0.36 V vs. SHE did not allow hydrogen evolution, while -0.66 V vs. SHE did. Stainless steel was used as the cathode material because it has been shown to be more effective than carbon in achieving fast cathodic ET with microbial cells, particularly with *Geobacter sulfurreducens* [30,31]. The same microbial systems were then implemented in gas-liquid contactors and were fed with hydrogen gas in order to assess their capacity to use hydrogen in the absence of an electrode. Finally, similar hydrogen supply tests were performed with pure cultures of *Sporomusa ovata* to evaluate the capacity of this species to use hydrogen compared to the performance reported in the literature for the electrochemical process. All these experimental data consistently supported the involvement of the hydrogen route in the microbial electrochemical reduction of CO<sub>2</sub> to acetate. Implementing acetogenic microbial species in purposely designed gas-liquid contactors should now be considered as a relevant way to develop and scale-up the CO<sub>2</sub> conversion systems that have been revealed by microbial electrosynthesis.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### **2.1 Medium composition**

Medium 1 was prepared as already described [30]. It contained: KCl (0.1 g/L), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.6 g/L), NH<sub>4</sub>Cl (1.5 g/L), and NaHCO<sub>3</sub> (2.5 g/L). The solution was sterilized in an autoclave (121°C for 20 minutes) and a trace mineral mix (10mL/L, ATCC MD-TMS) and a vitamin mix (10 mL/L, ATCC MD-VS) were then added.

Medium 2 consisted of medium 1 with the addition of NaCl (45 g/L), MgCl<sub>2</sub> (0.1 g/L) and CaCl<sub>2</sub> (0.01 g/L).

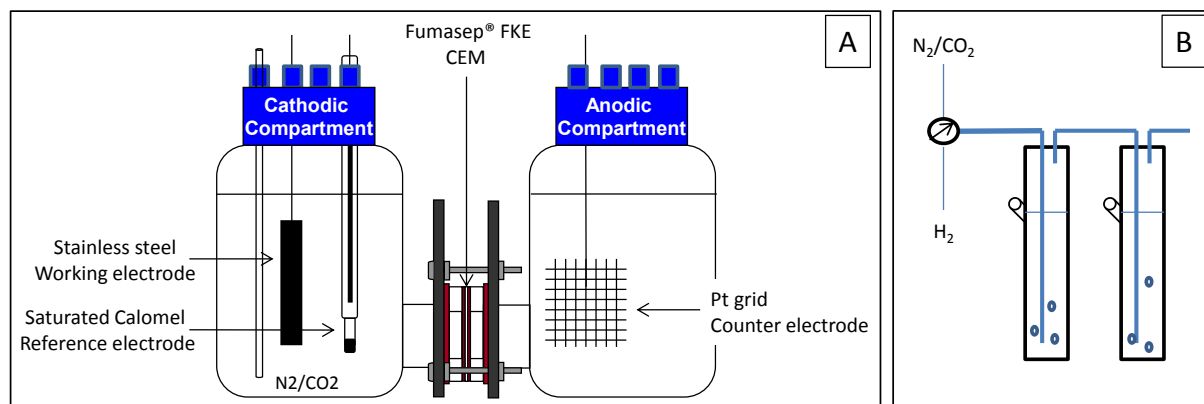
### **2.2 Source of microorganisms**

Two different environmental samples were used as the inoculum. Biological sludge was collected from a treatment plant (Suez Environnement, Evry, France). Prior to the experiments, the inoculum was acclimated to an H<sub>2</sub> and N<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> (80-20%) atmosphere for 5 days at 30°C with the objective of favouring the development of homoacetogenic bacteria. HPLC analyses detected acetic acid at 1980 mg/L and butyric acid at 23 mg/L in the inoculum after the 5 days of acclimation. This inoculum was always implemented with medium 1. The microbial electrochemical reactors were inoculated with 20 mL (3.3% v/v) added into the cathodic compartments. The gas-liquid contactors had 7 mL inoculated into the 210 mL medium.

Sediment collected from a salt marsh of the Mediterranean Sea (Gruissan, France) was used as the second source of microorganisms. This inoculum is known to contain halotolerant electroactive bacteria that have succeeded in forming efficient microbial bioanodes in solutions containing large amounts of salt, such as 45 g/L NaCl [32]. This inoculum was always implemented with medium 2. The microbial electrochemical reactors were inoculated with 60 mL (10% v/v) in the cathodic compartments and 21 mL was injected into the 210 mL medium of the gas-liquid contactors. HPLC analyses detected lactic acid (370 mg/L), formic acid (91 mg/L) and butyric acid (83 mg/L) in this inoculum.

### **2.3 Design and operation of microbial electrochemical reactors (MERs)**

The microbial electrochemical reactors (MERs) were two-chamber H-shaped electrochemical reactors (Figure 1.A), separated by a 7 cm<sup>2</sup> cation exchange membrane (Fumasep® FKE). A cation exchange membrane was chosen to avoid the migration to the anode compartment of acetate or other anionic compounds possibly produced. The two compartments, made with modified Schott glass (Duran) were of equal volume and dimensions (diameter 101 mm – height 152 mm). Each compartment was filled with 600 mL of medium with a 300 mL headspace. The cathode was a 7 cm \* 3 cm stainless steel plate, connected with a 2-mm-diameter screwed titanium wire. The stainless steel electrodes were cleaned with ethanol-acetone mixture 50-50% (v/v), then with a fluoronitric acid solution 2-20%, and finally thoroughly washed with distilled water. The anode was a 15 cm<sup>2</sup> platinum grid, first cleaned by heating to red-hot in a flame. The reference electrode was a saturated calomel electrode (SCE, Radiometer Analytical, +0.241 V vs. SHE). It was placed in the cathode compartment with the tip as close to the surface of the cathode as possible (less than 0.5 cm). Four holes were drilled in the cap that covered each electrochemical compartment; they were used to introduce the electrodes and the tubes for gas bubbling.



**Figure 1: Experimental set-up of (A) the Microbial Electrochemical Reactor - MER and (B) the Gas-Liquid Contactor - GLC**

The experiments were conducted under potentiostatic control (chronoamperometry) with a potentiostat (VSP, Bio-logic SA) interfaced with a computer (software EC-Lab). Cathodes were polarized at -0.60 or -0.90 V vs. SCE, i.e. -0.36 and -0.66 V vs. SHE. The current was recorded every 10 minutes. Chronoamperometry was sometimes interrupted to perform cyclic voltammetry at low scan rate (1 mV/s) starting from the polarization potential and in the range from -0.76 to +0.04 V vs. SHE. All experiments were conducted in a stove thermostated at 30°C. Each compartment was continuously flushed with N<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> gas (80-20) to maintain anaerobic conditions. In each case, the pH of the cathodic compartment stabilized at around 7.1. Volumes of 1 mL were sampled from the cathode compartment and filtered at 0.2 µm for HPLC analysis.

Experiments were systematically carried out in duplicate. Four MERs were filled with medium 1 and inoculated with acclimated biological sludge. For two of them, the cathode was initially polarized at -0.36 V vs. SHE for 40 days and then switched to -0.66 V vs. SHE for 26 days. For the other two, the cathode was polarized at -0.66 V vs. SHE from the beginning and for 40 days.

Four additional MERs were filled with medium 2 and inoculated with salt marsh sediment inoculum. Two were run with the cathodes polarized at -0.6 V vs. SHE for 30 days, while the cathodes of the other two were polarized at -0.66 V vs. SHE.

## 2.4 Gas-Liquid Contactor (GLC)

Experiments without electrodes were run with the same media and inocula in gas-liquid contactors (GLCs) containing 210 mL medium (Figure 1.B). Washing bottles were used with a contact medium column height of 120 mm. The gas feed tube of each contactor was immersed to 7 mm from the bottom and the bubbles came freely out from the outlet of the tube. In the so-called "improved GLCs", the outlet of the gas feed tube was equipped with a porous tube with an aquarium diffuser at the end in order to better sparge the gas into the solution. Solution sampling was possible through a connection placed at a height of 110 mm. N<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> gas was mixed with hydrogen before being injected into the contactors. Gas flows were controlled using flow valves (1 valve for N<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>, 1 valve for H<sub>2</sub> and 1 valve for the mixed gas before its injection into the contactor). GLCs were maintained at 30°C in a water bath.

The media were inoculated and cultures were bubbled with 10 mL/min of N<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> (80-20) gas mixed with hydrogen as the electron donor. Duplicate experiments were carried out using two GLCs in series with the gas outlet of the first bottle being the gas inlet of the second bottle. A total of 12 GLCs were run.

A first experimental run was carried out with 6 GLCs using medium 1 inoculated with acclimated biological sludge, with different hydrogen flow rates. Hydrogen was supplied continuously at a constant flow rate of 2 mL/min in two GLCs and at 6 mL/min in another two. In the last two, hydrogen was alternately supplied at a rate of 2 mL/min for 8 hours followed by 0 mL/min for 16 hours by turning the flow on and off. Each GLC was continuously fed with N<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> at 10 mL/min. A second experimental run was carried out in identical conditions using 3 "improved GLC" with a constant hydrogen flow rate of 0.5 mL/min.

Two GLCs were implemented with medium 2 inoculated with salt marsh sediment using 10 mL/min of N<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> (80-20) gas mixed with 6 mL/min of hydrogen as the electron donor.

Four GLCs were implemented with pure culture of *S. ovata* (see below).

Initially the pH was stable at around 7.1 in each case but, at the end of the experiment, pH values were measured in a range of 5.5 to 7.3 depending on the amount of acetate produced.

### 2.5 Culture of *Sporomusa ovata* in GLCs

*S. ovata* was grown in the DSMZ-recommended growth medium (DSMZ 311) with casitone and resazurin omitted. A volume of 20 mL of the growing cells was used to inoculate the GLCs in the same medium but with the betain omitted. In two GLCs, the culture was continuously fed with an excess of hydrogen-N<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> (50-40-10) gas mixture (40 mL/min). Two control experiments were carried out in GLCs fed only with N<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> (80-20). Samples were taken every day and filtered at 0.2 µm for HPLC analyses.

### 2.6 HPLC analyses

Samples were analysed for organic acids, sugar and ethanol by HPLC (Thermo Scientific, France) using a Rezex ROA-Organic acid H<sup>+</sup> (8%), 250\*4.6 mm phase-reverse column (Phenomenex, France) thermostated at 30°C and associated with a refractive index detector in series with a UV detector. The elution was performed at 170 µL/min with an aqueous solution of sulfuric acid 10 mM (pH 2.2). The column was calibrated with a mixture of formate, acetate, lactate, propionate and butyrate, in the analysis concentration range.

## 3. RESULTS

### 3.1. CO<sub>2</sub> electroreduction using acclimated biological sludge as catalyst

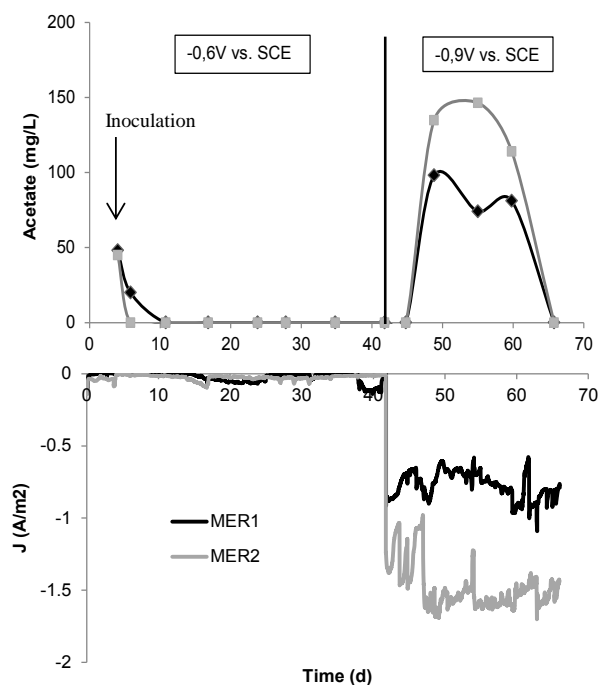
The stainless steel cathodes of two identical MERs were polarized at -0.36 V vs. SHE. After 4 days, the cathodic compartments were inoculated with acclimated biological sludge (3.3% vol/vol). During the 40 days of polarization at -0.36 V, current density never exceeded 0.1 A/m<sup>2</sup> and acetate was only detected initially due to the addition of the inoculum containing acetate (Figure 2). When the potential was switched to -0.66 V vs. SHE, current density increased immediately to -1.2 A/m<sup>2</sup> for one reactor and -1.4



A/m<sup>2</sup> for the other. Acetate started to be produced, reaching 98 mg/L and 135 mg/L after 7 days. During this period, the production rate was 132 mM/day/m<sup>2</sup> on average. This value was of the same order of magnitude as that obtained by Su et al. [16] working with 20 cm<sup>2</sup> of carbon felt at -0.70 V vs. SHE. They used activated sludge as the inoculum and found a maximum acetate production rate of 187 mM/day/m<sup>2</sup>, the production of hydrogen also being detected.

Acetate concentration decreased 13 days after the switch in potential. A methanogenic population probably developed in the compartment, consuming the acetate produced. Methane has actually been detected in a number of MERs [13,16,17], especially when an inhibitor (such as bromoethanesulfonate) was not used, as was the case here.

A control experiment run in the same conditions for the same length of time but keeping the electrodes at open circuit (no potential applied) did not produce any acetate ; the only acetate present came from the bacterial injection.



**Figure 2: Production of acetate and associated chronoamperometry in MERs initially polarized at -0.36 V vs. SHE for 40 days and then switched to -0.66 vs. SHE. On the 4<sup>th</sup> day, the MERs were inoculated with acclimated sludge.**

A second set of two MERs was run in the same conditions but with an imposed potential of -0.66 V vs. SHE from the beginning (Figure 3). Current densities around -1.5 A/m<sup>2</sup> were recorded immediately at this potential. This confirmed that the immediate increase of current density observed in the previous experiments when the potential was switched from -0.36 to -0.66 V vs. SHE was due to the abiotic electrochemical reduction of water to dihydrogen at the surface of the stainless steel cathode. Bacteria were inoculated 3 days after the start of polarization. Acetate measured just after inoculation

corresponded to the acetate contained in the acclimated sludge. In contrast to the previous experiments performed with an initial applied potential of  $-0.36$  V vs. SHE, acetate did not disappear after a few days and its initial concentration was maintained. From day 10, the concentration of acetate increased. Between day 10 and day 20, the acetate concentration increased from  $96 \pm 3$  mg/L to  $244 \pm 20$  mg/L at an average rate of  $140$  mM/d/m<sup>2</sup> over 10 days, which gave a Faradic yield of 53%. Then, the acetate concentration decreased in both MERs.

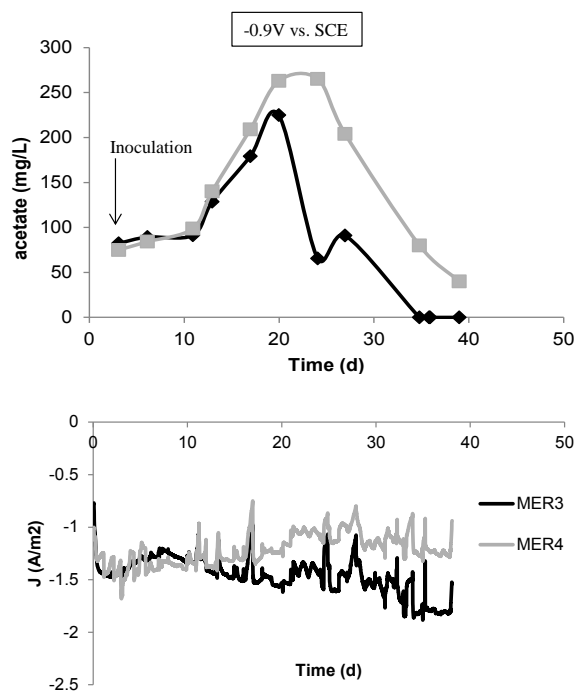


Figure 3: Production of acetate and associated chronoamperometry in MERs polarized at  $-0.66$  V vs. SHE for 40 days. On the 3<sup>rd</sup> day, the MERs were inoculated with acclimated sludge.

Cyclic voltammeteries recorded initially after 1 day of polarization and before inoculation, which was done at day 3, confirmed that there was no hydrogen evolution at  $-0.36$  V vs. SHE but there was hydrogen evolution at  $-0.66$  V vs. SHE. (Figure 4-A). Moreover The CVs recorded during the chronoamperometry (Figure 4-B) showed no change. The presence of microorganisms (sessile and/or planktonic) did not significantly change the behaviour of the electrode.

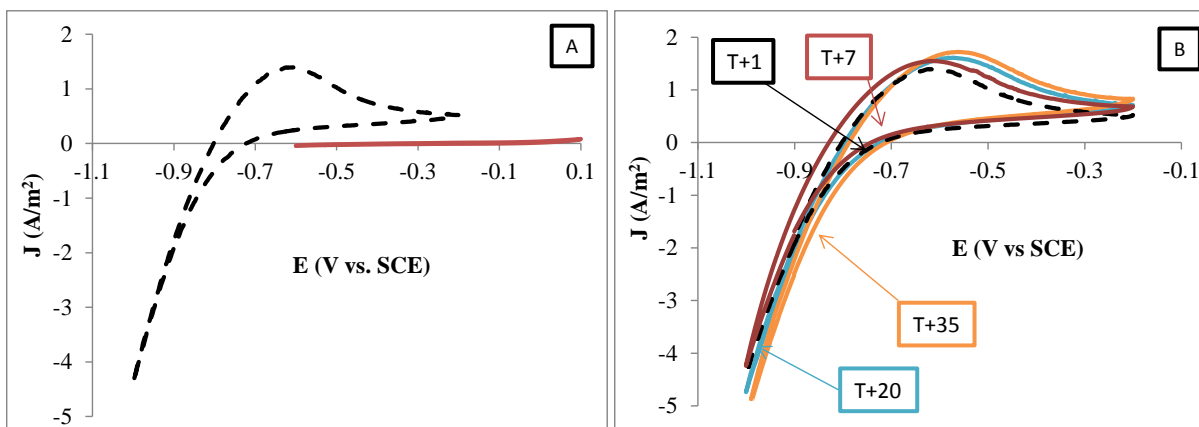


Figure 4: Cyclic voltammeteries recorded at 1 mV/s. (A) CV recorded before bacteria injection (abiotic) and after 1 day of polarization (T+1) at -0.36 V vs. SHE (= -0.60 V vs. SCE) solid line and -0.66 V vs. SHE (= -0.90 V vs. SCE) dotted line. (B) CV recorded at days 1, 7, 20 and 35 during the chronoamperometry at -0.66 V vs. SHE.

### 3.2. CO<sub>2</sub> electroreduction using sediment from a salt marsh as catalyst

Four MERs were started using sediment from a salt marsh as inoculum in a highly saline medium that was supplemented with NaCl 45 g/L. Such high salinity should be a great advantage if the objective is to scale up to large-sized MERs because it allows the internal resistance of the reactor to be significantly decreased in comparison to the low ionic conductive electrolytes that are commonly used in MERs [33]. Two MERs were polarized at -0.36 V vs. SHE, and the other two at -0.66 V vs. SHE.

Current densities never exceeded 0.2 A/m<sup>2</sup> at -0.36 V, whereas they were around 2 A/m<sup>2</sup> from the start of polarization at -0.66 V. The reduction current was established before bacteria were injected, confirming that the electrochemical reaction was the abiotic reduction of water to hydrogen. Acetate, formate or other VFAs were never detected during the 28 days of the experiments in any of the four MERs.

Careful observation of the chronoamperometries revealed variations in current, which were exactly correlated with the fluctuations in CO<sub>2</sub> injection. In the MERs polarized at -0.66 V vs. SHE, when the CO<sub>2</sub> flow rate increased, the reduction current increased almost immediately (absolute value of the current). Specific checks were carried out at the end of the experiments to explain this behaviour. Bubbling air into the reactors instead of N<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> continuously decreased the reduction for 4 hours. Actually, the current evolution perfectly fitted the pH increase that was provoked by desorption of CO<sub>2</sub> from the medium during air bubbling (Figure 5). Bubbling pure nitrogen instead of air decreased the reduction current (absolute value) a little more, because it suppressed the reduction of oxygen. Finally, using back N<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> made the pH decrease, with the concomitant current recovery. Actually, the variations in current were related to the pH, which was linked to the CO<sub>2</sub> flow rate. An increase in CO<sub>2</sub> flow rate led to acidification of the solution, which favoured the electrochemical reaction of water reduction. The dependence of the current on CO<sub>2</sub> flow rate that was observed here did not indicate that CO<sub>2</sub> was the reactant of the electrochemical reaction; it was an indirect phenomenon due to pH evolution.

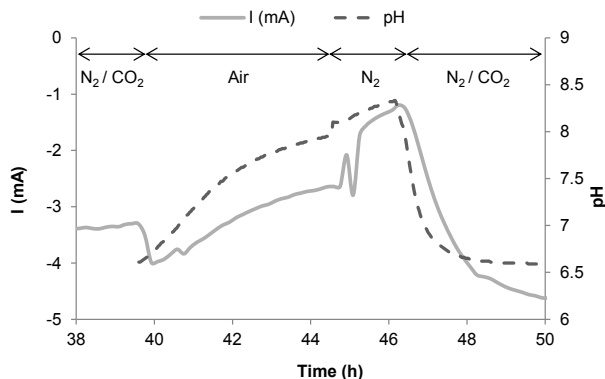


Figure 5: Evolution of the pH due to different gas injection with or without carbon dioxide gas and the concomitant variation in intensity at a stainless steel cathode polarized at  $-0.66$  V vs. SHE.

### 3.3. CO<sub>2</sub> reduction using hydrogen as electron donor with acclimated biological sludge as catalyst

Since hydrogen was strongly suspected to be the intermediate electron carrier in the experiments conducted with the acclimated biological sludge, further experiments were run without electrodes but feeding the same medium directly with hydrogen, at different gas flow rates. Experiments were performed in gas-liquid contactors (GLCs) with 3 different hydrogen gas flow rates: constant flow rates of 2 mL/min and 6 mL/min and intermittent feeding in cycles of 2 mL/min for 8 hours followed by 0 mL/min for 16 hours. Each reactor was continuously fed with N<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> at 10 mL/min.

Acetate started to be produced after 2 days of latency in each GLC (Figure 6). The production rate was linked to the hydrogen flow rate. A maximum production rate of 423 mg/L/day (7.2 mM/day) was reached between days 2 and 7 with the highest hydrogen flow rate, while the acetate production rate was 244 mg/L/day (4.1 mM/day) for the contactors supplied with hydrogen at 2 mL/min. The intermittent hydrogen supply led to significantly lower acetate production, with a maximum production rate of 78 mg/L/d between days 7 and 14. After 15 days, the intermittent hydrogen supply was switched to continuous mode at 2 mL/min. This change led the acetate concentration to increase to the same maximum plateau as in the other reactors. The hydrogen flow rate was consequently a major parameter impacting the acetate production rate.

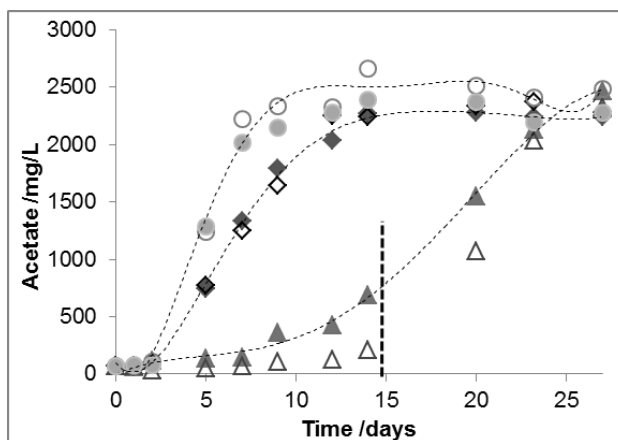


Figure 6: Acetate production in the 6 Gas-Liquid Contactors inoculated with acclimated activated sludge and fed with  $N_2$ - $CO_2$  gas mixed with different  $H_2$  flow rates.  $H_2$  was injected at 6 mL/min in GLCs 5-6 (round), 2 mL/min in GLCs 3-4 (square) and with alternating supply in GLCs 1-2 (triangle) during the first 15 days. The dotted line represents the switch in the feeding mode for GLC 1-2: from the alternating mode to continuous feeding at 2 mL/min. Each reactor was continuously fed with  $N_2$ - $CO_2$  at 10 mL/min

A maximum acetate concentration of around 2500 mg/L was reached after 15 days. This concentration was 10 times higher than those obtained with the bioelectrochemical reactors at -0.66 V vs. SHE.

It was comparable to the acetate levels obtained with a pure culture of the acetogen *Clostridium ljungdahlii* using cysteine as the electron donor [34]. The microbial system implemented here, which consisted of acclimated biological sludge in medium 1, proved to be fully efficient to reduce  $CO_2$  to acetate with hydrogen as electron donor. Moreover, its performance was directly controlled by the hydrogen supply rate in the GLCs. In comparison, the MERs gave lower performance, probably because of the lower hydrogen production rate. The reduction current density around  $1.5 A/m^2$  recorded during the chronoamperometries at -0.66 V vs. SHE (Figures 2 and 3) corresponded to a hydrogen production rate of 0.02 mL/min. The lower acetate production rates obtained in MERs were consistent with the lower hydrogen supply rate achieved by the cathode compared to that of GLCs.

The hydrogen production rate of 0.02 mL/min and the maximum acetate production rate of  $140 mM/d/m^2$  gave a hydrogen conversion yield of 53 % for the MERs polarized at -0.66 V vs. SHE (0.17 mmole/d acetate was produced, while 1.29 mmole/d hydrogen was supplied). The same calculations made for the GLCs supplied with 6 and 2 mL/min hydrogen led to hydrogen conversion yields of 1.6% and 2.7 %, respectively (7.2 and 4.1 mM/day production rates of acetate mean that 1.5 and 0.86 mmole/d of acetate were produced, while 386 and 129 mmole/d of hydrogen were supplied).

The hydrogen conversion to acetate was maximized with the very low hydrogen supply achieved by the cathode in the MER [35]. The electrode was a more efficient hydrogen sparger than the simple tube used in GLCs. The cathode operating at low current density formed very small hydrogen bubbles, which drove a more efficient gas transfer to the liquid than the big bubbles formed at the outlet of the pipe used in GLC. To check this hypothesis, a second run of experiments were performed with three "improved GLCs", which were aimed at ensuring more efficient hydrogen sparging into the solution. With a hydrogen supply rate of 0.5 mL/min, a maximum acetate production rate of 5.2 mM/day (309 mg/L/day)

was maintained for around five days (Figure 7). The yield of the conversion of hydrogen to acetate was 13% (1.1 mmole/d acetate was produced, while 32.1 mmole/d hydrogen was supplied). Changing the gas sparger in the GLCs improved the yield of hydrogen conversion to acetate by a factor of 8. These results confirmed that hydrogen gas/liquid transfer is one of the main parameters to be optimized when scaling-up microbial conversion of CO<sub>2</sub> to acetate.

The fair results recorded with the MERs with respect to hydrogen conversion yield are probably linked to the low hydrogen supply and the efficient gas sparging achieved by the cathodes. Obviously, the occurrence of direct electron transfer may be another reason for the better electron recovery in MERs but deciphering the fine electron transfer mechanisms was not the purpose of the present study. Here, it was shown that the cathode abiotically produced twice as much hydrogen as needed to sustain the acetate production. The same inoculum implemented in identical conditions with direct hydrogen supply in GLCs gave similar acetate production with higher rates but lower hydrogen conversion yields. The GLC experiments confirmed that, the hydrogen yields were strongly linked to the gas sparger efficiency. These results showed that the hydrogen route plays an important role in the electro-microbial conversion of CO<sub>2</sub>. Gas/liquid technology should consequently open up an alternative way to scale-up the systems discovered in the field of microbial electrosynthesis.

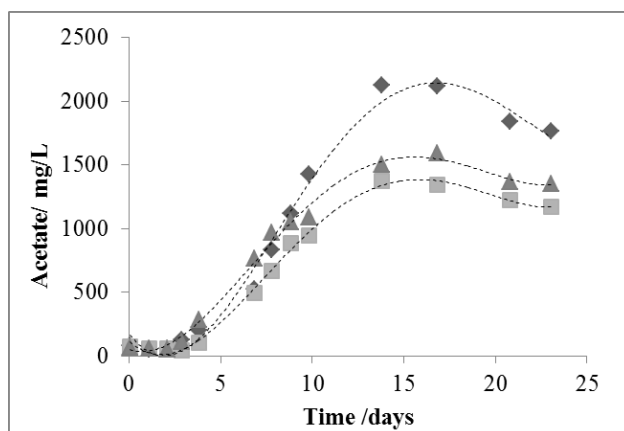


Figure 7: Acetate production in 3 improved Gas-Liquid Contactors (triplicate) inoculated with acclimated activated sludge and fed with H<sub>2</sub> at 0.5 mL/min and N<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> at 10 mL/min.

### 3.4. CO<sub>2</sub> reduction using hydrogen as electron donor with sediment from salt marsh as catalyst

Similar hydrogen feeding was attempted with the second microbial system used here: salt marsh sediment implemented in the highly saline medium 2. Hydrogen was supplied at a flow rate of 6 mL/min. Formate was the first molecule to be produced, after around 2 days of latency (Figure 8), with a maximum production rate of about 200 mg/L/d on the first day of production. An average maximum formate concentration of 380 mg/L was reached after 10 days, while acetate started to be produced after 13 days, concomitantly with the decrease of formate concentration.

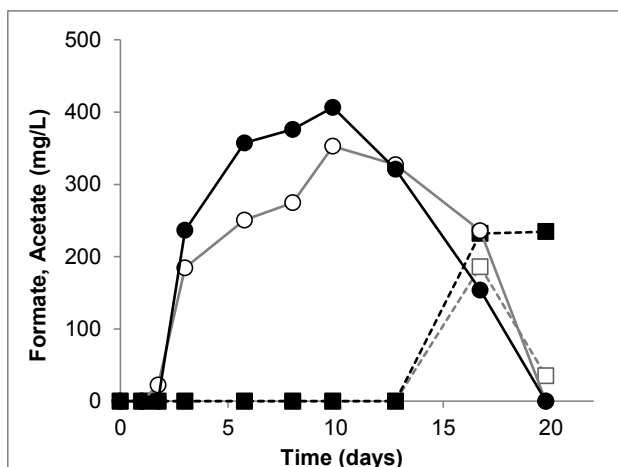


Figure 8: Formate (round) and acetate (square) production in 2 Gas-Liquid Contactors inoculated with salt marsh sediment and fed with 10 mL/min  $N_2$ - $CO_2$  gas mixed with 6 mL/min  $H_2$ .

Formate can be produced by enzymatic reduction of  $CO_2$  in an NADH- or ferredoxin-dependent manner [36]. Moreover, formate was previously found to be a precursor of the methyl group of acetate in *Clostridium sp.* [37], which would explain the concomitance of formate consumption with acetate production.

The experiments performed with direct hydrogen supply showed that the microbial system based on salt marsh sediment was significantly less efficient than the acclimated biological sludge. The electrochemical route led to considerably lower performance than direct hydrogen supply with the biological sludge inoculum. As the salt marsh sediment was less efficient than biological sludge, it was not surprising that no production was found with the salt marsh sediment inoculum in the electrochemical reactors. Actually, direct hydrogen supply succeeded in revealing the capability of weakly efficient microbial systems to reduce  $CO_2$ .

### 3.5. $CO_2$ reduction coupled to hydrogen oxidation using *Sporomusa ovata*

The model microorganism *Sporomusa ovata*, which is known for its electrosynthesis ability [8], was also implemented with direct hydrogen supply in gas-liquid contactors. In the pre-culture, it was noticed that the bacteria were not able to grow without yeast extract, but yeast extract may be a source of electron donor(s), which can support the reduction of  $CO_2$ . So yeast extract was kept in the medium and experiments with and without hydrogen supply were carried out in parallel in order to measure the role of hydrogen (Figure 9). Cultures were run in duplicate.

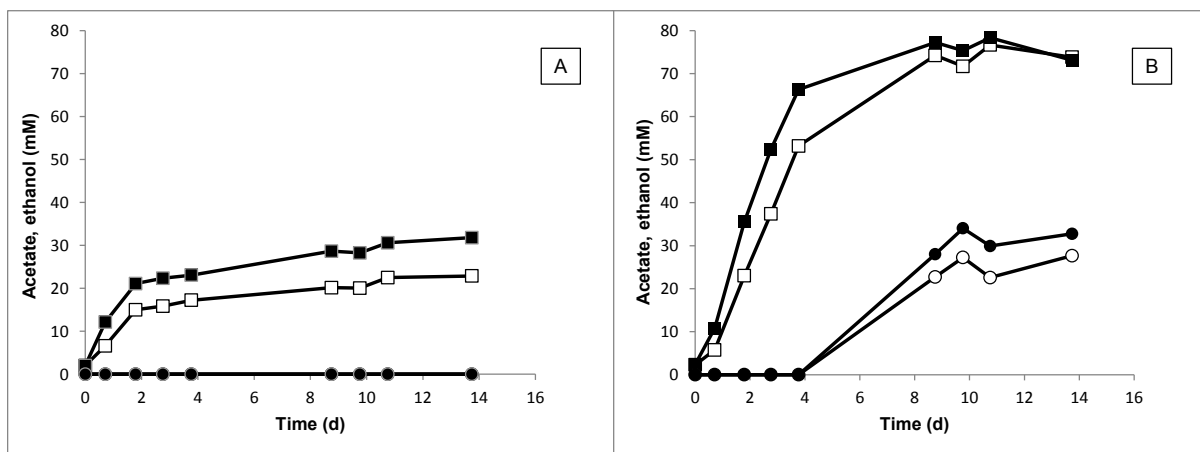


Figure 9: Acetate (square) and ethanol (round) production in GLCs inoculated with *Sporomusa ovata* in its specific medium containing yeast extract (YE) fed with N<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> gas (20 mL/min), without hydrogen supply (7.A) and with hydrogen supply injected at 20 mL/min (7.B).

When no hydrogen was injected (Figure 9.A), up to  $1638 \pm 270$  mg/L of acetate was produced in 14 days, with the largest part produced during the first 2 days. When hydrogen was supplied (Figure 9.B), production of acetate was almost tripled, to  $4542 \pm 90$  mg/L in 9 days. Moreover, ethanol started to be produced after around 7 days, when acetate production reached a plateau. Production of  $1411 \pm 156$  mg/L of ethanol was obtained after 10 days of culture.

The difference observed with and without hydrogen supply corresponded to a production of acetate of up to  $2904$  mg/L at a maximum rate of  $867$  mg/L/day ( $14.7$  mM/day) during the first 3 days. Moreover, ethanol production was promoted with hydrogen supply. The product ratio of ethanol and acetate was  $0.49$  g ethanol per gram acetate.

## 4. DISCUSSION

### 4.1 Discussion of the experimental results

From a thermodynamic point of view, the electrochemical reduction of carbonate ions HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> to acetate:



is possible at potentials less than the formal potential of the equilibrium ( $E^0_{\text{CO}_2/\text{acetate}}$ ):

$$E^0_{\text{CO}_2/\text{acetate}} = E^0_{\text{CO}_2/\text{acetate}} - \frac{RT}{nF} \ln \frac{[\text{CH}_3\text{COO}^-]}{[\text{HCO}_3^-]^2 [\text{H}^+]^9} \quad (2)$$

where  $E^0_{\text{CO}_2/\text{acetate}}$  is the standard potential of the CO<sub>2</sub>/acetate pair ( $0.187$  V/SHE [38]),  $R$  is the gas constant ( $8.314$  J mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>),  $T$  is the temperature ( $303$  K),  $n = 8$  is the number of electrons exchanged,  $F$  is the Faraday constant ( $96,485$  C mol<sup>-1</sup>),  $[ ]$  are the concentrations (mol L<sup>-1</sup>), as activities were taken to be equal to concentrations because of their low values. pH of the solution was  $7.0$ . The reactors were supplied with N<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> 80:20, i.e. a CO<sub>2</sub> partial pressure of  $0.2$  atm. The concentration of the HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> ions calculated assuming equilibrium with CO<sub>2</sub> with  $\text{p}K = 10^{-6.3}$  gave  $1.03$  mM, so that:



$$E^{0'}_{CO_2/acetate} = 0.143 - 0.067 \text{ pH} - 0.0075 \log ([CH_3COO^-]) \quad (3)$$

The value of the acetate concentration produced did not have a significant effect on the formal potential, which was -0.298 V vs. SHE with an acetate concentration of 0.2 mM (11.8 mg/L) and decreased only to -0.309 V vs. SHE for 5 mM (295 g/L). The maximum acetate concentration produced in the MERs never exceeded 5 mM. It can thus be concluded that the applied potential of -0.36 V vs. SHE was thermodynamically appropriate to support the transformation of  $HCO_3^-$  to acetate and it was not a cause of the limitation of this production to less than 5 mM.

Hydrogen evolution at neutral pH:



has a formal potential expressed as :

$$E^{0'}_{H_2O/H_2} = E^0_{H_2O/H_2} - 2.3 \frac{RT}{2F} \{2 (pH-14) + \log p_{H_2}\} \quad (5)$$

where  $E^0_{H_2O/H_2}$  is -0.828 V/SHE and  $p_{H_2}$  is the hydrogen partial pressure. Assuming that hydrogen evolved at 1 atm gave the final equation:

$$E^{0'}_{H_2O/H_2} = 0.014 - 0.060 \text{ pH} \quad (6)$$

At pH 7.0, hydrogen can start to evolve from -0.41 V vs. SHE.

The applied potential of -0.36 V vs. SHE was too high to allow hydrogen gas evolution and acetate production was never observed at this potential, although it was thermodynamically possible. In contrast, the potential of -0.66 V vs. SHE allowed hydrogen evolution and led to significant production of acetate when sludge was used as the inoculum. Furthermore, the same inoculum produced larger amounts of acetate and displayed higher production rates when it was directly fed with hydrogen in gas-liquid contactors than when it was in a MER.

From a fundamental point of view, it is difficult to compare a heterogeneous catalytic process, which is controlled by the surface area of the solid catalyst, with a gas-liquid reaction, which generally depends on the gas/liquid interface area. The direct comparison of the volumetric production rates obtained in the MERs with those in the GLCs (here 0.29 mM/d and 7.2 mM/d, respectively) is useful for a quick, preliminary comparison but cannot constitute an appropriate basis for envisioning the performance of larger sized devices. The MER performance is directly linked to the "cathode surface area vs. solution volume" ratio (the cathode of 21 cm<sup>2</sup> surface area in 0.6 L gave 3.5 m<sup>2</sup>/m<sup>3</sup>). The rather small surface area of 21 cm<sup>2</sup> chosen here was the result of a compromise. On the one hand, according to electroanalysis rules, the cathode must be as small as possible in order to determine the electrochemical kinetics in the absence of most possible limitations [39] but, on the other hand, the production must be sufficient to allow the concentrations of the products to be measured easily with acceptable accuracy. This choice led to modest volumetric production rate but to allow the rate per unit surface to be evaluated in optimal

conditions. The rates per unit surface determined in this condition of  $0.084 \text{ mole/d/m}^2$  ( $140 \text{ mM/d/m}^2$  in  $0.6 \text{ L}$ ) can thus be used to design an appropriate electrochemical reactor. The following calculation gives a basis for comparing a GLC with the MER that could achieve the same acetate production in  $1 \text{ L}$  volume. In GLCs, the biological sludge inoculum ensured a production rate of acetate of  $7.2 \text{ mM/d}$ . To have  $1 \text{ L}$ , the GLC could be straightforwardly scaled up to a column of  $5 \text{ cm}$  diameter and  $51 \text{ cm}$  height of liquid. Actually, the chosen diameter here is the same as that of the GLCs used in the present study, only the height was adjusted to correspond to  $1 \text{ L}$  volume of solution. To achieve the same production rate of  $7.2 \text{ mM/d}$ , the MER needs a cathode surface area of  $857 \text{ cm}^2$  ( $7.2 / 84 \text{ m}^2$ ). With conventional filter-press architecture, the MER could be composed of two cells each equipped with a cathode  $10 \text{ cm}$  wide and  $43 \text{ cm}$  long. The distance between the cathode and the anode has to be as short as possible to minimize the ohmic drop, particularly because of the low ionic conductivity of the solution used here in comparison to the electrolytes used in conventional electrochemical cells (see section 4.2.3). With  $5 \text{ mm}$  between the cathode and the membrane, the MER would contain approximately  $430 \text{ mL}$ , so a closed loop equipped with a pump and a storage tank of approximately  $570 \text{ mL}$  volume would need to be connected to the cathodic compartment of the MER (actually the volumes of the tubes and other side volumes should be subtracted).

This example points out the technical complexity of the MER in comparison to the GLC technology. Firstly, the MER architecture is technically complex: two electrodes to be maintained as close as possible with a separator between them, perfect tightness of each compartment, separate tubing for the cathode and anode compartments, connection of several cells, etc. In addition, the electrochemical process control can raise difficulties, particularly if microorganisms are included inside: ionic transfers between the two compartments must be managed in order not to affect microbial growth, pH gradients [40] must be controlled, disturbance of the anaerobic conditions of the cathode compartment by the oxygen evolving at the anode must be avoided, etc. The chemically rich culture media that are used in microbial electrosynthesis and the presence of microorganisms in the cathode compartment may also induce membrane (bio-)fouling. All these hindrances could certainly be overcome, at the price of finding compromises and fine tuning the operating conditions, but they give the MER a huge level of complexity in comparison with the GLC technology.

According to the data obtained here with the biological sludge inoculum, the main advantage of the MER might be thought to be the Faradic yield of around  $53\%$ , which means that about  $53\%$  of the hydrogen produced is used to produce acetate. The yield of hydrogen conversion to acetate was low in GLCs,  $1.6\%$  to  $2.7\%$ , because no effort had been made to save hydrogen. Simply improving the sparger with means available in the laboratory increased the hydrogen conversion yield to  $13\%$ . Gas-liquid transfers are well mastered at industrial level and chemical engineering offers many solutions to further improve the rough GLCs used here (see section 4.3).

Salt marsh sediment was not an adequate inoculum for MERs. Nevertheless, direct supply with hydrogen in GLCs revealed its capacity to produce acetate. The maximum production rate was around  $5$  times lower than with sludge. Salt marsh sediment was a less efficient inoculum than the biological sludge. Because of the lower production rate of hydrogen in the MER, the electrochemical process was not able

to exploit the homoacetogenic capacity of this inoculum but GLC offered a simple way to reveal the inoculum capacity.

Finally, the experiments performed with pure cultures of *Sporomusa ovata* revealed the full interest of GLC technology in the context of autotrophic CO<sub>2</sub> reduction. Several studies have been reported in the literature, implementing *S. ovata* in electrochemical reactors with the electrode as sole electron donor (absence of yeast extract and hydrogen) [8,12,18]. To the best of our knowledge, the highest reported production was 600 mg/L [12] and the maximum production rate was 1.12 mM/d [18]. Here the maximum acetate concentration and production rate were around 5 times (2904 mg/L) and 13 times (14.7 mM/day) higher than the results reported in MERs.

The GLCs revealed the capability of *S. ovata* to produce ethanol at concentrations up to 35 mM, which, to the best of our knowledge, has never been obtained before. *Sporomusa ovata* was known to exhibit fermentative properties, as is typical of acetogenic bacteria, with the production of a large amount of acetate. However, only a small amount of ethanol (below 1mM) has been reported to be produced so far [41]. For comparison, Younesi et al. [42] obtained a maximum concentration of ethanol of 600 mg/L (13 mM) using *Clostridium ljungdahlii* grown on syngas. Unlike *S. ovata*, *Clostridium ljungdahlii* was already identified as an acetogen that produced ethanol from CO<sub>2</sub> [23,43]. Actually, a few acetogens as *C. ljungdahlii*, *C. autoethanogenum* or *C. ragsdalei* are able to form large amounts of ethanol from CO<sub>2</sub>. Very recently, metabolic schemes have been proposed to elucidate how these anaerobes conserve energy, by determining the specific activities and cofactor specificities of all relevant oxidoreductases in cell extracts of H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> -grown *C. autoethanogenum* [44].

Here, *S. ovata* implemented with a direct supply of hydrogen gas revealed an interesting capacity to produce ethanol at a higher level than species already identified as ethanol producers. This unexpected result is another illustration of the technological interest of the GLC procedure to develop microbially-catalysed CO<sub>2</sub> reduction in value added molecules.

The three kinds of results, obtained in the present study with two environmental multispecies inocula and pure cultures, indicate direct hydrogen supply with a gas-liquid contactor as a valuable strategy to exploit the hydrogen route of CO<sub>2</sub> reduction. It should be noted that the possibility of direct electron transfer from cathodes to microbial biofilms in the absence of hydrogen as an electron carrier is not in doubt but, simply, it was not the subject of this study, which aimed to show that similar results can be obtained with GLC but in a technologically simpler manner. In parallel to the fundamental studies that aim to decipher the fine electron transfer mechanisms, the results described here showed that the hydrogen pathway should now be considered as a promising route that could be implemented at large scale via dedicated technologies.

#### **4.2. Why implement the hydrogen route in gas-liquid contactors**

To be economically efficient, an electrochemical reactor must operate at high current densities. For example, chlor-alkali cells work at 1 500 to 3 000 A/m<sup>2</sup>, the electrosynthesis of adiponitrile from acrylonitrile is performed at 2 000 to 4 500 A/m<sup>2</sup> and water electrolysis is carried out at current densities

above 1 000 A/m<sup>2</sup> in conventional cells and up to 10 000 A/m<sup>2</sup> in bipolar configurations [45]. As soon as the objective is to design a large-sized industrial process, an electrochemical process requires complex technology. Sophisticated technical solutions must be implemented to solve elementary problems such as current collection on the electrodes, perfect sealing of the different parts (electrodes, membrane, and frames), control of the fluid motion in the narrow electrode-membrane spaces, electrical and hydraulic connections of several cells, etc. All these issues quickly become technically very cumbersome as the surface area of the electrodes increases. This is the reason why electrochemical processes are envisioned for large-scale production only when high current densities can be ensured.

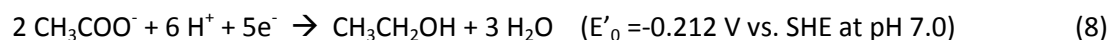
4.2.1. Direct electron transfer in the absence of hydrogen evolution in the context of industrial constraint (Figure 10.A)

The formal potentials for the CO<sub>2</sub>/acetate and H<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub> redox couples were -0.30 and -0.41 V vs. SHE at pH 7.0. These values are not considerably affected by the concentrations of the reactive and product compounds (Equations (3) and (6)), so the difference between the two redox couples is of the order of 100 mV in common operating conditions. Direct electron transfer for CO<sub>2</sub> reduction to acetate can start at -0.30 vs. SHE, while hydrogen evolution rapidly gives high current density when the potential becomes more negative than -0.41 V vs. SHE. CO<sub>2</sub> reduction through direct electron transfer could be exploited inside this narrow potential zone, approximately 100 mV wide, in order to remain above the domain of hydrogen evolution. The overpotential of 100 mV is too small to ensure high current density for CO<sub>2</sub> reduction via direct electron transfer without penetrating the domain of hydrogen evolution. The ideal answer to the scientific challenge of exploiting the direct electron transfer pathway at industrial scale would be to design electrode materials that accelerate electron transfer to the biofilm while slowing the kinetics of hydrogen evolution. This would be an elegant solution for developing microbial electrosynthesis based on direct electron transfer. Nevertheless, in the current state of the art, designing such electrode materials remains a tremendous challenge, which still requires deep fundamental research.

The difficulty of implementing the direct electron transfer zone with high current density is straightforwardly linked to the proximity of the formal potential of the conversion of CO<sub>2</sub> to acetate with that of hydrogen evolution. The same situation is encountered for the conversion of CO<sub>2</sub> to ethanol:



but would be less stringent for the conversion of acetate to ethanol:



The conclusion may be completely different for reactions with formal potentials farther from that of hydrogen evolution. For example, the conversion of CO<sub>2</sub> and succinate to glycerol, with a formal potential of 0.06 V vs. SHE at pH 7.0 [15] offers a possible overpotential range of more than 400 mV before reaching hydrogen evolution. High current densities have been reported at potentials up to -0.09 V vs. SHE, at which hydrogen evolution cannot be suspected. This reaction may be appropriate to produce high current density via the direct electron transfer pathway and illustrates the need for further

investigations to decipher and then exploit the direct electron transfer pathways for electrosynthesis purposes.

4.2.2. Direct electron transfer coupled to gentle hydrogen evolution in the context of industrial constraint (Figure 10.B)

As a second option, it might be envisioned to implement hydrogen evolution and direct electron transfer through the biofilm concomitantly. Both routes could be implemented simultaneously. Direct electron transfer could occur on colonized patches of the electrode surface, while hydrogen could gently evolve on other parts (Figure 10.B). This option might be particularly appealing as some components of the biofilm can catalyse hydrogen evolution. For example, hydrogenases adsorbed on an electrode surface are known to catalyse the reduction of proton/water [46,47] and this catalysis has recently been shown to occur also with hydrogenase released from cells during routine culturing [48]. Obviously, such mechanisms have great importance in the context of microbial corrosion [49,50], where even modest current densities can lead to huge economic losses. Nevertheless, this option does not allow the high current densities required in large-sized industrial plants to be reached. Actually, at high current density, hydrogen evolution would become largely dominant and gas evolution would mechanically keep the microbial cells away from the electrode surface. Vigorous hydrogen evolution from the electrode towards the bulk would obviously preclude colonization of the electrode surface by the microbial biofilm. It has already been observed that hydrogen evolving at the cathode, even under gentle current densities around  $10 \text{ A/m}^2$ , limits the biofilm formation [23]. In such condition, the benefit of the direct electron transfer route would be annihilated and  $\text{CO}_2$  conversion would be driven by the hydrogen route only.

4.2.3. The hydrogen route in the context of industrial constraints (Figure 10.C)

Finally, in a third option, the electrochemical reactor might be considered as the hydrogen supplier for the bacteria that develop in the bulk. In other words, this third option would consist of introducing the bacteria into a water electrolysis cell in order to perform both hydrogen production and the homoacetogenic  $\text{CO}_2$  conversion in the same device. High current densities could be used to support strong hydrogen evolution. The Faradic yields would be very low because of the short residence time of hydrogen in the reactor. Actually, designing efficient water electrolysis cells, i.e. cells able to ensure very high hydrogen evolution rates, but with long hydrogen residence time presents two opposing constraints from an engineering point of view. Other antagonistic requirements would also arise, such as the necessity to work at pH around neutrality for bacterial growth while optimum water electrolysis cells use extremely alkaline solutions (KOH more than 20%, pH 14 and above). The chemical complexity of the culture media can be another hindrance to the electrochemical process, because numerous cations that are necessary to microbial growth (e.g.  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  ...) are most likely to deposit on the cathode surface due to local alkalization of the interface. Electrochemical cells also require electrolytes of very high ionic conductivity to keep ohmic power losses to the minimum. Concentrated potassium hydroxide solutions have ionic conductivities above  $20 \text{ S/m}$ . In contrast, the most common culture media used in microbial electrochemistry have ionic conductivities ranging from 0.5 to a maximum of  $2 \text{ S/m}$  [32]. For instance, an electrochemical cell with 5 mm inter-electrode distance operated at  $1000 \text{ A/m}^2$  must

overcome an ohmic drop of less than 250 mV if a conventional electrolyte with ionic conductivity greater than 20 S/m is used, while the ohmic drop would be 5 V with a culture medium of 1 S/m conductivity.

In summary, implementing the acetogenic microbial reaction inside a water electrolysis cell would raise a huge number of cumbersome antagonistic constraints. They would have to be solved at the price of drastic performance degradation with respect to the current level of industrial water electrolysis devices.

In the current state of the art of microbial electrosynthesis, as far as reductions with formal potential not very different from that of hydrogen evolution are concerned, the best strategy for short- or mid-term scaling up is to connect a microbial gas-liquid contactor downstream of a conventional water electrolysis cell. This system constitutes a hybrid system, according to the terminology proposed recently for microbial electrochemical technologies [51]. The high performance of water electrolysis is thus preserved and the efforts to be made for scaling up the homoacetogenic microbial synthesis are focused on the GLC. In this way, the chemical composition of the culture medium can be fitted to microbial requirements without any concern about possible deposits on the electrode surface or too weak ionic conductivity. The main problem linked to the low microbial reaction rate can be coped with in GLC without the additional constraints due to the electrochemical process.

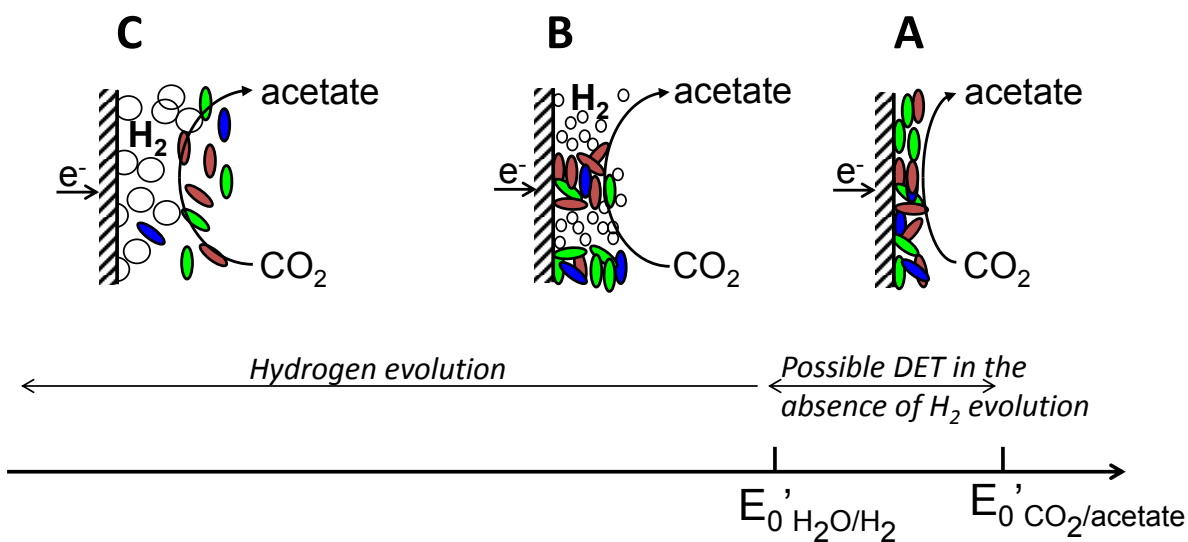


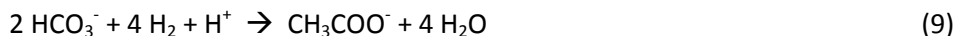
Figure 10 : Scheme of the different potential zones relating to the conversion of  $CO_2$  to acetate vs. hydrogen evolution. A) direct electron transfer can occur in the absence of hydrogen evolution; B) direct electron transfer can occur in biofilm patches concomitantly to hydrogen evolution; C) strong hydrogen evolution precludes colonization of the electrode surface

#### 4.3 How to improve the GLC technology for homoacetogenic $CO_2$ conversion

The preliminary experiments described here have evidenced the potential of the GLC option and illustrated the fast progress that can be made thanks to simple technological improvements. Here, just changing the gas sparger multiplied the hydrogen conversion yield by a factor of 8. At the industrial level, efficient solutions exist to improve the hydrogen/liquid transfers. Hydrogenation is the most ubiquitous

reaction in the commercial organic chemical industry [52] and is commonly implemented in several-ton industrial plants under hydrogen pressure of several bars with metallic catalysts [53].

Here, the microbial catalysis of the conversion of CO<sub>2</sub> to acetate using hydrogen:



does not ensure such high reaction rates as the metallic catalysts in conventional hydrogenations. That is why the existing technologies need to be adapted to implement the appropriate hydrogen/liquid transfer. Work in this direction has already started with success, using pure cultures of *Acetobacter woodii* for example, which have ensured a final acetate concentration of 44.7 g/L by working under pressurized H<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>; more than 50 g/L acetate have been reached in less than 4 days with recombinant strains [54].

Similar studies carried out in the field of carbon monoxide fermentation are also very encouraging. Synthesis gas is a mixture of CO and H<sub>2</sub> (also called syngas), large amounts of which can be obtained by the gasification of biomass (straw, wood, etc.). Syngas fermentation by acetogenic species has started to raise commercial interest for its capacity to produce fuels and chemicals [55]. The low solubility of CO and H<sub>2</sub> has been overcome by chemical engineering solutions [56] so the process has become relatively mature and commercial scaling up can now be reasonably contemplated [57]. The low solubility of CO<sub>2</sub> should be overcome by similar technological solutions. For example, the bubbleless technologies using membrane contactors, which have been patented for syngas fermentation [56] should be a promising way to adapt to the CO<sub>2</sub> conversion routes coming from microbial electrosynthesis.

## CONCLUSION

Chronoamperometries performed at two different potentials showed that the hydrogen route was largely involved in the reduction of CO<sub>2</sub> to acetate. Using the same media in gas-liquid contactors supplied with hydrogen led to higher production rates and higher maximum concentrations than the electrochemical reactors. Moreover, gas-liquid contactors revealed a higher capacity of *Sporomusa ovata* to reduce CO<sub>2</sub> than observed so far and also its unsuspected ability to produce ethanol. The autotrophic culture of acetogens in hydrogen-supplied gas-liquid biocontactors should now be considered as a route of great interest for scaling up the CO<sub>2</sub> reduction systems revealed by microbial electrosynthesis.

## Acknowledgements

This work was part of the "BIORARE" project (ANR-10-BTBR-02), partly funded by the French Agence Nationale de la Recherche (ANR) and the Comité des Investissements d'Avenir. The authors thank Dr Laure Renvoisé and Suez Environnement for supplying the biological sludge used in the experiments. We also thank Ms. Susan Becker for her help in correcting the English version of the manuscript.

## References

- 1 J. Desloover, J. B. A. Arends, T. Hennebel and K. Rabaey, *Biochem. Soc. Trans.*, 2012, 40, 1233–1238.
- 2 C. D. Windle and R. N. Perutz, *Coord. Chem. Rev.*, 2012, 256, 2562–2570.

- 3 S. Srikanth, M. Maesen, X. Dominguez-Benetton, K. Vanbroekhoven and D. Pant, *Bioresour. Technol.*, 2014, 165, 350–354.
- 4 P. Kang, Z. Chen, A. Nayak, S. Zhang and T. J. Meyer, *Energy Environ. Sci.*, 2014, 7, 4007–4012.
- 5 H. Yin, X. Mao, D. Tang, W. Xiao, L. Xing, H. Zhu, D. Wang and D. R. Sadoway, *Energy Environ. Sci.*, 2013, 6, 1538–1545.
- 6 D. R. Lovley, *Environ. Microbiol. Rep.*, 2011, 3, 27–35.
- 7 D. R. Lovley and K. P. Nevin, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2013, 24, 385–390.
- 8 K. P. Nevin, T. L. Woodard, A. E. Franks, Z. M. Summers and D. R. Lovley, *mBio*, 2010, 1, e00103–10.
- 9 X. Cao, X. Huang, P. Liang, N. Boon, M. Fan, L. Zhang and X. Zhang, *Energy Environ. Sci.*, 2009, 2, 498.
- 10 X. Wang, Y. Feng, J. Liu, H. Lee, C. Li, N. Li and N. Ren, *Biosens. Bioelectron.*, 2010, 25, 2639–2643.
- 11 K. P. Nevin, S. A. Hensley, A. E. Franks, Z. M. Summers, J. Ou, T. L. Woodard, O. L. Snoeyenbos-West and D. R. Lovley, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2011, 77, 2882–2886.
- 12 T. Zhang, H. Nie, T. S. Bain, H. Lu, M. Cui, O. L. Snoeyenbos-West, A. E. Franks, K. P. Nevin, T. P. Russell and D. R. Lovley, *Energy Environ. Sci.*, 2012, 6, 217–224.
- 13 C. W. Marshall, D. E. Ross, E. B. Fichot, R. S. Norman and H. D. May, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2012, 78, 8412–8420.
- 14 C. W. Marshall, D. E. Ross, E. B. Fichot, R. S. Norman and H. D. May, *Environ. Sci. Technol.*, 2013, 47, 6023–6029.
- 15 L. Soussan, J. Riess, B. Erable, M.-L. Delia and A. Bergel, *Electrochem. Commun.*, 2013, 28, 27–30.
- 16 M. Su, Y. Jiang and D. Li, *J. Microbiol. Biotechnol.*, 2013, 23, 1140–1146.
- 17 Y. Jiang, M. Su, Y. Zhang, G. Zhan, Y. Tao and D. Li, *Int. J. Hydrog. Energy*, 2013, 38, 3497–3502.
- 18 H. Nie, T. Zhang, M. Cui, H. Lu, D. R. Lovley and T. P. Russell, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2013, 15, 14290.
- 19 Y. Gong, A. Ebrahim, A. M. Feist, M. Embree, T. Zhang, D. Lovley and K. Zengler, *Environ. Sci. Technol.*, 2013, 47, 568–573.
- 20 R. Ganigué, S. Puig, P. Batlle-Vilanova, M. D. Balaguer and J. Colprim, *Chem. Commun. Camb. Engl.*, 2015, 51, 3235–3238.
- 21 E. V. LaBelle, C. W. Marshall, J. A. Gilbert and H. D. May, *PLoS ONE*, 2014, 9, e109935.
- 22 G. Mohanakrishna, J. S. Seelam, K. Vanbroekhoven and D. Pant, *Faraday Discuss*, 2015.
- 23 S. Bajracharya, A. ter Heijne, X. Dominguez Benetton, K. Vanbroekhoven, C. J. N. Buisman, D. P. B. T. B. Strik and D. Pant, *Bioresour. Technol.*, 2015, 195, 14–24.
- 24 A. Yarzabal, G. Brasseur, J. Ratouchniak, K. Lund, D. Lemesle-Meunier, J. A. DeMoss and V. Bonnefoy, *J. Bacteriol.*, 2002, 184, 313–317.
- 25 G. Diekert and G. Wohlfarth, *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1994, 66, 209–221.
- 26 F. Fischer, R. Lieske and K. Winzer, *Biochem*, 1932, 245, 2–12.
- 27 K. Wieringa, *Antonie Van Leeuwenhoek J Microbiol Serol*, 1936, 3, 263–273.
- 28 J. L. Karlsson, B. E. Volcani and H. A. Barker, *J. Bacteriol.*, 1948, 56, 781–782.
- 29 W. E. Balch, S. Schoberth, R. S. Tanner and R. S. Wolfe, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1977, 27, 355–361.
- 30 C. Dumas, R. Basseguy and A. Bergel, *Electrochimica Acta*, 2008, 53, 2494–2500.
- 31 L. Pons, M.-L. Délia and A. Bergel, *Bioresour. Technol.*, 2011, 102, 2678–2683.
- 32 R. Rousseau, C. Santaella, W. Achouak, J.-J. Godon, A. Bonnaïfous, A. Bergel and M.-L. Délia, *ChemElectroChem*, 2014, 1, 1966–1975.
- 33 R. Rousseau, X. Dominguez-Benetton, M.-L. Délia and A. Bergel, *Electrochem. Commun.*, 2013, 33, 1–4.
- 34 C. Leang, T. Ueki, K. P. Nevin and D. R. Lovley, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2012, AEM.02891–12.
- 35 C. G. S. Giddings, K. P. Nevin, T. Woodward, D. R. Lovley and C. S. Butler, *Front. Microbiol.*, 2015, 6.
- 36 B. R. Crable, C. M. Plugge, M. J. McInerney and A. J. M. Stams, *Enzyme Res.*, 2011, 2011, e532536.
- 37 K. Lentz and H. G. Wood, *J. Biol. Chem.*, 1955, 215, 645–654.
- 38 B. E. Logan, B. Hamelers, R. Rozendal, U. Schröder, J. Keller, S. Freguia, P. Aelterman, W. Verstraete and K. Rabaey, *Environ. Sci. Technol.*, 2006, 40, 5181–5192.
- 39 M. Rimboud, D. Pocaznoi, B. Erable and A. Bergel, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2014.
- 40 E. Blanchet, S. Pécastaigns, B. Erable, C. Roques and A. Bergel, *Bioresour. Technol.*, 2014.
- 41 B. Möller, R. Oßmer, B. H. Howard, G. Gottschalk and H. Hippe, *Arch. Microbiol.*, 1984, 139, 388–396.
- 42 H. Younesi, G. Najafpour and A. R. Mohamed, *Biochem. Eng. J.*, 2005, 27, 110–119.
- 43 B. Schiel-Bengelsdorf and P. Dürre, *FEBS Lett.*, 2012, 586, 2191–2198.



- 44 J. Mock, Y. Zheng, A. P. Mueller, S. Ly, L. Tran, S. Segovia, S. Nagaraju, M. Köpke, P. Dürre and R. K. Thauer, *J. Bacteriol.*, 2015, 197, 2965–2980.
- 45 H. Wendt and G. Kreysa, *Electrochemical Engineering: Science and Technology in Chemical and Other Industries*, Springer Science & Business Media, 1999.
- 46 J. Cantet, A. Bergel, M. Comtat and J.-L. Séris, *J. Mol. Catal.*, 1992, 73, 371–380.
- 47 K. Délécouls, P. Saint-Aguet, C. Zaborosch and A. Bergel, *J. Electroanal. Chem.*, 1999, 468, 139–149.
- 48 J. S. Deutzmann, M. Sahin and A. M. Spormann, *mBio*, 2015, 6, e00496–15.
- 49 M. Mehanna, R. Basseguy, M.-L. Delia and A. Bergel, *Electrochem. Commun.*, 2009, 11, 568–571.
- 50 S. Da Silva, R. Basséguy and A. Bergel, *J. Electroanal. Chem.*, 2004, 561, 93–102.
- 51 U. Schröder, F. Harnisch and L. T. Angenent, *Energy Environ. Sci.*, 2015, 8, 513–519.
- 52 H. F. Rase, *Handbook of Commercial Catalysts: Heterogeneous Catalysts*, CRC Press, pp 105, 2000.
- 53 J. Hagen, *Industrial Catalysis: A Practical Approach*, John Wiley & Sons, 2006.
- 54 M. Straub, M. Demler, D. Weuster-Botz and P. Dürre, *J. Biotechnol.*, 2014, 178, 67–72.
- 55 A. M. Henstra, J. Sipma, A. Rinzema and A. J. Stams, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2007, 18, 200–206.
- 56 M. Köpke, C. Mihalcea, J. C. Bromley and S. D. Simpson, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2011, 22, 320–325.
- 57 J. Daniell, M. Köpke and S. D. Simpson, *Energies*, 2012, 5, 5372–5417.

## 5 Conclusions du Chapitre 5

Les efforts pour mettre en évidence des courants associés à la réduction de CO<sub>2</sub> sont restés vains. Les réactions planctoniques prennent rapidement le dessus en culture mixte, et la mise en oeuvre de culture pure dans nos systèmes n'a pas été possible.

L'électrosynthèse à partir de la réduction du CO<sub>2</sub> n'a été observée que pour des potentiels permettant l'évolution de l'hydrogène. Dans ces conditions et compte tenu de la proximité entre les potentiels des couples CO<sub>2</sub>/acétate (-0.55 V/ECS) and H<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub> (-0.66 V/ECS), il paraît plus judicieux de développer un système hybride où la production d'hydrogène est découplée de la production de molécules organiques.

En effet, l'intégration des deux étapes dans un même système ne présente pas d'intérêt car regrouper l'électrolyse de l'eau et la réaction microbienne dans un même réacteur impose les mêmes conditions opératoires aux deux processus alors que leurs conditions optimales sont très différentes, voire antagonistes. Par exemple, la production d'hydrogène par électrolyse est favorisée par des pH acides alors que les processus microbiens préfèrent des pH proche de la neutralité. Les catalyseurs de production d'hydrogène sont en outre sensibles à l'inhibition par les composés organiques et risquent fort de perdre leur efficacité dans les milieux de culture ou simplement du fait des fortes concentrations en substrats ou en produits ; notons encore, lorsqu'il s'agira d'accroître les vitesses de réaction, les fortes tensions de surface générées par l'évolution des bulles d'hydrogène à la surface de la cathode ne peuvent qu'être néfastes à la croissance microbienne.

Il faut de plus garder en mémoire que la mise en oeuvre des processus électrochimiques est complexe. Maîtriser deux réactions indépendantes (anode et cathode) mais fortement couplées, séparer deux compartiments tout en assurant un transfert ionique rapide entre eux, gérer l'évolution des électrodes dans le temps, respecter des normes de sécurité drastiques liées au passage d'électricité au sein de solutions, sont autant de difficultés qui jouent en défaveur du développement des procédés électrochimiques à grande échelle.

Lorsque le procédé d'électrosynthèse microbienne repose sur deux processus indépendants, il est donc plus efficace de le mettre en oeuvre au sein d'un simple contacteur gaz-liquide. Il est ainsi possible de produire l'hydrogène par n'importe quel procédé et de focaliser l'effort d'optimisation sur la synthèse microbienne dans le contacteur. La production d'hydrogène peut se faire via un procédé d'électrolyse (Carmona-Martínez et al., 2015), par fermentation sombre (Carrillo-Reyes et al., 2016) ou grâce à un couplage des deux (Pierra, 2013). Pour Biorare, il s'agira d'une cellule d'électrolyse microbienne (CEM) alimentée en biodéchets.



# Chapitre 6 : Développement d'une Cellule d'Electrolyse Microbienne



Le chapitre 6 présente la démarche scientifique ainsi que les résultats obtenus pour produire l'hydrogène nécessaire à alimenter un contacteur gaz-liquide. L'hydrogène est produit par une cellule d'électrolyse microbienne (CEM) dont la bioanode est alimentée avec de l'acétate ou des biodéchets. L'objectif est de générer un flux continu d'hydrogène de bonne qualité, c'est-à-dire sans méthane ni H<sub>2</sub>S, ammoniac, etc... avec un débit moyen de 0.9 L<sub>H<sub>2</sub></sub>/jour en sortie de l'électrolyseur microbien pour alimenter un contacteur gaz-liquide. La CEM doit donc fonctionner sous un courant moyen d'électrolyse de 90 mA pour soutenir le débit d'hydrogène souhaité.

En premier lieu, la génération de l'hydrogène a été étudiée dans un réacteur d'électrolyse microbienne à compartiment unique (section 6.1). Puis un nouveau design de prototype à double-compartiments, permettant de séparer l'hydrogène produit à la cathode des autres gaz produits à la bioanode, a été dimensionné (section 6.2). Sa mise en œuvre en conditions de laboratoire a permis de faire un choix parmi deux types de membranes et deux catholytes possibles. Le système de membrane et de catholyte qui a été retenu permet d'atteindre la production d'hydrogène souhaitée avec une consommation d'énergie limitée (section 6.3).

## 1 Cellule d'électrolyse microbienne SANS membrane

Les premiers essais de production d'hydrogène ont été réalisés avec les électrolyseurs sans membrane décrits dans les matériels et méthodes et schématisés sur la Figure 49. Deux réacteurs au design identique sont étudiés en parallèle (MF-MEC 1 et MF-MEC 2) avec les mêmes conditions opératoires pour évaluer la reproductibilité des expériences.

Le milieu utilisé, qui est l'unique électrolyte ici dans un réacteur mono compartiment, est de l'eau usée (670 mL) inoculé à 3% avec des boues activées (20 mL) et supplémenté par des ajouts successifs de 10 mL de biodéchets. La charge en DCO correspondant à ces 10 mL de biodéchets est de 0.6 gDCO/L d'électrolyte.

Dans un troisième essai (MF-MEC 3), les conditions opératoires sont restées les mêmes à l'exception de la méthode d'inoculation qui a été modifiée. Ainsi, la méthode en trois étapes développée précédemment dans le Chapitre 3 a été appliquée pour l'anode de l'électrolyseur microbien sans membrane. Pour rappel, dans cette méthode, une électrode préalablement colonisée par un biofilm électroactifs sert d'inoculum pour former les bioanodes secondaires.

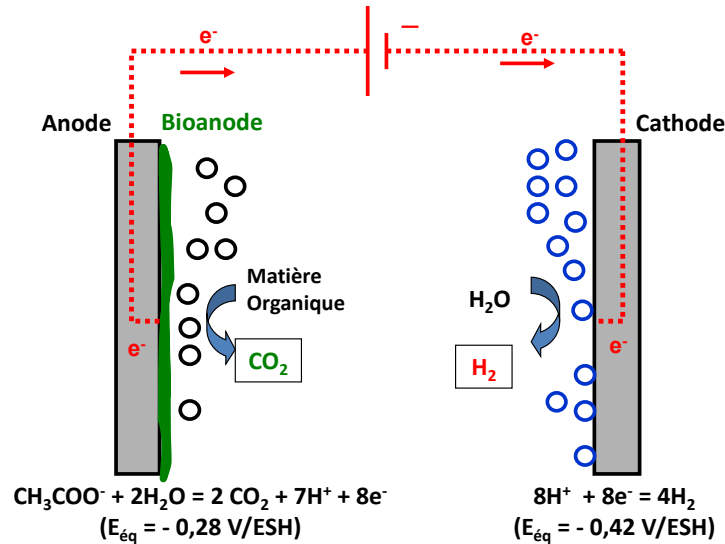


Figure 49 : Schéma de l'électrolyseur microbien sans séparateur tiré de (Raphael Rousseau, 2013).

Le dispositif d'électrolyse microbienne sans membrane, comme son nom l'indique, ne possède pas de séparateur entre la bioanode et la cathode sur laquelle est généré l'hydrogène. Le flux de gaz récupéré sera alors théoriquement constitué de :

- $\text{CO}_2$  lié à la réaction anodique de dégradation du substrat :  $\text{CH}_3\text{COO}^- + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{CO}_2 + 7\text{H}^+ + 8\text{e}^-$
- et d'hydrogène lié à la réaction cathodique de réduction de l'eau :  $8\text{H}_2\text{O} + 8\text{e}^- \rightarrow 8\text{OH}^- + 4\text{H}_2$

Ainsi 4 moles d'hydrogène sont formées lorsque 2 moles de  $\text{CO}_2$  sont produites, ce qui correspond à un mélange gazeux théorique constitué de 66%  $\text{H}_2$  et 33%  $\text{CO}_2$  en conditions stationnaires lorsque les solubilités maximales de  $\text{H}_2$  et  $\text{CO}_2$  dans l'électrolyte sont atteintes.

## 1.1 Electrolyseur microbien sans membrane : premiers essais

### 1.1.1 Chronoampérométries, volume et composition des gaz récupérés

Le taux d'inoculation avec des boues activées est de 3.3% v/v dans ces expériences. L'anode est polarisée à +0.15 V/ECS. Le potentiel de la cathode a varié entre -0.8 V et -2.1 V/ECS.

Pour les deux électrolyseurs sans membrane (MF-MEC 1 et MF-MEC 2), le courant d'électrolyse mesuré sur la bioanode augmente exponentiellement après 3-4 jours de latence jusqu'à un maximum de 54 mA à t=8jours (Figure 50), soit une densité de courant de  $3 \text{ A/m}^2$  en considérant une surface projetée d'anode de  $180 \text{ cm}^2$ . Les phases où le courant diminue (j8-j10 et j13-j15) correspondent à une diminution de la DCO dans le milieu. Sept ajouts successifs de 10 mL de biodéchets (0.6 g DCO/L) ont permis de soutenir une densité de courant moyenne de l'ordre de 2.0 à  $2.5 \text{ A/m}^2$ .

Les mêmes tendances sont obtenues pour l'évolution des densités de courant entre les deux expériences. Pour simplifier le graphique, une seule courbe de chronoampérométrie est présentée ici.

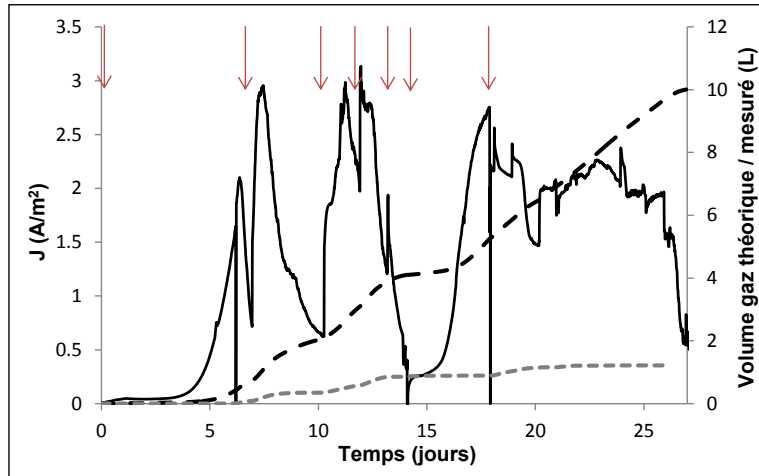


Figure 50 : Evolution du courant d'électrolyse et du volume de gaz généré au cours du temps. Chronoampérométrie du MF-MEC 1 (trait plein) ; Volumes de gaz théorique (pointillés noirs) et volume de gaz mesuré (pointillés gris). Les flèches indiquent l'ajout de 10 mL de biodéchets (0.6 g DCO/L).

La quantité théorique d'hydrogène produit à la cathode est directement proportionnelle à la charge ( $Q = \int_0^t i dt$ ) ayant traversée la cathode.

$$\text{Volume d'hydrogène théorique (L)} = Q * V_m / F * n$$

Avec  $Q = \int_0^t i dt$  (Cb),  $V_m$  = le volume molaire des gaz parfaits (22.4 L/mol),  $F$  = la constante de Faraday (96485 Cb/mol) et  $n$  = le nombre d'électrons échangés pour une mole de gaz (2 moles  $e^-$  / moles de  $H_2$ )

Pour les deux essais, l'intégration du courant produit sur les cathodes pendant les 25 jours d'expérience a permis de déterminer des charges  $Q$  de respectivement 52000 Cb et 38000 Cb. Pour l'essai MF-MEC 1 (Figure 50), le volume cumulé théorique d'hydrogène atteindrait donc 6 L en 25 jours (moyenne de 0.24  $LH_2$ /jour), ce qui constituerait un volume total de gaz ( $H_2 + CO_2$ ) de 9.1 L.

L'évolution théorique de la production gazeuse totale en sortie de l'électrolyseur microbien sans membrane MF-MEC 1, obtenue à partir du courant d'électrolyse mesuré, est représentée sur la Figure 50. La mesure expérimentale du volume de gaz réellement produit en sortie de l'électrolyseur est également reportée sur la figure. On note une différence très importante entre le volume théorique et le volume réellement récupéré en sortie de l'électrolyseur. Moins de 20% du gaz théoriquement produit est en fait récupéré. Au-delà de la possibilité de simples fuites ponctuelles à certains moments de l'expérience, il y a très probablement une re-consommation de la majeure partie des gaz produits par une partie de la flore microbienne anaérobie issue des boues activées suivant les possibles réactions suivantes :

- populations acétogènes :  $4 H_2 + 2 CO_2 \rightarrow CH_3COOH + 2 H_2O$  (Consommation de 6 moles de gaz)
- populations méthanogènes hydrogénotrophes :  $CO_2 + 4 H_2 \rightarrow CH_4 + 2H_2O$  (conversion de 5 moles de gaz en 1 mole de gaz)



La composition des gaz produits dans les électrolyseurs microbiens sans membrane a régulièrement été suivie par analyse en CPG. Deux exemples de cette composition, à j=13 jours et j=21 jours, sont présentés dans la Figure 51.

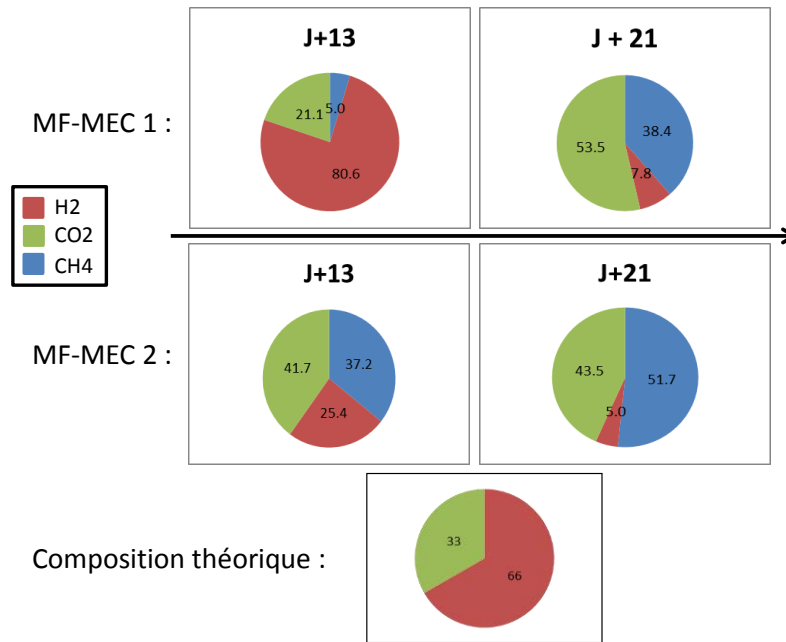


Figure 51 : Composition du gaz (en %) prélevé à J+13 et J+21 dans les 2 MF-MEC. La composition théorique du biogaz produit dans un MEC est de 66% H<sub>2</sub> et 33% CO<sub>2</sub>

La composition des gaz produits à t=13 jours et t=21 jours est très différente de la composition théorique attendue (66% H<sub>2</sub> ; 33% CO<sub>2</sub>). Les gaz sont le plus souvent chargés en méthane (CH<sub>4</sub>) avec une teneur qui atteint 51,7 % à t=21 jours pour MF-MEC 2. Cette augmentation de la teneur en méthane s'accompagne en général d'une diminution marquée de la teneur en H<sub>2</sub> et d'une augmentation de la teneur en CO<sub>2</sub> dans le mélange gazeux. Cette évolution de la composition du ciel gazeux du réacteur d'électrolyse microbienne vers un enrichissement de plus en plus important en méthane et CO<sub>2</sub> (Figure 51) va bien dans le sens de l'hypothèse d'une utilisation des gaz produits pas des méthanogènes hydrogénotrophes. Ces populations méthanogènes consomment l'hydrogène et le CO<sub>2</sub> et produisent du méthane, en transformant alors 5 moles de gaz (4 H<sub>2</sub> et 1 CO<sub>2</sub>) en 1 mole de méthane.

A partir de t=13 jours, la densité de courant est la même dans les 2 électrolyseurs mais pourtant les résultats ne sont pas similaires au niveau de la composition des gaz. En effet, le ciel gazeux du MF-MEC 1 est composé à 80% d'H<sub>2</sub> tandis que l'hydrogène ne représente déjà plus que 25% dans le MF-MEC 2. Visuellement, la couleur entre les deux milieux des électrolyseurs est différente. Le milieu de MF-MEC 1 présente une coloration noire, qui pourrait indiquer la précipitation de soufre réduit (sulfure de fer) à la cathode, tandis que le milieu de MF-MEC 2 a un aspect plutôt jaune (Figure 52). Un prélèvement des milieux a été effectué à t=13 jours et les deux échantillons ont été analysés par pyroséquençage (analyses réalisées par Research and Testing Laboratory). En terme de population microbienne, le genre *Comomonas* est majoritaire (77%) dans MF-MEC 1, alors que c'est le genre *Acinetobacter* (75%) qui est le genre dominant dans MF-MEC 2. Cette différence entre les communautés bactériennes qui se sont

majoritairement développées dans deux électrolyseurs microbiens pourtant identiques et ensemencés avec le même inoculum a déjà été reportée et discutée dans la bibliographie (Koch et al., 2014). Le genre bactérien *Comamonas* a déjà été identifié sur des électrodes microbiennes et décrit comme capable de produire du courant dans un électrolyseur microbien. Ce genre bactérien est également représentatif d'un groupe de bactéries connu pour s'adapter à son environnement et utiliser une large variété de substrats organiques (Escapa et al., 2015).

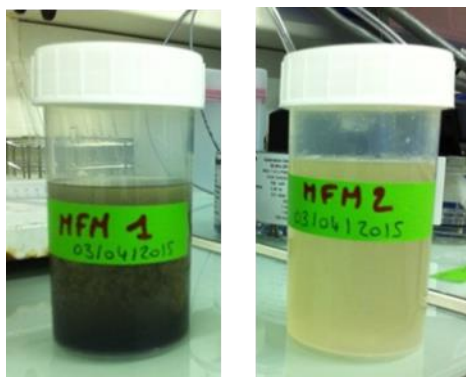


Figure 52 : Echantillons prélevés dans les électrolyseurs microbiens sans membrane à t=13 jours (MF-MEC 1 et 2).

Après le prélèvement des échantillons à t=13 jours, le milieu est remplacé dans les deux électrolyseurs par des eaux usées fraîchement prélevées. A t=21 jours, le renouvellement du milieu a conduit à un retour à une composition similaire des gaz avec [50-40% CO<sub>2</sub> ; 40-50% CH<sub>4</sub> ; 7% H<sub>2</sub>] (Figure 51).

### 1.1.2 Rendements faradiques

Les rendements faradiques (charge électrique réellement mesurée à partir du courant /charge électrique théorique calculée à partir de la quantité de substrat dégradé) calculés pour chaque ajout de biodéchets sont toujours proches de 100%, et atteignent même de façon extravagante 120% lors du dernier ajout de biodéchets (de t =20 jours à t = 27 jours). Un rendement faradique supérieur à 100% s'explique bien souvent par la ré-oxydation à l'anode d'une molécule produite à la cathode. Dans notre cas, la possibilité la plus probable est l'oxydation (biotique ou abiotique) de l'hydrogène sur la bioanode. Ce phénomène est en effet fréquemment observé dans les électrolyseurs microbiens sans membrane (Lee and Rittmann, 2010). L'hydrogène produit est en parti ré-oxydé provoquant une consommation d'énergie sans production de gaz. Dans leur publication, Escapa et al. (2015) analysent les performances de 2 CEM sans membrane pour le traitement d'eaux usées. Ils décrivent eux aussi la ré-oxydation de l'hydrogène à l'anode comme un problème majeur des systèmes sans membrane.

## 1.2 Electrolyseur microbien sans membrane : influence de la conductivité

Les eaux usées utilisées comme électrolyte dans nos expériences présentent une conductivité très faible (autour de 1.2 mS/cm). La conductivité d'un électrolyte est caractéristique de la concentration et de la mobilité des ions en solution. Il est inversement proportionnel à la résistivité de la solution. C'est un paramètre souvent limitant dans les procédés électrochimiques, spécialement dans les gammes de densités de courant élevées puisque son influence est assimilée à une résistance électrique ( $U=RxI$ ).

### 1.2.1 Chronoampérométrie

Un nouvel essai, intitulé MF-MEC 3 est réalisé dans les mêmes réacteurs d'électrolyse microbienne sans membrane et dans les mêmes conditions opératoires déjà décrites pour les réacteurs MF-MEC 1 et 2 (milieu eau usée inoculé + ajouts successifs de biodéchets à 0.7 gDCO/L). A la différence de MF-MEC 1 et 2, aucun ajout de boues activées n'a été réalisé dans MF-MEC3. Le réacteur a été inoculé avec une bioanode déjà colonisée par un biofilm électroactif selon la méthode en trois étapes (Chapitre 3). Le temps de latence avant le démarrage de la production de courant est alors fortement réduit (une dizaine d'heures environ au lieu de 4 jours avec des boues activées).

Un plateau de courant maximal ( $I_{max}$ ) correspondant à 27 mA ( $1.5 \text{ A/m}^2$ ) a rapidement été atteint dès la fin du premier jour d'expérience (Figure 53). Un nouvel ajout de biodéchet (0.7 gDCO/L) au début du jour 2 n'a pas eu d'effet notable (seulement 6% d'augmentation) sur la densité de courant. La limitation en matière organique oxydable apportée par le biodéchet n'est donc pas à l'origine de ce plateau de performances constaté avec la bioanode nouvellement formée. Une autre hypothèse, tirée de la bibliographie (Liu et al., 2005; Rousseau et al., 2014), nous a conduit sur la piste de la conductivité ionique de l'électrolyte, qui pourrait être le paramètre limitant l'intensité. Le choix a alors été fait d'augmenter artificiellement la conductivité ionique des eaux usées grâce à un ajout de 60 mM de KCl. Cet ajout réalisé au jour 7 a augmenté la conductivité de 1.2 à 5.3 mS/cm. Quasi instantanément, le courant est passé de 27 mA à 80 mA ( $4.5 \text{ A/m}^2$ ).

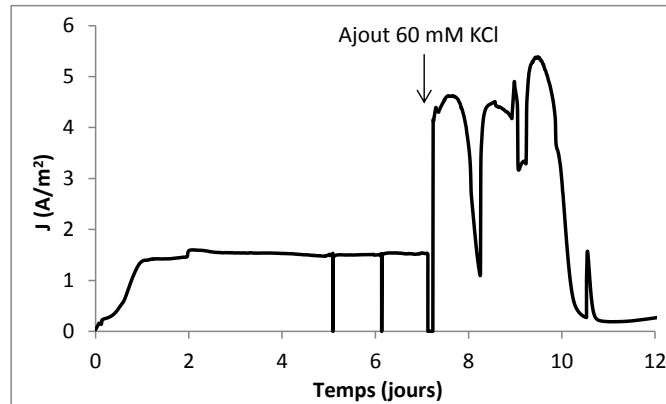


Figure 53 : Chronoampérométrie enregistrée pendant 12 jours pour l'expérience « MF-MEC 3 ».

L'influence positive de l'ajout de 60 mM KCl a clairement validée la limitation par le transport ionique dans l'électrolyte. Ce constat n'est pas anodin si l'on envisage une montée en échelle du procédé d'électrolyse microbienne et une augmentation significative du courant. La conductivité des eaux usées risque de ne pas être suffisante pour assurer une vitesse de transport des ions suffisante et pourrait devenir une sérieuse limitation du procédé.

Cette limitation n'avait pas été révélée lors des essais précédents MF-MEC 1 et 2, alors que les densités de courant étaient 50% plus importantes ( $J_{max}$  voisins de  $3 \text{ A/m}^2$ ). La seule différence de mise en œuvre entre les deux premiers essais et le troisième essai concernait l'ajout, dans le premier cas uniquement, de 20 mL de boues activées en tant qu'inoculum. Cet ajout de boues activées est sans doute à l'origine

d'une augmentation de la conductivité des eaux usées, ce qui a permis de ne pas être limité par le transport ionique au sein des réacteurs MF-MEC 1 et MF-MEC 2. Une autre différence est suspectée et concerne la distance entre l'anode et la référence au sein des réacteurs d'électrolyse microbienne. Cette distance a peut-être été plus importante dans le cas de l'essai 3. Les réacteurs sont identiques mais le montage des électrodes est réalisé avec des connecteurs flexibles (fil de platine). Il est possible, spécialement lors de la fermeture des réacteurs, que la distance entre l'anode et la cathode varie de quelques centimètres d'un réacteur à l'autre. Inévitablement, si tel est le cas, une plus grande distance induit une plus grande résistance ohmique.

### 1.2.2 Voltammétries cycliques

Deux autres ajouts de 60 mM de KCl ont été réalisés à t=20 et t=21 jours et la conductivité résultante a été mesurée à 10.5 et 14.7 mS/cm. Suivant chaque ajout de KCl, une voltammétrie cyclique est réalisée sur la bioanode lorsqu'un courant maximal stable est atteint en chronoampérométrie (Figure 54). Il apparaît qu'une conductivité de 10.5 mS/cm est optimale (au moins suffisante) pour notre système d'électrolyseur sans membrane dans la gamme de courant 60-120 mA. Des ajouts supplémentaires ne permettent plus d'augmenter les performances anodiques dans cette gamme de courant. En effet, à partir de 10.5 mS/cm les courbes de voltammétrie cyclique se superposent.

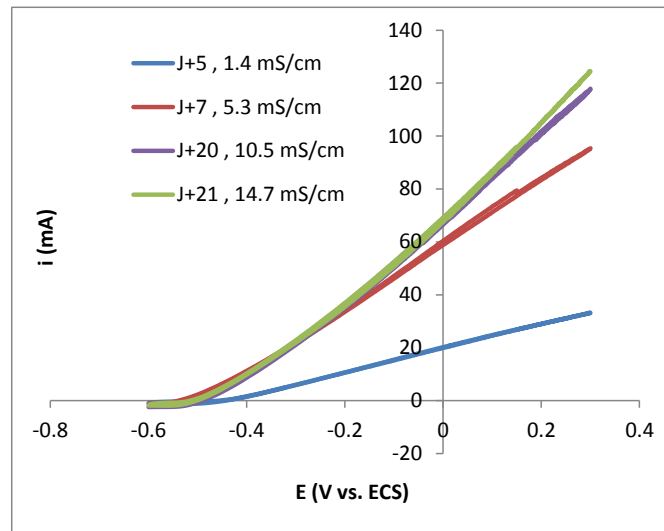


Figure 54 : Effet de l'ajout croissant de KCl (augmentation de la conductivité) sur les voltammétries cycliques (vitesse de balayage 1 mV/s) réalisées sur l'anode du réacteur MF-MEC3, lorsque le courant est maximal en chronoampérométrie.

Avec l'ajout de KCl à 120 mM dans les eaux usées, le courant atteint 100 mA (soit 5.5 A/m<sup>2</sup>) dans les réacteurs de 0.7 L. Ce courant correspondrait à une production théorique de 1 L d'hydrogène / jour si celui-ci n'est pas re-consommé par les méthanogènes ou ré-oxydé à l'anode. Dans ces conditions, la tension d'électrolyse a été mesurée à 2 V lorsque le système travaille à sa densité de courant maximale (5 A/m<sup>2</sup>). L'énergie électrique alors fournie à l'électrolyseur apparaît importante comparée à celles des électrolyseurs microbiens de la bibliographie dont la tension d'électrolyse est donnée entre 0.5 V et 1.4 V (Raphael Rousseau, 2013).

La tension de réversibilité d'une cellule d'électrolyse microbienne étant proche de 0.2 V, il apparaît que la majorité de l'énergie fournie correspond aux surtensions anodiques et cathodiques nécessaires pour activer les cinétiques des réactions aux électrodes ainsi qu'à la chute ohmique de la cellule. Cela peut sans doute s'expliquer par la configuration peu avantageuse de nos réacteurs (distance entre anode et cathode ; surface cathodique 10 fois plus petite que la surface anodique), et aux cinétiques lentes de dégradation de la matière organique complexe. En effet, nos réacteurs sont alimentés en biodéchets bruts, plus difficilement dégradables que l'acétate, molécule modèle habituellement utilisée dans les cellules d'électrolyse microbienne de laboratoire.

### 1.2.3 Limitations et optimisations

La ré-oxydation de l'hydrogène à l'anode est une limitation majeure des systèmes sans membrane, que nous avons pointée du doigt dans la section 1.1. En dépit de ce problème, les électrolyseurs microbiens sans membrane sont tout de même beaucoup décrits dans la bibliographie. En effet, ce procédé possède un atout majeur : l'absence de membrane n'ajoute pas de résistance supplémentaire au transport ionique en solution. Certains auteurs ont réussi à limiter la re-consommation de l'hydrogène produit, soit en travaillant avec une souche pure non méthanogène ou bien en inhibant le développement des espèces méthanogènes lorsqu'ils utilisent des inocula complexes. Ainsi, Hu et al. (2008) ont atteint une production stable d'hydrogène à partir d'acide lactique en utilisant une culture pure de *Shewanella oneidensis*. En culture mixte, les mêmes auteurs limitent la production de méthane en exposant de manière séquentielle la cathode à l'air pour limiter la prolifération des méthanogènes. Catal et al. (2015) proposent l'utilisation d'antibiotiques pour limiter l'activité des méthanogènes.

Même si ces améliorations sont envisageables pour travailler avec des électrolyseurs sans membrane, ces systèmes ne sont pas retenus pour la suite de l'étude. En effet, l'installation puis la prolifération non contrôlable de méthanogènes paraît inévitable sur le long terme pour un fonctionnement continu ou semi-continu dans un réacteur sans membrane alimenté en déchets. C'est pourquoi l'utilisation d'un séparateur entre le compartiment anodique et cathodique est apparue comme une solution nécessaire, malgré la résistance au transfert ionique qu'elle implique. La présence d'une membrane doit permettre la récupération d'hydrogène pur dans le compartiment cathodique sans risque qu'il soit ré-oxydé ni qu'il soit « pollué » par les gaz produits à l'anode ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{CH}_4$ ,...).

Nous avons donc œuvré à la conception d'un design d'électrolyseur avec membrane adapté à notre effluent faiblement conducteur.

## 2 Dimensionnement d'un prototype d'électrolyseur microbien AVEC membrane

### 2.1 Architecture du réacteur

Comme constaté avec les essais en électrolyseurs sans membrane, la conductivité des milieux utilisés peut rapidement devenir un facteur limitant du procédé d'électrolyse lorsque trop faible, elle induit un transfert ionique trop lent dans l'électrolyte par rapport à la cinétique de la réaction anodique. La

résistivité de l'électrolyte  $\rho$  (inverse de la conductivité  $\rho=1/\sigma$ ) génère une résistance proportionnelle à la distance entre anode et cathode, qui s'exprime pour des électrodes parallèles par :

$$R = \rho L/S$$

avec  $\rho$  la résistivité ; L la distance entre électrodes et S la surface des électrodes

Cette résistance entraîne une consommation énergétique supplémentaire puisqu'il faut fournir à l'électrolyseur plus de puissance pour produire une même quantité d'hydrogène. Il est donc essentiel de limiter cette résistance en minimisant la distance entre anode et cathode. C'est pourquoi les réacteurs électrochimiques ont généralement une configuration dite « filtre-presse ». Cette architecture a donc été retenue pour le design de notre électrolyseur avec membrane.

## 2.2 Alimentation en anolyte

L'anolyte est l'électrolyte du compartiment anodique. Sa distribution est un point important à considérer pour éviter les zones mortes (vitesse du fluide nulle) et assurer un bon transfert du substrat biodéchet vers le biofilm. Pour ces raisons, nous avons choisi de réaliser un compartiment anodique étroit avec un ratio hauteur/largeur assez important, égal à 9. L'alimentation en anolyte se fait par le bas du compartiment qui a une forme conique pour permettre une distribution homogène sur l'électrode (Figure 55).

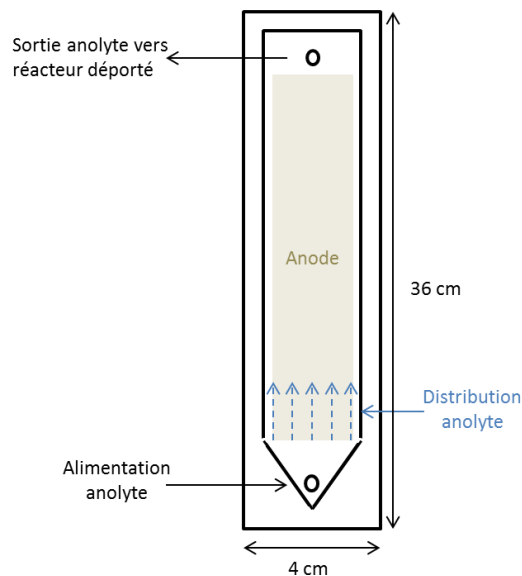
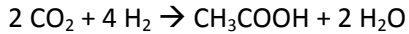


Figure 55 : Représentation schématique du compartiment anodique, vue en coupe.

## 2.3 Production d'hydrogène

L'objectif est de pouvoir alimenter un bioréacteur gaz-liquide de 200mL avec un débit d'hydrogène suffisant pour assurer une vitesse de production d'acétate de 50 mM/jour, vitesse maximale reportée

pour un système d'électrosynthèse (LaBelle et al., 2014). Cette vitesse de production implique une consommation de 200 mM/jour d'hydrogène selon la réaction :



soit 4.5 L<sub>H<sub>2</sub></sub>/L<sub>réacteur</sub>/jour, ce qui revient à une consommation de 0.9 L<sub>H<sub>2</sub></sub>/jour pour produire 50 mM/jour d'acétate dans un bioréacteur gaz-liquide de 200mL. En considérant que 100 % de l'hydrogène apporté au réacteur est utilisé, il faut donc que l'électrolyseur produise un débit de 0.9 L<sub>H<sub>2</sub></sub>/jour pour alimenter un contacteur de 200 mL. Considérer un rendement d'utilisation d'hydrogène de 100% est une vision très optimiste qui n'est pas réaliste. Cependant, cette hypothèse optimiste a été choisie au regard de la vitesse de production visée (50 mM/jour d'acétate) qui est, elle aussi, une supposition très optimiste. Dans la bibliographie, les cinétiques de production maximale d'acétate obtenues sont plus généralement comprises entre 1 et 17 mM/jour pour la mise en œuvre de culture mixte (Tableau 3 du Chapitre 1).

Plutôt qu'une production de 50 mM/jour d'acétate et un taux de conversion d'hydrogène de 100%, une hypothèse plus réaliste serait une production de 10 mM/jour d'acétate avec un taux de conversion d'hydrogène de 20%. Dans ces deux cas, l'électrolyseur doit pouvoir fournir un débit d'hydrogène de 0.9 L<sub>H<sub>2</sub></sub>/jour.

## 2.4 Surface de l'anode

Le calcul suivant permet de déterminer le courant nécessaire pour produire un débit de 0.9 L<sub>H<sub>2</sub></sub>/ jour en sortie du compartiment cathodique de l'électrolyseur microbien :

---

### Calcul

Réaction cathodique :  $2 \text{H}_2\text{O} + 2 \text{e}^- \rightarrow 2\text{OH}^- + \text{H}_2$

Il faut 2 moles d'électrons pour produire une mole d'hydrogène.

Le courant nécessaire est donc  $i = Q_{\text{H}_2} * F * 2 / V_m = 90 \text{ mA}$

avec  $Q_{\text{H}_2}$  = débit en L/sec,  $F = 96485 \text{ Cb/mole}$ ,  $V_m$  = volume molaire des gaz parfaits = 22.41 L/mole

---

Pour générer un courant de 90 mA dans la cellule d'électrolyse microbienne, en considérant une densité de courant moyenne de 7 A/m<sup>2</sup> (valeur estimée à partir des essais précédents – Chapitre 3 section 4), la surface anodique nécessaire est de 128 cm<sup>2</sup> d'anode (0.09/7).

En réalité, compte tenu de la contrainte stérique du compartiment anodique, seulement 80 cm<sup>2</sup> d'anode ont pu être utilisés. Pour compenser cette réduction de la taille de la bioanode, il faudra donc atteindre une densité de courant moyenne de 11 A/m<sup>2</sup> pour produire 0.9 L<sub>H<sub>2</sub></sub>/ jour (soit 40 mmoles H<sub>2</sub> /jour).

## 2.5 Volume du compartiment anodique

L'anolyte utilisé est composé d'eaux usées inoculées grâce à une électrode primaire et supplémentées avec des biodéchets, comme défini dans les Chapitres 3 et 4 consacrés à l'optimisation des cinétiques

anodiques. Pour définir un volume d'anolyte, il faut tout d'abord considérer la cinétique d'abattement de la matière organique (DCO) à l'anode. En ne considérant que la réaction électrochimique à l'anode, une mole de DCO dégradée aboutit à la production de 4 moles d'électrons soit 2 moles d'hydrogène. Si le réacteur travaille à vitesse maximale (90mA), il produit 40 mmoles H<sub>2</sub>/j ce qui correspond à un abattement minimum théorique de 20 mmoles DCO/jour soit environ 0.6 g DCO / jour.

En réalité, il n'y a pas que la réaction d'oxydation à l'anode qui participe à l'abattement de la DCO. Il faut aussi considérer les réactions « parasites » de dégradation de la matière par la biomasse aérobie et anaérobie planctonique et/ou non électroactive du biofilm anodique. Le rendement faradique permet de quantifier la part de la matière organique dégradée et valorisée en courant à l'anode par rapport à la quantité totale de matière organique dégradée dans le compartiment anodique.

Les expériences précédentes (section 4.5) ont montré que des vitesses d'abattement de l'ordre de 17 mgDCO/cm<sup>2</sup>/jour étaient observées dans un réacteur de 600mL d'eaux usées inoculé avec des boues (3% v/v) et alimenté avec des biodéchets. Ces vitesses ont été obtenues avec une surface d'anode de 6 cm<sup>2</sup>. En faisant l'hypothèse que cette vitesse est toujours valable avec une surface d'anode de 80 cm<sup>2</sup>, la capacité d'abattement d'une anode de 80 cm<sup>2</sup> est alors de 1.4 g DCO / jour, avec un rendement faradique de 43% (0.6/1.4). Il conviendra de vérifier lors des expériences que ce rendement est effectivement réaliste. Dans des essais précédents avec des biodéchets, des rendements faradiques autour de 10% seulement ont été obtenus (Chapitre 3 section 5), mais le ratio Surface d'électrode/Volume d'électrolyte était 13 fois plus faible (6 cm<sup>2</sup> vs. 80 cm<sup>2</sup>). Les faibles ratios Surface d'électrode/Volume d'électrolyte ne sont pas propices à l'obtention d'un rendement faradique élevé, puisque l'impact de la réaction électrochimique (surfactive) est minoritaire par rapport aux autres réactions biochimiques qui ont lieu en solution. Ces considérations sont largement discutées dans les travaux de Ketep et al. (2013) et Rimboud et al. (2014).

Le scénario proposé lors du calcul du dimensionnement de l'électrolyseur est d'apporter le biodéchet dans l'anolyte avec une concentration de 0.7 g DCO/L, identique à celle utilisée dans les électrolyseurs sans membrane. Cette concentration permet d'éviter l'inhibition du biofilm. En effet, des ajouts trop importants de biodéchets (pH < 6.5 ; DCO > 1.2 g/L) entraînent une baisse conséquente des performances catalytiques du biofilm. Pour traiter 1.4 g DCO/jour, sans dépasser la limite de 0.7 g DCO/L, on peut prévoir un ajout de biodéchets bruts (DCO = 43 g/L) par jour de 31 mL (43/1.4) dilué dans un volume de deux litres. Pour des raisons pratiques, nous avons choisi de limiter le volume d'anolyte à 1L. Nous avons en conséquence adapté l'apport en biodéchets bruts à deux ajouts journaliers de 16.5 mL chacun.

Pour limiter l'encrassement du compartiment anodique et réaliser des prélèvements d'anolyte sans l'ouvrir, nous avons choisi de travailler avec un compartiment anodique de 500 mL hydrauliquement connecté à un réservoir déporté de 500 mL via une pompe de recirculation à débit variable. Le réacteur déporté peut être thermostaté et instrumenté (sonde pH et température).



## 2.6 Choix du catholyte et de la membrane de séparation

Le séparateur doit avoir un seuil de coupure inférieur à 0.2  $\mu\text{m}$  pour permettre de maintenir les microorganismes côté anode. Par ailleurs, la membrane doit permettre la migration des ions en solution avec une résistance au transport des ions la plus faible possible pour limiter la chute ohmique.

Plusieurs options ont été envisagées, dont certaines ont été schématisées pour une première évaluation théorique de leur pertinence :

Tout d'abord, une version « classique » (Figure 56) est proposée avec une membrane de microfiltration servant de barrière physique aux microorganismes. Son rôle est uniquement d'éviter la contamination microbiologique du catholyte qui est simplement composé d'eau. Le libre passage des charges au travers de la membrane devrait permettre d'éviter le phénomène d'osmose. Le pH devrait s'équilibrer de part et d'autre de la membrane.

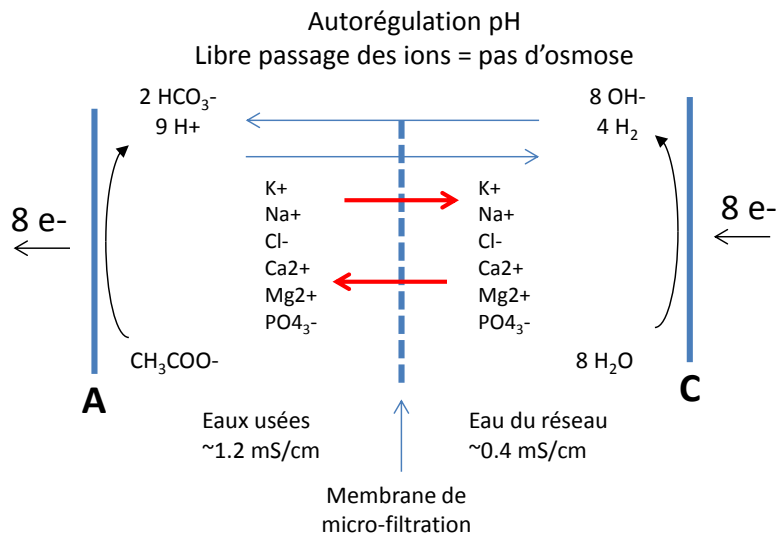


Figure 56 : Premier choix de combinaison du catholyte et de la membrane pour le procédé d'électrolyse microbienne avec membrane : utilisation d'eaux usées à l'anode, d'une membrane de microfiltration et d'eau potable comme catholyte.

Dans la version classique, la faible conductivité initiale des électrolytes peut être un facteur limitant les performances du système. En effet, après équilibre du système, on peut estimer que la conductivité dans les deux électrolytes sera une valeur moyenne entre les deux conductivités initiales des électrolytes si les volumes d'électrolytes mis en jeu sont équivalents, c'est-à-dire autour de 0.8 mS/cm. Même dans le cas où le volume de catholyte serait largement plus faible que le volume d'anolyte, la conductivité moyenne n'excédera jamais la conductivité initiale de l'anolyte qui est de 1.2 mS/cm. Nous avons montré dans la partie 1.2 que dans une cellule d'électrolyse microbienne fonctionnant à plusieurs dizaines de mA et dans laquelle les électrodes sont distantes de plusieurs centimètres, la conductivité minimale indispensable pour ne pas impacter les performances du procédé ne devrait pas descendre sous la valeur de 5.3 mS/cm.

Nous avons donc pensé à une autre version (Figure 57) dans laquelle l'ajout de KCl permettrait d'augmenter la conductivité du catholyte. En complément, nous avons choisi d'utiliser une membrane échangeuse d'ions sélective des anions ou bien des cations. Avec une membrane échangeuse de cations (Figure 57A), la diffusion des ions  $K^+$  du catholyte, où leur concentration est en large excès, vers l'anolyte pourrait gêner la migration des cations nécessaires au transfert de charges entre anode et cathode et ainsi limiter le courant d'électrolyse. Dans le même temps, le blocage des anions par la membrane échangeuse de cations va entraîner une accumulation des ions  $OH^-$  dans le compartiment cathodique et donc une élévation du pH, défavorable à la réaction de production de l'hydrogène sur la cathode. Enfin, les cations présents en concentrations importantes dans le compartiment anodiques ( $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ , ...) assureront le transfert de charges en solution et les protons aux faibles concentrations s'accumuleront dans le compartiment anodique. En conséquence, l'acidification du compartiment anodique devrait être assez importante puisque l'anolyte n'est pas tamponné.

En présence d'une membrane échangeuse d'anions (Figure 57.B), le compartiment cathodique perd des chlorures et s'enrichit en KOH. Le compartiment anodique s'acidifie puisque les ions  $H^+$  ne traversent pas la membrane. En revanche, les acides faibles comme l'acétate (pKa 4.75), le propionate (pKa 4.87) ou le butyrate (pKa 4.92) qui servent de substrats pour le biofilm électroactif peuvent passer dans le catholyte à pH neutre puisqu'ils sont majoritairement sous forme déprotonnés. Ces deux configurations ne sont pas satisfaisantes et ne sont donc pas retenues pour la suite des réflexions.

Toutefois, dans le premier cas (Figure 57.A), pour pallier au problème d'acidification de l'anolyte et d'accumulation de KOH dans le catholyte, une solution pourrait être de rediriger le catholyte vers l'anolyte. Ce système pose néanmoins le problème d'étanchéité pour la récupération de l'hydrogène. Par ailleurs, l'ajout d'une solution saline dans l'anolyte peut être problématique dans la mesure où l'effluent doit être traité. Aussi, l'augmentation de la salinité de l'anolyte dans des proportions trop importantes peut altérer la viabilité de certains microorganismes et en conséquence impacter les performances de la bioanode. Il reste que cette solution ne peut pas être totalement exclue sur la base de nos considérations théoriques et devrait être testée pour l'évaluer d'un point de vue pratique.

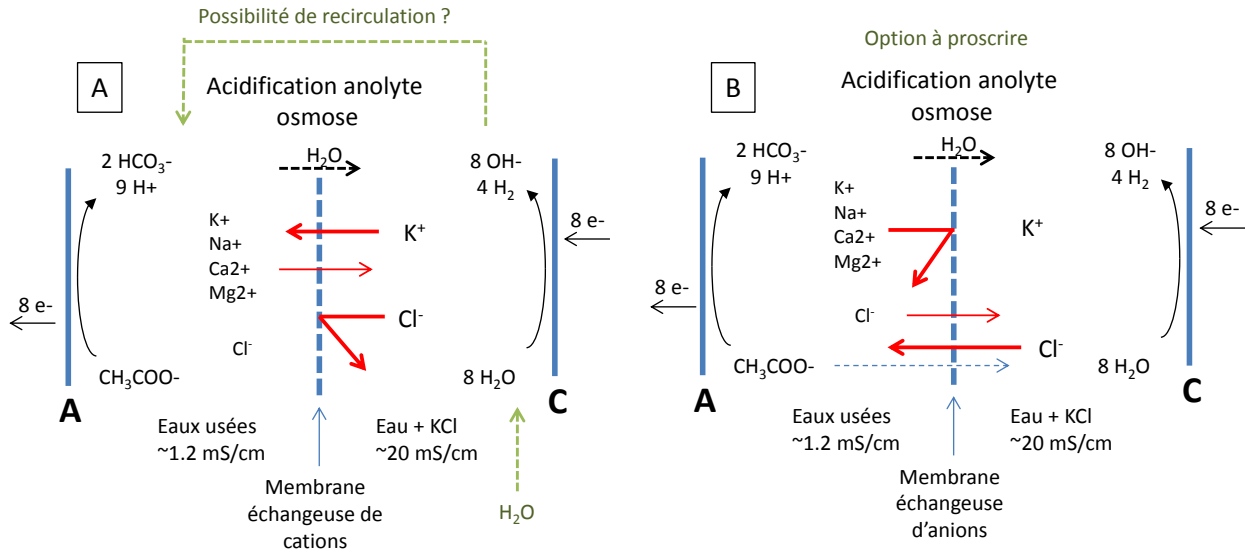


Figure 57 : Options non retenues pour le choix combiné du catholyte et de la membrane pour le procédé d'électrolyse microbienne avec membrane, avec le traitement d'eaux usées à l'anode : une membrane échangeuse d'ions et un catholyte constitué d'une solution de KCl. (A) avec une membrane échangeuse de cations, la diffusion des ions  $K^+$  vers l'anolyte gêne la migration des co-ions, le compartiment cathodique s'enrichit en KOH, et l'acidification du compartiment anodique est importante. Une solution serait ici de rediriger le catholyte vers l'anolyte (B) avec une membrane échangeuse d'anions, le compartiment cathodique perd des chlorures, s'enrichit en KOH et le compartiment anodique s'acidifie. De plus, les acides faibles peuvent passer dans le catholyte. Cette version est à proscrire.

Finalement une autre option consiste à utiliser une solution tampon phosphate à la cathode (Figure 58). Les ions phosphates, en plus d'améliorer la conductivité du catholyte et de présenter un bon pouvoir tampon, ont l'avantage d'améliorer la cinétique cathodique de la réaction de production d'hydrogène sur l'acier (De Silva Muñoz et al., 2010). La concentration du tampon phosphate a été définie d'après cette même étude dans laquelle les auteurs utilisent une solution phosphate 1 M, et également à partir de travaux plus récents réalisés au LGC dans le cadre du stage de Master II de Vera Bartenstein en 2013. Dans son mémoire, elle rapporte des problèmes d'osmose entraînant une augmentation significative du volume du catholyte dès que la concentration en tampon phosphate est supérieure à 0.5M. Une concentration de 0.4 M, issue du compromis entre efficacité catalytique et limitation du phénomène d'osmose a donc été choisie. Ce catholyte présente une conductivité autour de 30 mS/cm.

Avec une membrane échangeuse de cations (Figure 58.A), le compartiment cathodique reste tamponné car il ne perd pas de phosphate. En revanche l'acidification du compartiment anodique sera vraisemblablement importante. Avec une membrane échangeuse d'anions (Figure 58.B), le compartiment cathodique perd des ions phosphates. L'acidification du compartiment anodique est compensée par le flux d'ions phosphates, ce qui peut constituer sans doute une bonne solution de laboratoire mais suppose une grande consommation de phosphates non réaliste à l'échelle industrielle.

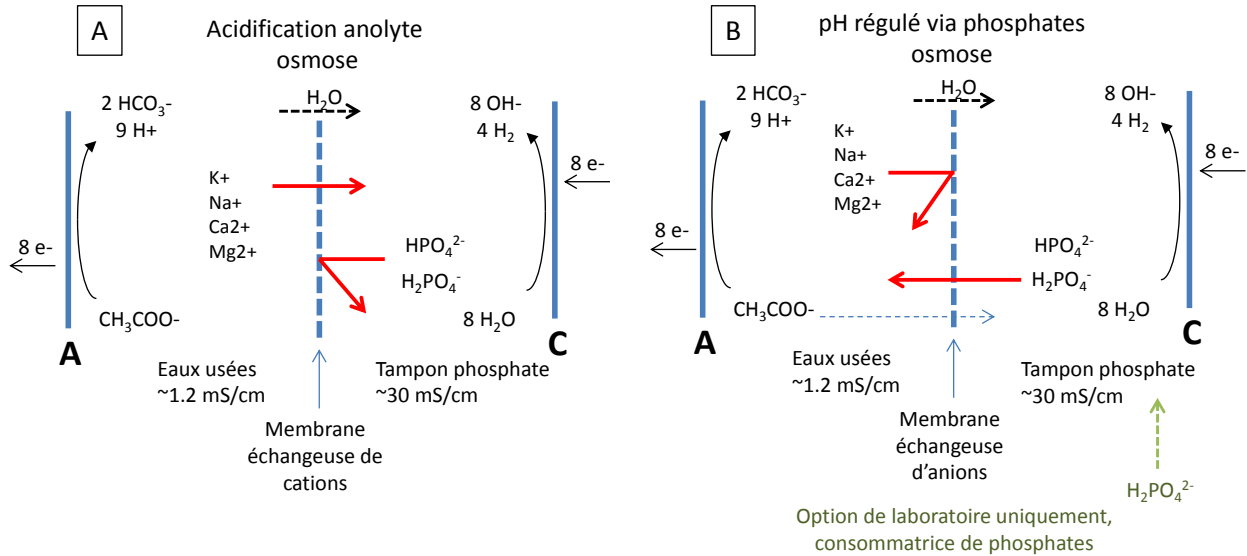


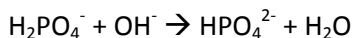
Figure 58 : Deuxième configuration retenue pour le choix combiné du catholyte et de la membrane pour le procédé d'électrolyse microbienne, avec le traitement d'eaux usées à l'anode : une membrane échangeuse d'ions et un catholyte constitué d'une solution tampon phosphate 0.4M, (A) avec une membrane échangeuse de cations et (B) avec une membrane échangeuse d'anions.

A l'issue de ces réflexions, deux stratégies ont été retenues pour le couple séparateur / catholyte :

- L'utilisation d'une membrane de microfiltration (pores de 0.1  $\mu\text{m}$ ) associée à un catholyte de type eau courante (conductivité d'environ 1 mS/cm).
- L'utilisation d'une membrane échangeuse de cations associée un catholyte de type solution tampon phosphate 0.4M (conductivité d'environ 30 mS/cm)

## 2.7 Volume du compartiment cathodique

Le compartiment cathodique a été dimensionné à partir de la contrainte suivante : le prototype de laboratoire doit fonctionner au moins 7 jours à vitesse maximale (90 mA) avant le remplacement du catholyte, lorsque celui-ci est constitué d'une solution tampon phosphate (0.4 M). Le volume du catholyte doit donc être suffisant pour neutraliser les ions  $\text{OH}^-$  produits à la cathode en 7 jours. Le pouvoir tampon de la solution tampon phosphate repose sur le couple dihydrogénophosphate ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) / hydrogénophosphate ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ) ( $\text{pK}_A = 7.2$ ).



La concentration initiale choisie en  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  de 0.28 M et en  $\text{HPO}_4^{2-}$  de 0.12 M, donne un pH initial de 6.8 ( $\text{pK}_A + \log [\text{HPO}_4^{2-}] / [\text{H}_2\text{PO}_4^-]$ ). La production d'une mole de  $\text{H}_2$  s'accompagne de la production de 2 moles d' $\text{OH}^-$ . La vitesse de production d'ions hydroxyde est donc :  $r[\text{OH}^-] = 2 * 40 = 80 \text{ mmoles / j}$ .

En 7 jours, 560 mmoles d'ions hydroxyde sont donc produites et 560 mmoles d'ions  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  sont transformés en ions  $\text{HPO}_4^{2-}$ . La concentration initiale en ions  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  étant de 280 mM, un volume

minimum de catholyte de 2.2 L est au moins nécessaire pour qu'en 7 jours le pH ne dérive de façon excessive au-delà d'un pH supérieur à 8.0 (Figure 59).

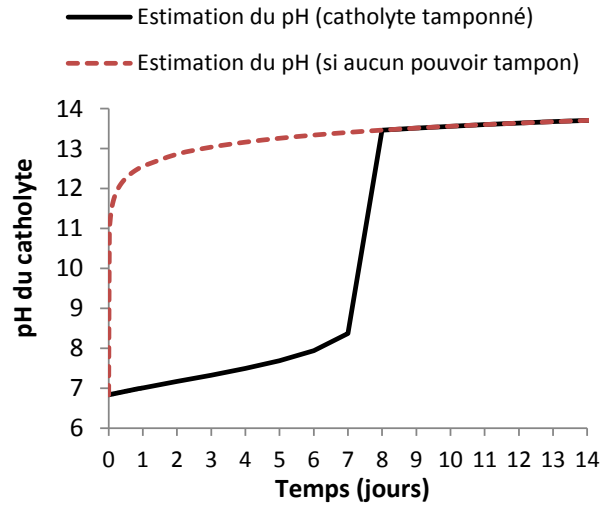


Figure 59 : Estimation de l'évolution du pH dans le compartiment cathodique en considérant une solution tampon phosphate 0.4 M pH 6.8, une production de OH<sup>-</sup> à la cathode à la vitesse de 80 mmoles/j et un volume de solution de 2.2 L.

## 2.8 Bilan sur le dimensionnement

Le Tableau 9 suivant fait le bilan du cahier des charges du prototype.

Tableau 9 : Objectifs et contraintes à l'origine du dimensionnement du pilote

Objectifs	Contraintes	Solutions
0.9 LH <sub>2</sub> /jour	Faible conductivité de l'anolyte	Réacteur filtre-presse
	Alimentation continue	Compartiment anodique étroit et haut pour un transfert optimal
	Biofilm / colmatage	Pompe de recirculation à débits variables
90 mA	Performances moyenne = 7 A/m <sup>2</sup>	Surface de l'anode ≥ 128 cm <sup>2</sup>
1.4 gDCO/jour	Inhibition biofilm à partir de 1.2gDCO/L Choix : 0.7 gDCO/L par ajout	Deux ajouts de 0.7 gDCO par jour Volume anolyte 1L
Compartiment cathodique abiotique	Le catholyte est de l'eau ; la seule contrainte du séparateur est de retenir les bactéries dans l'anolyte	Membrane de microfiltration
	Le catholyte est une solution phosphate 0.4 M : Eviter que les ions phosphate ne transfèrent vers l'anolyte	Membrane échangeuse de cations
Durée de vie du catholyte = 1 semaine	Solution tampon phosphate 0.4 M pH < 8 pendant 7 jours	Volume catholyte ≥ 2200 mL

Ce dimensionnement a abouti à la fabrication du prototype, dont les plans sont présentés sur les Figure 60 Figure 61.

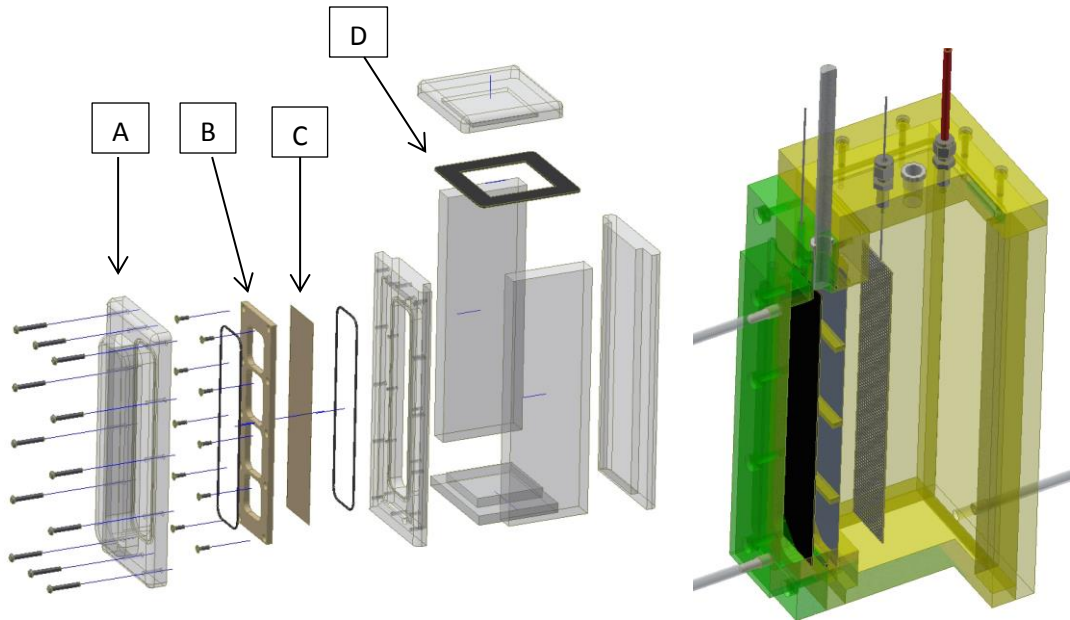


Figure 60 : A gauche : Vue éclatée du prototype ; A droite : Prototype en coupe, vue en perspective ¾

A	Compartiment anodique	Volume 500 mL	Eaux usées + biodéchets (0.7 gDCO/L)
B	Support pour membrane	Ouverture 110 cm <sup>2</sup>	
C	Membrane	Surface 137.5 cm <sup>2</sup> (55*250 mm)	Membrane échangeuse de cations = Fumasep FKE (Fumatech) Membrane de microfiltration = S80610 : Supor-100 membrane, 0.1 µm, 8" x 10" sheet (Pall Corporation)
D	Compartiment cathodique	Volume 2200 mL	Solution tampon phosphate (0.4 M) OU Eau du réseau

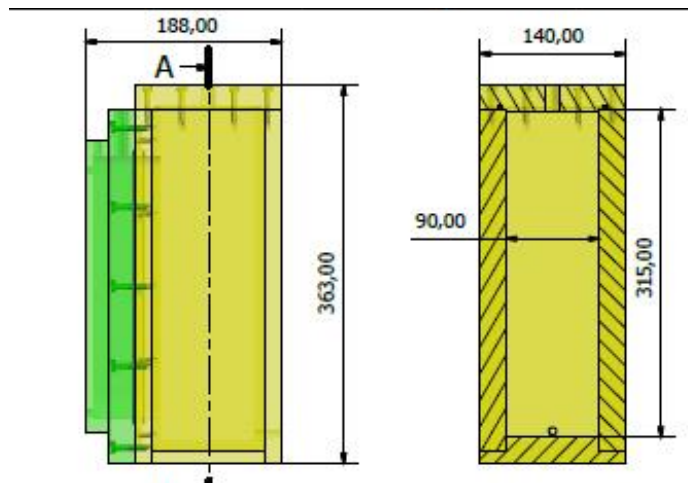


Figure 61 : Projection orthogonale du prototype : vue de face et vue de droite

### 3 Tests avec le prototype d'électrolyseur microbien AVEC membrane

Le prototype d'électrolyseur microbien a été fabriqué par le service technique du LGC, à partir de notre dimensionnement et des plans de réalisation effectués par le bureau d'étude du LGC. Enfin, les deux configurations (couple membrane / catholyte) proposées lors du dimensionnement ont été testées au laboratoire.

#### 3.1 Première configuration (membrane de microfiltration / catholyte : eau courante)

La membrane utilisée est une membrane de microfiltration de marque « Pall » en Polyethersulfone (hydrophile) avec un diamètre de pores de 0.1  $\mu\text{m}$  (référence : Supor-100 membrane, 0.1  $\mu\text{m}$ , 8" x 10" sheet). Son rôle est d'empêcher les cellules microbiennes de passer dans le compartiment cathodique et de permettre de récupérer l' $\text{H}_2$  pur en sortie des gaz.

Le compartiment anodique est inoculé avec une électrode préalablement colonisée (comme dans l'expérience MF-MEC3). Pour ce premier test, le substrat utilisé est de l'acétate (10mM) pour s'affranchir des problèmes de cinétique lié à la dégradation lente des biodéchets. Il s'agit de se mettre dans des conditions mieux contrôlées pour évaluer et comparer les performances de l'électrolyseur. L'anolyte, avec un volume de un litre, est de l'eau usée supplémentée avec des ajouts successifs d'acétate (0.6 gDCO/L). Le catholyte est de l'eau potable, avec un volume de 2.2 L. L'anode est polarisée à 0.15 V/ ECS.

##### 3.1.1 Chronoampérométrie et débits d'hydrogène

Les résultats de la chronoampérométrie sont présentés sur la Figure 62. Après 2 jours, la densité de courant atteint déjà 3  $\text{A}/\text{m}^2$  et continue toujours d'augmenter. L'arrêt de la climatisation à  $t=2.5$  jours dans le laboratoire permet d'augmenter progressivement la température de l'anolyte de 21°C à 28°C et impacte la cinétique de développement des microorganismes. L'augmentation de la température est corrélée avec l'augmentation du courant jusqu'au jour 4. Avec cette première configuration, les densités de courant maximales sont comprises entre 5 et 7.5  $\text{A}/\text{m}^2$ . L'ajout de sels (30 mM KCl et 30 mM  $\text{NaHCO}_3$ ) dans les deux compartiments à  $t= 19$  jours permet d'augmenter la conductivité du catholyte d'environ 7 mS/cm à environ 20 mS/cm (mesures effectuées uniquement dans le catholyte). Cet ajout de sels a un impact sur la densité de courant obtenue qui augmente jusqu'à 9.5  $\text{A}/\text{m}^2$ . Cela indique que la conductivité de l'électrolyte est ici un facteur limitant.

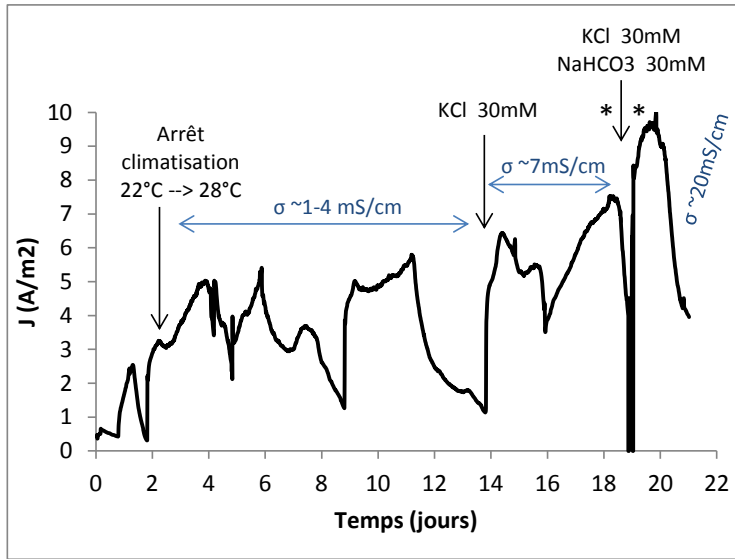


Figure 62 : Evolution de la densité de courant sur l'anode de  $80\text{ cm}^2$  polarisée à  $0.15\text{ V/ECS}$  dans le prototype d'électrolyseur microbien avec membrane de microfiltration. Le réacteur est alimenté avec de l'acétate ( $10\text{ mM}$ ), l'anolyte est de l'eau usée et le catholyte est de l'eau courante (environ  $1\text{ mS/cm}$ ). KCl  $30\text{ mM}$  et  $\text{NaHCO}_3\ 30\text{ mM}$  sont ajoutés au jour 14 et 19 dans les deux compartiments pour augmenter la conductivité. \* Des mesures d'impédances entre anode et cathode sont réalisées avant et après l'ajout de sels.

Le débit d'hydrogène récupéré en sortie du compartiment cathodique est mesuré grâce à un compteur volumétrique, qui n'a été connecté qu'à partir du jour 6. Le débit de gaz mesuré concorde bien avec le débit théorique calculé grâce à la relation ( $QH_2 = i \cdot V_m / 2 \cdot F$ ). Ainsi, la membrane empêche les bulles d'hydrogène de fuir vers le compartiment anodique. Tout l'hydrogène produit à la cathode est bien récupéré en sortie du compartiment cathodique (Figure 63).

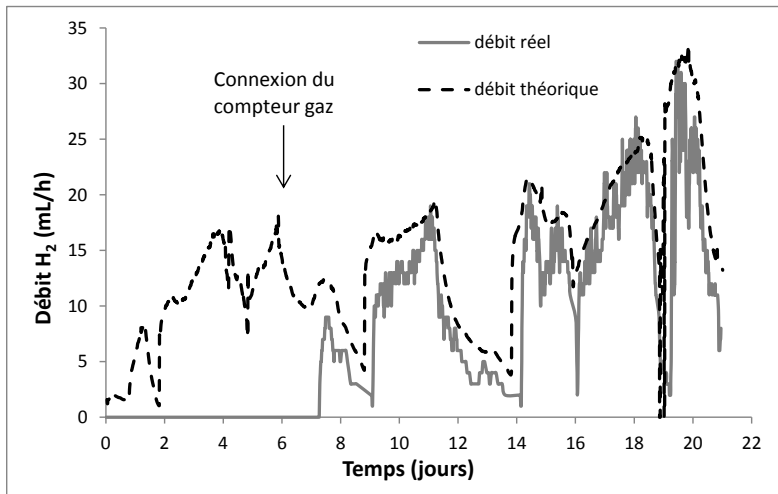


Figure 63 : Débit théorique (rouge) et débit mesuré (bleu) d'hydrogène produit avec le prototype de MEC avec membrane de microfiltration alimenté en acétate ( $10\text{ mM}$ ).

A  $t = 20$  jours, sous un courant proche de  $80\text{ mA}$  ( $10\text{ A/m}^2$ ), le débit d'hydrogène atteint  $720\text{ mL/jour}$ , ce qui se rapproche de l'objectif fixé initialement lors des réflexions sur le dimensionnement du MEC ( $900\text{ mL H}_2/\text{jour}$ ).



Au cours du fonctionnement, un déplacement d'eau du catholyte vers l'anolyte a été observé. Ce phénomène d'osmose n'était en principe pas attendu avec une membrane de microfiltration mais, pourtant, le phénomène s'est répété plusieurs fois malgré le ré-équilibrage des niveaux dans les compartiments. Après l'ajout de sels dans le compartiment cathodique au jour 19, les niveaux des deux électrolytes se sont rééquilibrés dans les 2 compartiments.

### 3.1.2 Evaluation de la chute ohmique dans la CEM par spectroscopie d'impédance électrochimique

Pour évaluer la chute ohmique induite par l'ensemble des résistances lors du passage du courant dans la cellule d'électrolyse, des mesures d'impédance ont été réalisées avant et après l'ajout des sels à t=19 jours.

Sur la représentation des diagrammes d'impédance dans le plan complexe de Nyquist (Figure 64), la partie réelle de l'impédance à haute fréquence (axe des abscisses) permet d'estimer une résistance de 7.5 ohms entre anode et cathode. Cette résistance mesurée avec le montage à 2 électrodes correspond à la somme des résistances entre anode et cathode. Il s'agit donc de :

$$R_{\text{système}} = R_{\text{catholyte}} + R_{\text{membrane}} + R_{\text{anolyte}} = 7.5 \text{ ohms}$$

La chute ohmique sur l'électrolyseur fonctionnant à vitesse maximale (80 mA) est donc de 0.6 V ( $U = R \cdot i = 7.5 \cdot 0.08$ ). Après l'ajout de sels, la résistance du système est de nouveau mesurée et présente une valeur plus faible (5.5 ohms). Ce résultat indique que la faible conductivité de l'électrolyte initial engendre certainement une grande part de la chute ohmique.

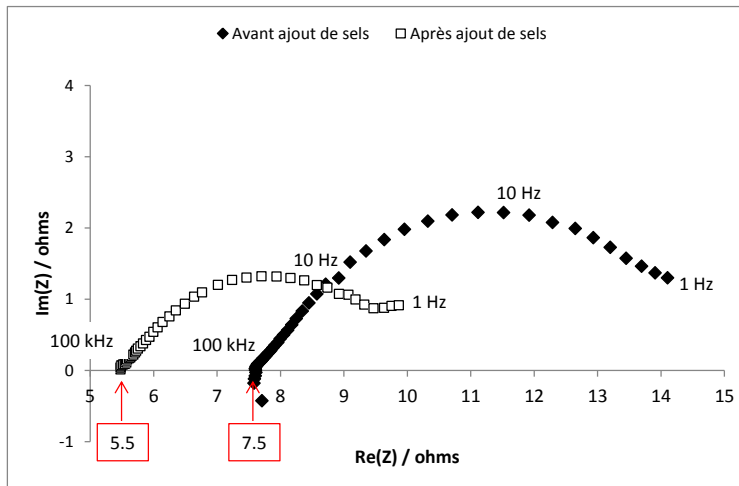


Figure 64 : Représentation dans le plan de Nyquist des mesures d'impédance enregistrées à t=19 jours pour un montage à 2 électrodes. Le courant est fixé à 30 mA (montage galvanostatique). L'amplitude du signal a été fixée à 400  $\mu$ A et la gamme de fréquences de 100 kHz à 1 Hz avec un échantillonnage de 10 points par décade. La valeur de la partie réelle de l'impédance à haute fréquence donne la résistance du système entre l'anode et la cathode : 7.5 ohms et 5.5 ohms après ajout des sels (30mM KCl et 30mM NaHCO<sub>3</sub>).

### 3.1.3 Voltammétries cycliques et tension d'électrolyse

Les voltammétries cycliques réalisées au cours de l'expérience nous renseignent sur les cinétiques anodiques et cathodiques.

Les CVs anodiques et cathodiques sont obtenues en faisant varier le potentiel de l'électrode de travail par rapport à la référence (ECS). Cette référence est insérée proche de l'anode dans le compartiment anodique. La distance entre la référence et l'anode est donc plus faible que la distance entre la référence et la cathode. La chute ohmique correspondant à  $R_{\text{cathode}} + R_{\text{membrane}} + \frac{1}{2} R_{\text{anode}}$  se répercute sur la mesure de la cinétique cathodique tandis que la chute ohmique correspondant à  $\frac{1}{2} R_{\text{anode}}$  se répercute sur la cinétique anodique. Une grande part de la chute ohmique (équivalente à 7.5 fois l'intensité) est donc incluse dans la cinétique cathodique. Le schéma de la Figure 65 illustre cette explication. Pour évaluer seulement la cinétique cathodique, l'idéal aurait été de placer une électrode de référence très proche de la cathode, mais cette option était techniquement difficile pour garder l'étanchéité du compartiment cathodique.

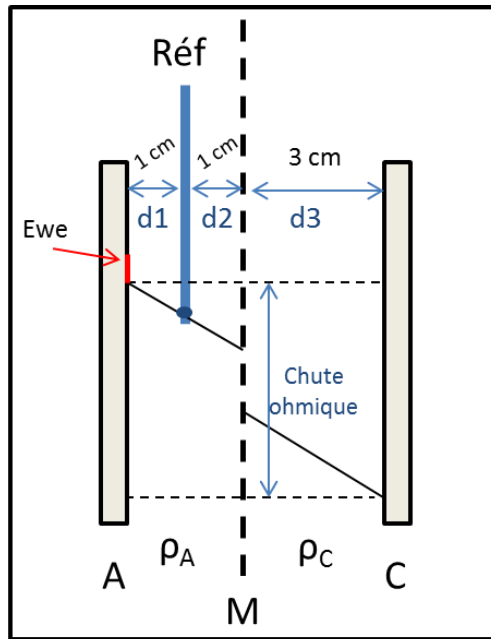


Figure 65 : Configuration à 3 électrodes de la CEM avec membrane (M). L'anode (A) est située à 1 cm de la référence (Réf), elle-même située à 1 cm de la membrane. Dans le compartiment cathodique, 3 cm séparent la cathode de la membrane.

La tension de cellule appliquée à la CEM pour un courant de 80 mA est de 1.8 V. Cette tension est très élevée. De manière générale dans la bibliographie, on retrouve une gamme de tensions de cellules qui s'étend de 0.5V (Rozendal et al., 2006b) jusqu'à 1.4 V (Gil-Carrera et al., 2013). L'intérêt d'un électrolyseur microbien est de pouvoir travailler avec une tension d'électrolyse inférieure à la tension de réversibilité de la décomposition de l'eau (1.23V).

Pour mieux identifier les éléments pénalisant dans notre système, on peut décomposer la tension de cellule avec les différents termes qui la composent : la tension de réversibilité ( $U_{\text{rév}}$ ) dont la valeur est de 0.2V pour un pH de 7 (thermodynamique), la surtension anodique ( $\eta_{\text{anod}}$ ) qui équivaut à 0.65V obtenue à partir de la cinétique de la bioanode (Figure 66), la surtension cathodique ( $\eta_{\text{cath}}$ ), à laquelle s'ajoute la chute ohmique ( $\sum Ri$ ). La somme de la surtension cathodique et de la chute ohmique équivaut à 0.95 V. Etant donné la valeur de la chute ohmique de 0.6 V ( $7.5 \cdot 0.08$ ), La surtension cathodique serait de 0.35 V.

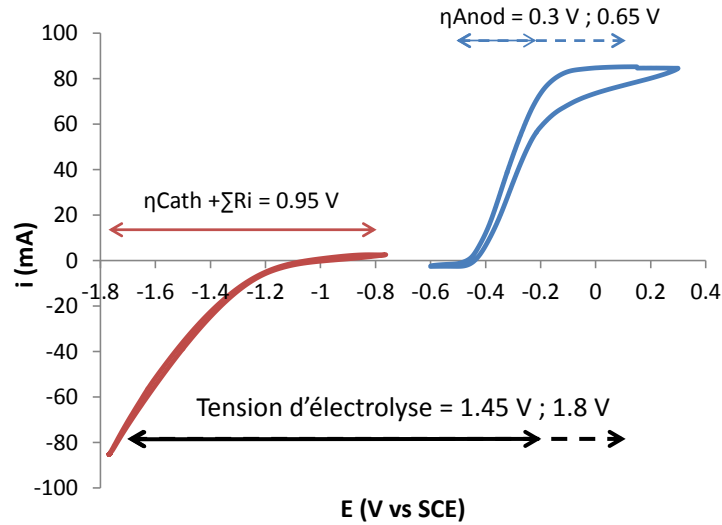


Figure 66 : Voltammétries cycliques (vitesse de balayage 1 mV/s) réalisées à l'anode (courbe bleue) pour le prototype d'électrolyseur microbien avec une membrane de microfiltration et de l'eau pour catholyte. La courbe rouge est tracée en utilisant le potentiel de la contre-électrode et correspond à la cinétique cathodique, à laquelle s'ajoute la chute ohmique.  $\eta_{\text{Anod}}$  = surtension anodique ;  $\eta_{\text{Cath}}$  = surtension cathodique ;  $\Sigma R_i$  = chute ohmique.

En faisant la somme des surtensions, de la chute ohmique et de la tension de réversibilité, on obtient bien la tension d'électrolyse de 1.8 V :

$$\eta_{\text{anod}} + \eta_{\text{cath}} + \Sigma R_i + U_{\text{rév}} = 0.65 + 0.35 + 0.6 + 0.2 = 1.8 \text{ V}$$

La Figure 67 représente la répartition des différents termes de la tension de cellule sous la forme d'un diagramme circulaire.

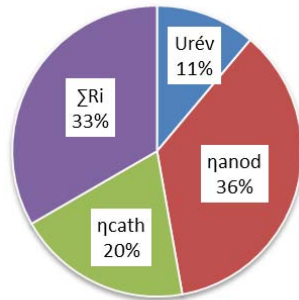


Figure 67 : Répartition des termes de la tension de cellule appliquée au procédé en fonctionnement avec un courant de 80 mA.  $U_{\text{rév}}$  est la tension de réversibilité,  $\eta_{\text{anod}}$  est la surtension anodique,  $\eta_{\text{cathod}}$  est la surtension cathodique et  $\Sigma R_i$  est la chute ohmique.

### 3.1.4 Conclusion et optimisations possibles pour la première configuration

La surtension anodique pourrait facilement être réduite de 0.65 V à 0.3 V. En effet, si l'on considère la cinétique anodique (Figure 66), on observe un plateau de courant à partir de -0.2 V/ECS. L'anode pourrait donc être polarisée à -0.2 V/ECS à la place de +0.15V/ECS, sans que cela ne change la densité de courant. La tension d'électrolyse serait donc facilement réduite à 1.45 V.

Pour diminuer la surtension cathodique, la surface de la cathode pourrait être augmentée. En effet, cela permettrait d'augmenter le courant à même potentiel ( $i = j \cdot S$  avec  $j$  la densité de courant qui reste équivalente et  $S$  la surface). Ainsi en doublant la surface de la cathode, la surtension cathodique pourrait être diminuée de 0.25 V. Une autre possibilité serait d'utiliser une cathode en platine, pour catalyser la réduction de l'eau en hydrogène, mais ce métal précieux est cher. Des chercheurs travaillent sur d'autres catalyseurs potentiels (W.-F. Chen et al., 2012; Jacques et al., 2009).

En modifiant le potentiel de l'anode à -0.2V/ECS et en multipliant par deux la surface de la cathode, la tension théorique d'électrolyse ne serait plus que de :

$$\eta_{\text{anod}} + \eta_{\text{cath}} + \sum R_i + U_{\text{rév}} = 0.3 + 0.1 + 0.6 + 0.2 = 1.2 \text{ V}$$

Cette valeur est plus raisonnable par rapport à la « fourchette » de 0.5 V à 1.4 V mentionnée précédemment. La chute ohmique deviendrait alors le terme majoritaire (50%).

Pour diminuer la chute ohmique de la cellule, il faut réduire la résistance qui dépend en partie de celle de l'électrolyte (page 174) selon :  $R = \rho L/S$  avec  $\rho$  la résistivité ;  $L$  la distance entre électrodes et  $S$  la surface des électrodes. Il faut donc minimiser la distance entre électrodes, ce qui a déjà été pris en compte lors du design du réacteur et a abouti à la configuration « filtre-presse ». L'autre possibilité consiste à augmenter la conductivité du catholyte et de l'anolyte si cela est possible.

La seconde configuration qui a été testée devait permettre de pallier le problème de faible conductivité du catholyte en mettant en œuvre un catholyte riche en ions (tampon phosphate 0.4 M) dont la conductivité ( $\sigma = 30\text{mS/cm}$ ) est trente fois plus élevée que celle de l'eau. Par contre, l'utilisation obligée d'une membrane échangeuse d'ions induit une plus grande résistance ( $R_{\text{membrane}}$ ).

## 3.2 Deuxième configuration (membrane cationique / solution phosphate 0.4M)

Pour travailler avec un catholyte conducteur et améliorer la cinétique cathodique, le prototype est mis en œuvre avec la deuxième configuration : une membrane cationique et un catholyte de type solution tampon phosphate 0.4 M. La membrane est une membrane échangeuse de cations « FumasepFKE » (Fumatech).

### 3.2.1 Corrosion au niveau du collecteur de courant de l'anode

Le catholyte est constitué de 2.2 L de solution tampon phosphate à une concentration de 0.4 M et un pH de 6.8. Comme pour l'essai précédent, l'anolyte est un volume de 1L d'eaux usées supplémentés en acétate et le compartiment anodique est inoculé avec une électrode préalablement colonisée.

L'essai a dû être rapidement stoppé car le courant a diminué en dessous de 10 mA après seulement trois jours et les tentatives pour remédier au problème dans le compartiment anodique sont restées sans succès (ajout d'acétate supplémentaire, ajout de boues activées pour enrichir en microorganismes, ajout de KCl, renouvellement des eaux usées). Au démontage du système, il a été observé de la corrosion au niveau des points de soudure entre la grille d'acier et une tige du même acier, qui assure la collecte du courant (Figure 68). Ce problème est certainement à l'origine du faible courant obtenu. La couche de produits de corrosion peu adhérents limite la conduction électronique entre la grille et la tige. Les soudures effectuées pour fixer la tige (collecteur de courant) à la grille sont certainement de moins bonne qualité que celles effectuées pour la première configuration.



Figure 68. Corrosion des points de soudure assurant la liaison électrique entre la grille d'acier utilisée comme cathode et la tige d'acier qui sert de collecteur de courant

Le collecteur en acier inoxydable a été remplacé par un fil de platine directement « tissé » dans la grille d'acier. Un nouveau test a été démarré en reprenant les conditions désirées après avoir changé la membrane.

### 3.2.2 Chronoampérométrie et acidification de l'anolyte

L'inoculation est réalisée avec une précédente électrode colonisée, qui a été conservée pendant 30 jours à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Il faut environ 3 jours avant que le courant commence à augmenter (Figure 69). Le temps de latence est donc plus long lorsque l'électrode a été congelée, mais il est très intéressant de constater que la congélation n'empêche pas l'utilisation de l'électrode en tant qu'inoculum. La méthode de formation d'anode développée au chapitre 3 est robuste et même possible à partir d'une électrode primaire congelée.

Au jour 6, le courant est faible alors qu'il reste de l'acétate dans le réacteur. Le pH de l'anolyte, initialement de 7 a diminué jusqu'à 6.3. L'ajout d'hydroxyde de potassium (KOH) pour remonter le pH jusqu'à 7 a permis d'améliorer la densité de courant jusqu'à  $3.6 \text{ A/m}^2$  au jour 7 puis jusqu'à  $9.2 \text{ A/m}^2$  au jour 8, alors que le pH avait de nouveau diminué à 6.15. L'acidification du compartiment anodique est importante puisque le milieu (eaux usées) n'est pas tamponné. Cette acidification est conforme aux prévisions théoriques (partie 2.4). Le système aurait certainement pu être amélioré en ajoutant une régulation automatique du pH de l'anolyte. C'est une perspective à explorer pour les futurs travaux en implantant un automatisme sur le réacteur déporté, équipé avec une sonde pH.

Finalement, en régulant manuellement le pH autour de 7 et en alimentant régulièrement le réacteur en acétate, des densités de courant entre 8 et  $11 \text{ A/m}^2$  sont maintenues (Figure 69).

Au cours de l'expérience, un phénomène d'osmose important (déplacement d'eau de l'anolyte vers le catholyte) a été observé. Pour compenser les changements de volumes, 100 à 200 mL de catholyte sont régulièrement prélevés et injectés dans le compartiment anodique (1 à 2 fois par semaine). Influencé par l'ajout de catholyte et l'ajout d'hydroxyde de potassium, la conductivité de l'anolyte, initialement faible (1.5 mS/cm), augmente peu à peu jusqu'à 15-20 mS/cm.

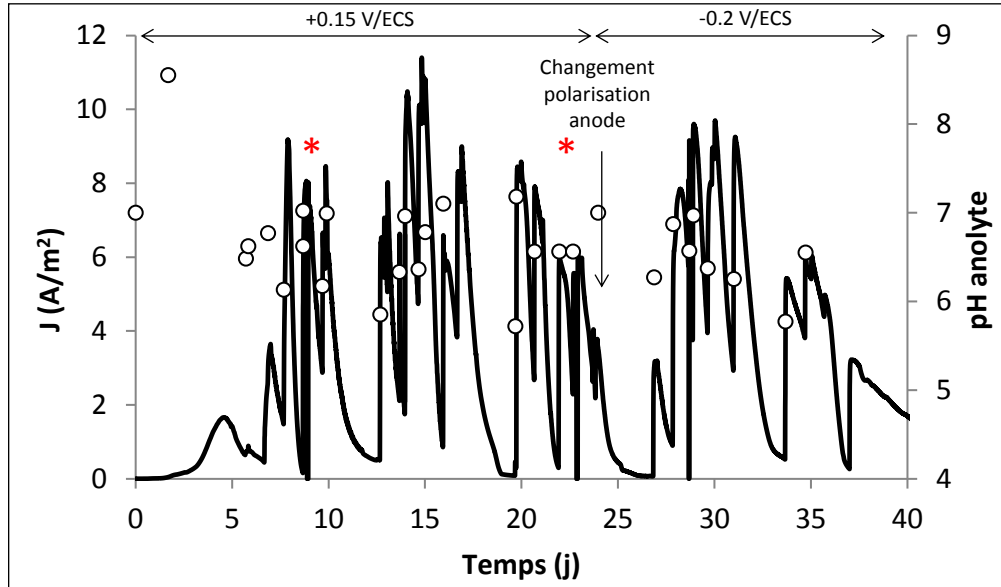


Figure 69 : Evolution de la densité de courant sur une anode polarisée à +0.15 V/ECS de  $t_0$  à  $t=24$  jours puis à -0.2 V/ECS de  $t=24$  jours à  $t=40$  jours pour le prototype d'électrolyseur microbien avec membrane échangeuse de cations. Le réacteur est alimenté avec de l'acétate (10 mM), l'anolyte est de l'eau usée et le catholyte est une solution tampon phosphate (0.4M). Chaque pic de courant correspond à l'ajout d'acétate.

\*Des mesures d'impédances entre l'anode et la cathode sont réalisées aux jours 9 et 23. Les valeurs de pH sont représentées par les cercles blancs.

### 3.2.3 Débit d'hydrogène, rendements faradiques

Comme pour la configuration précédente, le débit d'hydrogène produit dans le compartiment cathodique de l'électrolyseur microbien est mesuré grâce au compteur volumétrique de gaz et comparé au débit théorique calculé à partir du courant (Figure 70). Tout l'hydrogène produit semble bien être récupéré car la courbe expérimentale et la courbe théorique se superposent remarquablement bien. Le système d'électrolyse étudié permet d'atteindre un débit maximal d'hydrogène de 35 mL/h soit 840 mL/jour.

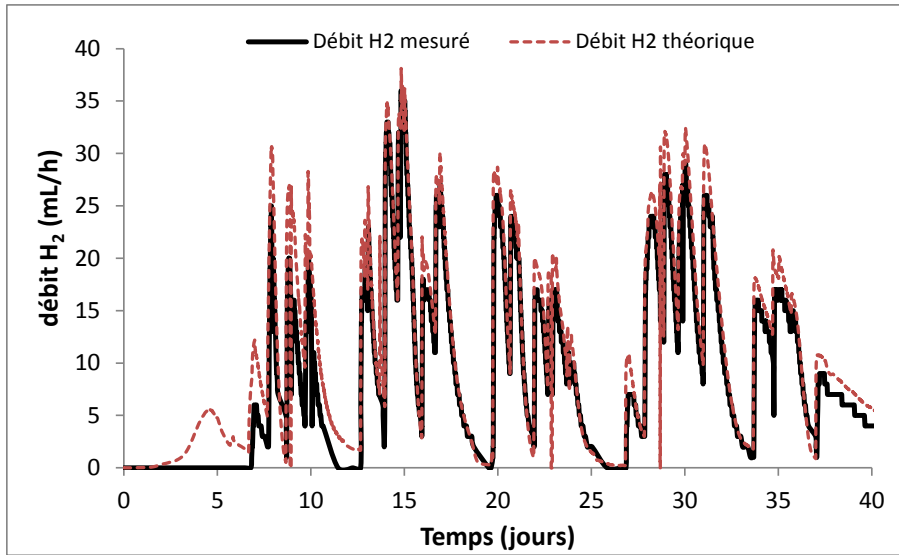


Figure 70 : Débit d'hydrogène expérimental mesuré en sortie du compartiment cathodique (trait plein) et débit théorique calculé d'après la charge traversant la cathode (trait pointillé) pour le prototype d'électrolyseur microbien avec membrane échangeuse de cations. Le compartiment anodique est alimenté avec de l'acétate (10 mM) et contient de l'eau usée comme anolyte. Le catholyte est une solution tampon phosphate 0.4M

Au cours de l'expérience, les performances de la cellule d'électrolyse commencent à baisser après une vingtaine de jours. La consommation en acétate, elle, reste cependant constante. Le rendement faradique s'en trouve donc impacté et diminue de 53% (jour 19) à 17% (jour 26) (Figure 71). On constate visuellement que le biofilm anodique est très épais et nous avons alors fait le choix d'appliquer une contrainte de cisaillement sur le biofilm en envoyant un fort flux de gaz inerte (azote) dans le compartiment anodique (à t= 28 jours). La part du biofilm faiblement attaché à l'anode est décrochée. Cette méthode s'est révélée efficace puisque la bioanode a retrouvé des performances de l'ordre de 8-9 A/m<sup>2</sup> après le jour 28. Le rendement faradique s'est rétabli autour de 50-55% à partir du jour 28 (Figure 71).

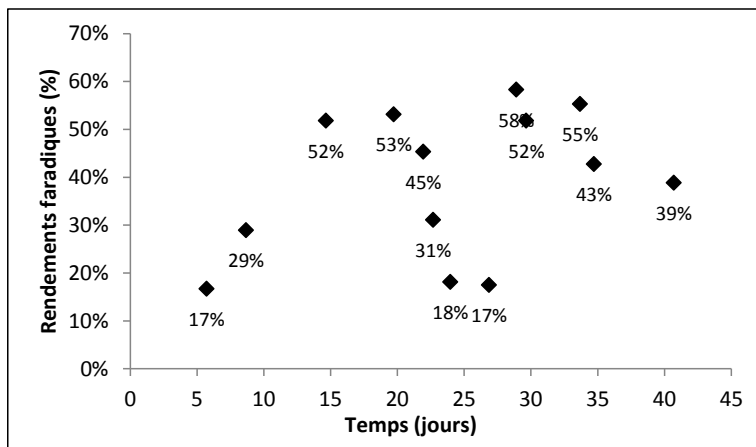


Figure 71 : Rendements faradiques calculés au cours de l'expérience.

Durant les 40 jours d'expérience, le catholyte n'a pas été remplacé. Le pH a seulement augmenté rapidement après 30 jours de fonctionnement (Figure 72).

Lors des calculs de dimensionnement de la cellule d'électrolyse à deux compartiments, nous avons envisagé un fonctionnement de 7 jours sous un courant de 90 mA avant que le pH du catholyte ne soit affecté et nécessite donc son remplacement. La charge électrique ( $Q=i*t$ ) correspondante est donc théoriquement de 54432 Cb. Dans notre essai, le pH est à peu près stable pendant 30 jours avant d'augmenter rapidement. L'intégration du courant d'électrolyse sur cette période de 30 jours donne une charge de 65400 Cb (soit une moyenne de 25.2 mA pendant 30 jours). Cette valeur est relativement proche de la valeur théorique de 54432 Cb au-delà de laquelle le catholyte doit s'alcaliniser. Cependant, dans notre essai, il faut près de 30 jours avant de constater une augmentation du pH (au lieu de 7 jours en théorie). La différence observée provient du fait que le courant d'électrolyse n'est pas stable pendant les 30 jours (Figure 69). Des pics de courant de 90 mA alternent avec des périodes « creuses » au cours desquelles la disponibilité en substrat (acétate) est limitante. Une alimentation automatique en substrat par une pompe de charge régulée par le courant d'électrolyse serait une bonne solution pour éviter les déplétions en substrats dans le compartiment anodique.

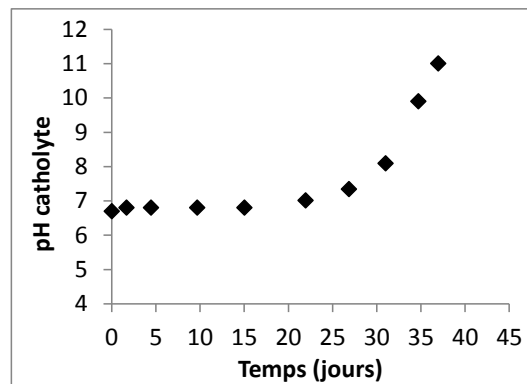


Figure 72 : Evolution du pH dans le compartiment cathodique de l'électrolyseur microbien.

### 3.2.4 Voltammétries cycliques et tension d'électrolyse

Des voltammétries cycliques effectuées au jour 8 (courant de 80 mA en chronoampérométrie) ont été réalisées pour évaluer les cinétiques anodiques et cathodiques (Figure 73). Les CV montrent que la bioanode catalyse l'oxydation de l'acétate dès -0,4V/ECS. Le plateau de courant (80 mA) est atteint dès le potentiel de -0.2 V/ECS, ce qui indique un transfert d'électrons rapide. La cinétique anodique obtenue est similaire à celle de la première configuration étudiée (Figure 62). Pour ce type de dispositif avec cette cinétique anodique, l'anode peut être polarisée en chronoampérométrie à un potentiel de -0.2 V/ECS au lieu de +0.15 V/ECS sans affecter le courant généré sur le biofilm électrocatalytique. Cette diminution du potentiel de polarisation de l'anode de 0.35 V devrait permettre de réduire sensiblement la surtension anodique. Elle doit en théorie passer de 0.65 V à 0.3 V. Cette solution a été testée et validée à partir du jour 24. Le potentiel de l'anode est changé de +0.15 V à -0.2 V/ECS, sans que cela ne modifie la densité de courant (Figure 69).



Les cinétiques anodiques sont relativement similaires dans les deux configurations d'électrolyseurs microbiens avec membrane. Par contre, la cinétique cathodique (impactée d'une partie de la chute ohmique en raison de l'éloignement de l'électrode de référence) est nettement améliorée dans cette deuxième configuration. Ainsi la surtension cathodique et la chute ohmique ne représentent plus que 0.45 V dans cette deuxième configuration (Figure 73) alors que cette valeur était de 0.95 V dans la version précédente.

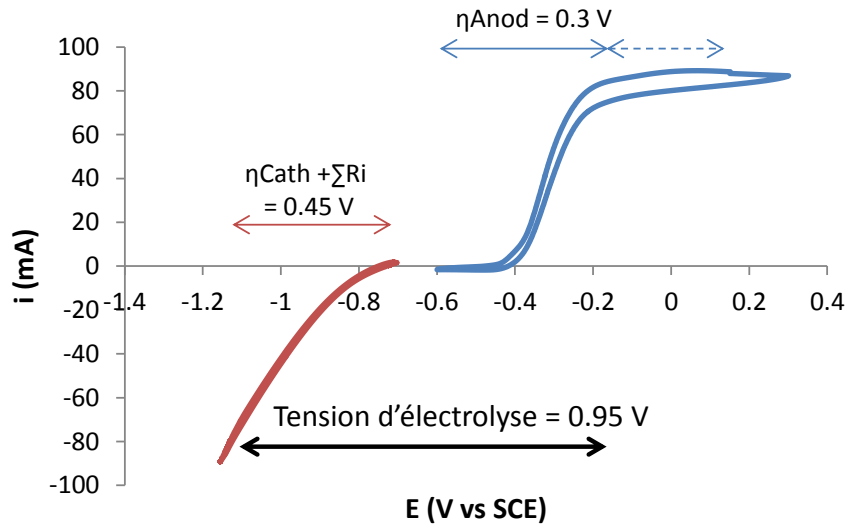


Figure 73 : Voltammétries cycliques (vitesse de balayage 1 mV/s) réalisées à l'anode (courbe bleue) pour l'électrolyseur microbien avec une membrane échangeuse de cations et une solution tampon phosphate 0.4M pH 6.8 pour le catholyte. La courbe rouge représente le potentiel de la contre-électrode et correspond à la cinétique cathodique, à laquelle s'ajoute une partie de la chute ohmique.  $\eta_{Anod}$  = surtension anodique ;  $\eta_{Cath}$  = surtension cathodique ;  $\sum R_i$  = chute ohmique.

La tension d'électrolyse à appliquer à cette configuration d'électrolyseur microbien est de 0.95 V pour générer un courant de 80 mA et donc un débit de  $H_2$  de 800 mL/jour. Cette tension est nettement inférieure à celle appliquée pour le même courant dans la première configuration d'électrolyseur. Elle était de 1.45V en considérant une polarisation de l'anode à -0.2V/ECS. Grâce à sa conductivité élevée, à ses propriétés de tampon du pH et à son activité catalytique sur la production électrochimique de l'hydrogène, la solution phosphatée utilisée comme catholyte a permis de minimiser la tension d'électrolyse de 0.5 V tout en maintenant la vitesse de production d'hydrogène souhaitée.

### 3.2.5 Mesures d'Impédance et chute ohmique

Des mesures d'impédance ont été réalisées aux jours 9 et 23, et sont présentées dans le plan complexe de Nyquist (Figure 74). La valeur de la partie réelle de l'impédance à haute fréquence correspond à une estimation de la résistance entre l'anode et la cathode du système. Elle est de 2.6 ohms pour notre prototype après 9 jours de fonctionnement, et elle est légèrement inférieure (2.3 ohms) après 20 jours de fonctionnement. Cette diminution de la résistance au cours de l'expérience peut s'expliquer par l'augmentation de la conductivité de l'anolyte liée à l'ajout de catholyte et d'hydroxyde de potassium pour la régulation du pH.

Comme expliqué dans la section 3.1.3 de ce chapitre, cette résistance est la somme des résistances aux déplacements de charges entre l'anode et la cathode dans le réacteur d'électrolyse microbienne, c'est-à-dire dans l'anolyte, au travers de la membrane, et dans le catholyte. Pour la configuration étudiée ici, la chute ohmique sur l'électrolyseur fonctionnant à une intensité de 80 mA est de 0.2 V ( $R \cdot i = 2.3 \cdot 0.08$ ). Cette chute ohmique est trois fois moins importante que celle déterminée dans la configuration précédente de l'électrolyseur avec la membrane de microfiltration et l'eau du réseau en tant que catholyte. La somme de la chute ohmique et du terme de surtension cathodique a été évaluée à 0.45 V sur la Figure 73. La chute ohmique étant de 0.2 V, on peut déduire que la surtension cathodique n'est en réalité que de 0.25 V.

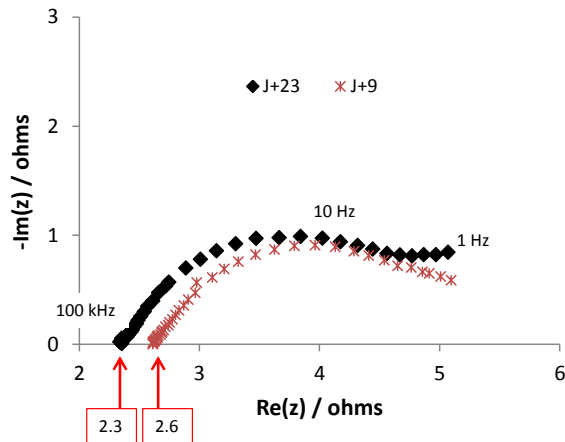


Figure 74 : Représentation dans le plan de Nyquist des mesures d'impédance enregistrées pour un montage à 2 électrodes. Le courant est fixé à 30 mA (montage galvanostatique). L'amplitude du signal a été fixée à 400  $\mu$ A et la gamme de fréquences de 100 kHz à 1 Hz avec un échantillonnage de 10 points par décade. La valeur de la partie réelle de l'impédance à haute fréquence correspond à une estimation de la résistance du système entre l'anode et la cathode. Les flèches correspondent à cette estimation : 2.6  $\Omega$  après 9 jours de fonctionnement et 2.3  $\Omega$  après 23 jours de fonctionnement.

Les valeurs des différents termes qui composent la tension globale d'électrolyse sont détaillées dans le Tableau 10 pour les deux configurations d'électrolyseurs testées. Dans la configuration 2, en raison d'une meilleure conductivité de la solution tampon phosphate par rapport à celle de l'eau du réseau, la chute ohmique de la cellule d'électrolyse est nettement plus faible que dans la configuration 1 (0.2 V à la place de 0.6 V). La surtension cathodique est également réduite dans la configuration 2, sans doute grâce à la catalyse de la production d'hydrogène via la déprotonation des phosphates. Un gain de 0.5 V est ainsi obtenu sur la tension d'électrolyse. En revanche, la configuration 2 nécessite l'utilisation de phosphates et l'ajout important d'hydroxyde de potassium pour réguler le pH de l'anolyte.

**Tableau 10 : Détail des différents termes de la tension d'électrolyse pour les deux configurations d'électrolyseurs testées : Urev = tension de réversibilité ; ηAnod = surtension anodique ; ηCath = surtension cathodique ; ΣRi = chute ohmique. Dans la configuration 1, l'électrolyseur est équipé d'une membrane de microfiltration et le catholyte est de l'eau. Dans la configuration 2, l'électrolyseur est équipé d'une membrane échangeuse de cations et le catholyte est une solution tampon phosphate (0.4M – pH 6.8).**

Configuration 1	0.2	0.3	0.35	7.5x0.08 = 0.6	1.45
Configuration 2	0.2	0.3	0.25	2.3x0.08 = 0.2	0.95

A partir des mesures d'impédance, il a été possible d'attribuer la part approximative de chaque élément résistif du système à la chute ohmique globale (ΣRi).

Grâce aux mesures effectuées avec un montage à deux électrodes, on a :

$$\Sigma R \text{ (configuration 1)} = R1_{\text{catholyte}} + R1_{\text{membrane}} + R1_{\text{anolyte}} = \underline{7.5 \text{ ohms}}$$

$$\Sigma R \text{ (configuration 2)} = R2_{\text{catholyte}} + R2_{\text{membrane}} + R2_{\text{anolyte}} = \underline{2.3 \text{ ohms}}$$

Des mesures effectuées avec le montage à 3 électrodes (mesure entre la référence et l'anode, cf Figure 65) nous donnent la résistance des anolytes pour les deux configurations :

$$R1_{\text{anolyte}} = 1.9 * 2 = \underline{3.8 \text{ ohms}}$$

$$R2_{\text{anolyte}} = 0.45 * 2 = \underline{0.9 \text{ ohms}}$$

La différence des résistances entre les deux configurations peut être attribuée à la différence de conductivité des anolytes au moment de l'analyse par spectrométrie d'impédance (t=19 jours pour la configuration 1 et t=23 jours pour la configuration 2). En effet, pour la configuration 1, la conductivité de l'anolyte est d'environ 7 mS/cm à t=19 jours (Figure 62) alors que la conductivité de l'anolyte de la configuration 2 est largement supérieure à t=23 jours à cause des ajouts répétés de catholyte et d'hydroxyde de potassium (σ = 15-20 mS/cm).

Dans la configuration 2, une estimation de la résistance du catholyte a été effectuée par une mesure d'impédance en montage à 3 électrodes avec une référence placée dans le catholyte à une distance de 3 cm de la cathode (mesure entre la cathode et cette référence). On trouve :

$$R2_{\text{catholyte}} = \underline{0.3 \text{ ohms}}$$

Cette résistance est très faible, ce qui est cohérent vis à vis du catholyte étudié (tampon phosphate avec une conductivité de 30 mS/cm).

On sait que :

$$R2_{\text{catholyte}} = \frac{1}{\sigma_2} * \frac{L_2}{S_2}$$

$$R1_{\text{catholyte}} = \frac{1}{\sigma_1} * \frac{L_1}{S_1}$$

Etant donné que les surfaces d'électrodes et les distances inter-électrodes sont les mêmes entre les deux configurations (L1=L2 et S1=S2), on peut déterminer la résistance du catholyte pour la configuration 1 en fonction de R2catholyte et des conductivités (Tableau 11) :

$$R_{1catholyte} = \frac{\sigma_2}{\sigma_1} * R_{2catholyte} = \frac{30}{7} * 0.3 = \underline{1.3 \text{ ohms}}$$

Par déduction sont calculées la résistance des membranes utilisées pour chaque configuration et dans les conditions de fonctionnement appliquées. Les calculs aboutissent aux valeurs données dans le Tableau 11. Insistons sur un point : la résistance calculée ici pour les deux membranes employées dans notre CEM n'est pas une caractéristique intrinsèque de ces membranes, mais des valeurs valables dans nos conditions de fonctionnement, sachant que les catholytes employés sont différents d'une expérience à l'autre.

**Tableau 11 : Résistances des différents éléments constituant la résistance globale au transport ionique en solution dans le système pour les 2 configurations d'électrolyseur microbien et conductivités des électrolytes au moment où sont réalisées les spectrométries d'impédance (t~20 jours). Dans la configuration 1, l'électrolyseur est équipé d'une membrane de microfiltration et le catholyte est de l'eau. Dans la configuration 2, l'électrolyseur est équipé d'une membrane échangeuse de cations et le catholyte est une solution tampon phosphate (0.4M – pH 6.8).**

t~20 jours	Ranolyte (Ω)	$\sigma(\text{anolyte})$ (mS/cm)	Rcatholyte (Ω)	$\sigma(\text{catholyte})$ (mS/cm)	Rmembrane (Ω)	Rsysteme (Ω)
Configuration 1	<b>3.8</b>	4-7	<b>1.3</b>	7	<b>2.4</b>	<b>7.5</b>
Configuration 2	<b>0.9</b>	15-20	<b>0.3</b>	30	<b>1.1</b>	<b>2.3</b>

Une grande part de la chute ohmique de la configuration 1 est étroitement liée à la faible conductivité des eaux usées utilisées comme anolyte. Dans la configuration 2, l'ajout ponctuel de phosphate et d'hydroxyde de potassium pour maintenir le pH des eaux usées à 7 a fait augmenter leurs conductivités jusqu'à 15-20 mS/cm et a permis de diminuer la résistance de l'anolyte d'un facteur supérieur à 4.

Contrairement au postulat initial (« une membrane de microfiltration est sans doute moins résistante qu'une membrane échangeuse d'ions»), la membrane échangeuse de cations (Fumasep FKE) est finalement moins résistante que la membrane de microfiltration (Pall, S80610). Ce résultat s'explique de différentes façons : l'épaisseur de la membrane échangeuse de cations (entre 50 et 70 μm) est inférieure à celle de la membrane de microfiltration (entre 101 et 157 μm). De plus, La membrane de microfiltration est faite pour un travail sous pression alors que la membrane échangeuse de cations est spécifiquement conçue pour réaliser des transferts ioniques. Notons finalement que ce n'est pas la membrane qui génère le plus de résistance au transfert, que ce soit pour l'une ou l'autre des configurations, mais plutôt les électrolytes.

## 4 Synthèse des résultats et bilan sur l'électrolyseur microbien

### 4.1 Design conventionnel : CEM sans membrane

Les premiers résultats obtenus avec la cellule d'électrolyse microbienne sans membrane sont résumés dans le Tableau 12.

Tableau 12 : Résumé des résultats obtenus avec la CEM sans membrane

<b>Surface volumique anode</b>	26 m <sup>2</sup> / m <sup>3</sup>	
<b>Performances</b>	1,5 < Jmax < 3 A/m <sup>2</sup>	σ = 1,4 mS/cm (eaux usées)
	Jmax > 4,5 A/m <sup>2</sup>	σ = 5,3 mS/cm (+ 60 mM KCl)
<b>Production</b>	théorique	100 mA → 1L H <sub>2</sub> / jour
	Récupération réelle Gaz	0,20 L / jour
	Composition biogaz	40% CO <sub>2</sub> ; 35% CH <sub>4</sub> ; 25% H <sub>2</sub> (J+15) puis <10% H <sub>2</sub> à J+20
<b>Tension d'électrolyse</b>	2.0 V	
<b>Coût production</b>	24 kW.h/ m <sup>3</sup> Gaz	
<b>limitations</b>	Conductivité des eaux usées Re-consommation de l'hydrogène (production CH <sub>4</sub> )	
<b>Optimisations possibles</b>	<u>Composition gaz</u> : Ajout BES pour inhiber l'activité des méthanogènes <u>Chute ohmique</u> : Rapprochement Anode et cathode	

### 4.2 Design optimisé : CEM avec membrane de microfiltration (catholyte : eau potable)

La CEM équipée d'une membrane de microfiltration et avec un catholyte constitué d'eau potable a permis d'obtenir les résultats présentés dans le Tableau 13.

Tableau 13 : Résumé des résultats obtenus avec la CEM équipée d'une membrane de microfiltration (catholyte : eau potable)

<b>Surface volumique anode</b>	16 m <sup>2</sup> /m <sup>3</sup>	
<b>Performances</b>	5 < Jmax < 7.5A/m <sup>2</sup>	σ <sub>cath</sub> = σ <sub>anod</sub> = 4 mS/cm (eau + acetate de sodium+ HCl)
	8 < Jmax < 10A/m <sup>2</sup>	σ <sub>cath</sub> = σ <sub>anod</sub> = 7 mS/cm (+KCl 30mM)
<b>Production</b>	théorique	80 mA → 0.8 L H <sub>2</sub> / jour
	Récupération réelle Gaz	0.8 L/ jour
	Composition biogaz	100% H <sub>2</sub>
<b>Tension d'électrolyse</b>	1.8 V (1.45 V si l'anode est polarisée à -0.2 V)	
<b>Coût production</b>	4.3 kW.h/ m <sup>3</sup> Gaz (3.5 kW.h/ m <sup>3</sup> Gaz si la tension = 1.45 V)	
<b>limitations</b>	Faible conductivité des electrolytes (Chute ohmique : 33 à 41% du coût) Température non régulée	
<b>Optimisations possibles</b>	<u>Température</u> : Performances améliorées en passant de 23°C à 30°C <u>Surtensions</u> : Polarisation anode -0.2V/ECS (au lieu de +0.15 V/ECS) → gain de 0.35 V (soit 19% du coût) <u>Chute ohmique</u> : Augmenter la conductivité du catholyte dans la limite de ce qui est acceptable pour les microorganismes. Au-delà, cela implique de changer la membrane	

### 4.3 Design optimisé : CEM avec membrane cationique (catholyte : solution phosphate 0.4M)

Finalement, la CEM équipée d'une membrane échangeuse de cations et avec un catholyte constitué d'une solution tampon phosphate 0.4 M a permis d'obtenir les résultats résumés dans le Tableau 14.

Tableau 14 : Résumé des résultats obtenus avec la CEM équipée d'une membrane cationique (catholyte : tampon phosphate)

<b>Surface volumique anode</b>	16 m <sup>2</sup> /m <sup>3</sup>	
<b>Performances</b>	8 < J <sub>max</sub> < 10A/m <sup>2</sup>	σ <sub>cath</sub> = 30 mS/cm (solution phosphate) σ <sub>anod</sub> = 15-20 mS/cm (eaux usées + KOH + catholyte)
<b>Production</b>	théorique	80 mA → 0.8 L H <sub>2</sub> / jour
	Récupération réelle Gaz	0.8 L/ jour
	Composition biogaz	100% H <sub>2</sub>
<b>Tension d'électrolyse</b>	0.95 V	
<b>Coût production</b>	2.28 kW.h/ m <sup>3</sup> Gaz	
<b>limitations</b>	Régulation du pH obligatoire à l'anode Phénomène d'osmose	
<b>Optimisations possibles</b>	<u>Température</u> : une augmentation de la température pourrait permettre une augmentation des performances <u>Vieillessement biofilm</u> : prévoir une option pour décrochage du biofilm en cas de colmatage du compartiment anodique et/ou de la membrane	

### 4.4 Bilan

Les tests réalisés sur les électrolyseurs microbiens sans membrane ont été riches d'enseignements. Ils ont permis d'identifier plusieurs points limitants qui ont conduit à abandonner ce design de CEM. D'abord, dans les cellules d'électrolyse sans membrane, l'anode et la cathode sont immergées dans le même électrolyte constitué d'eaux usées. Les eaux usées présentent une faible conductivité, donc une résistance importante au transfert ionique en solution. Ensuite, le design du réacteur impose une grande distance entre anode et cathode, ce qui induit une résistance importante. A cela s'ajoute le choix peu judicieux d'utiliser une cathode de petite surface, ce qui augmente la surtension cathodique. La cellule nécessite alors une tension d'électrolyse de 2V pour maintenir un courant d'électrolyse de 90 mA. Dans ces conditions permettant en principe la génération d'un débit de 0.9 L<sub>H<sub>2</sub></sub>/jour, le coût de production de l'hydrogène serait alors de 4.8 kW.h/m<sup>3</sup>. Mais l'hydrogène produit dans les électrolyseurs microbiens sans membrane est en partie oxydé à l'anode ou consommé par des méthanogènes et seul 20% du gaz produit est récupéré en sortie de l'électrolyseur. Le coût de production du gaz atteint alors 24 kW.h/m<sup>3</sup>Gaz. De plus, ce gaz est fortement pollué par du méthane, alors que l'objectif initial est de ne produire que de l'hydrogène.

Dans l'objectif de récupérer de l'hydrogène quasiment pur, il s'est avéré opportun de travailler avec un compartiment cathodique abiotique physiquement séparé du compartiment anodique par une membrane. Un prototype de laboratoire à deux compartiments a été dimensionné dans ce sens pour maintenir un courant d'électrolyse de 90 mA, autrement dit une production de 0.9 L<sub>H<sub>2</sub></sub>/jour. Les tests avec le prototype ont presque permis d'atteindre l'objectif initial de 90 mA (80 mA). L'utilisation d'un

design filtre-pressé pour l'électrolyseur a permis de diminuer la distance inter-électrode. Le passage d'un catholyte peu conducteur à un catholyte conducteur, puis le recyclage de ce catholyte dans le compartiment anodique pour augmenter la conductivité de l'anolyte (dans la limite de ce qui est acceptable pour le biofilm) ont largement contribué à l'amélioration des performances de l'électrolyseur et à la diminution de la tension d'électrolyse. Notons également qu'une température minimum de 27°C dans le compartiment anodique a été requise pour obtenir une anode microbienne capable de soutenir un courant de 90 mA. Finalement, les deux configurations de couple [membrane/catholyte] testées avec le prototype ont montré que la résistance liée à la présence de la membrane n'était pas la résistance majeure aux transferts de charges en solution. Plus particulièrement, l'impact de l'utilisation d'une membrane échangeuse d'ions sur les transferts ioniques est plutôt marginal puisque celle-ci n'induit qu'une résistance de 1.1 ohms dans nos conditions de fonctionnement.

L'ajout d'une solution phosphate 0.4M-pH 6.8 comme catholyte, grâce à sa conductivité élevée et à ses propriétés de tampon pH, permet de minimiser la tension d'électrolyse tout en maintenant la productivité de l'hydrogène. Le coût énergétique calculé pour la production d'un mètre cube d'hydrogène est de 2.28 kW.h/m<sup>3</sup> H<sub>2</sub>. Ce coût de production est inférieur au 3 kW.h /m<sup>3</sup>H<sub>2</sub>, qui est la valeur du pouvoir calorifique inférieur (PCI) pour un Nm<sup>3</sup> d'hydrogène (Alleau, 2005). Ainsi, l'énergie électrique nécessaire à la production d'hydrogène est inférieure à la quantité théorique d'énergie contenue dans ce combustible.

Pour aller plus loin dans un objectif d'industrialisation du procédé, plusieurs voies restent à poursuivre :

**Des tests sur plusieurs mois sont nécessaires pour évaluer la stabilité du procédé avec des biodéchets réels.** Dans le cadre du projet Biorare, des essais complémentaires vont être réalisés en remplaçant l'acétate par du biodéchet à l'anode de notre prototype. Puis, il conviendrait d'associer la CEM optimisée et alimentée en biodéchets avec un contacteur gaz-liquide en aval pour la production de molécules organiques d'intérêts.

**Réguler le pH et automatiser les apports en substrat pour optimiser la stabilité du courant d'électrolyse.** La régulation du pH dans le compartiment anodique aurait le mérite de maintenir et d'accélérer la cinétique anodique, mais également d'augmenter la conductivité de l'anolyte et de limiter le phénomène d'osmose. Pour maintenir des densités de courant stables, une modification déjà envisagée mais qui n'a pas encore été installée est d'automatiser l'apport du biodéchet dans le compartiment anodique en utilisant la diminution du courant d'électrolyse pour déclencher des ajouts automatisés de biodéchet à 0.7 gDCO/L.

**Remplacer les eaux usées par des effluents de sortie de digesteur anaérobie comme milieu de dilution des biodéchets.** Ce type d'effluent est naturellement plus conducteur (riche en ions ammonium par exemple) que les eaux usées utilisées dans notre étude. L'intégration du procédé d'électrolyse microbienne directement sur un site de digestion anaérobie permettrait aussi de bénéficier de la cogénération de chaleur pour maintenir la température de l'anolyte au-dessus de 27°C.







# Chapitre 7 : Synthèse de molécules organiques à partir de dioxyde de carbone et d'hydrogène



L'objectif est double : produire des molécules organiques à partir de CO<sub>2</sub> avec une vitesse et une concentration importante (>10 g/L), en utilisant de façon optimale l'hydrogène disponible, c'est-à-dire avec un rendement de conversion élevé. La stratégie envisagée consiste à mettre en œuvre des populations microbiennes autotrophes, capables de catalyser la réaction de réduction du CO<sub>2</sub>, en utilisant l'hydrogène comme donneur d'électrons, au sein de contacteurs gaz-liquide. L'hydrogène est facilement utilisé par de nombreux microorganismes pour leur propre métabolisme, comme les bactéries homoacétogènes, les Archaea méthanogènes hydrogénotrophes et les bactéries sulfato-réductrices. Parmi ces organismes, Les bactéries homoacétogènes anaérobies emploient la voie de Wood-Ljungdahl pour synthétiser l'acétyl-CoA à partir de CO<sub>2</sub>. Leur capacité de développement autotrophe permet donc de combiner l'utilisation d'hydrogène et de dioxyde de carbone pour la synthèse de molécules organiques à partir de l'acétyl-CoA.



Le produit principal formé par les bactéries homoacétogènes est l'acétate, mais d'autres peuvent aussi être synthétisés, comme le butyrate, l'éthanol, le 2,3 butanediol (Schiel-Bengelsdorf and Dürre, 2012; Younesi et al., 2005). Un inoculum riche en bactéries homoacétogènes est requis pour notre procédé. Pour une plus grande maîtrise des produits formés, le travail avec une souche pure peut être une alternative.

Ce chapitre est organisé en trois parties : La première partie présente les résultats obtenus dans différents designs de contacteurs gaz-liquide (CGL), avec le souci d'augmenter la productivité en molécules organiques tout en maximisant le rendement de conversion de l'hydrogène. L'optimisation des CGL a abouti à un nouveau concept de catalyse microbienne hétérogène, qui fait l'objet de la deuxième partie. Finalement, la troisième section propose des éléments de comparaison entre les systèmes d'électrosynthèse et les contacteurs gaz-liquide.

## **1 Optimisation des Contacteurs Gaz-Liquide (CGL)**

Il existe sur le marché industriel un grand nombre d'appareils de mise en contact d'un gaz et d'un liquide. L'ensemble de ces contacteurs peut être classé en deux grandes catégories, selon le mode de dispersion des phases et selon le type d'inclusions : Les contacteurs dans lesquels le gaz est dispersé sous forme de bulles et les contacteurs dans lesquels le liquide est dispersé sous forme de gouttes et de film.

Il convient ici de s'intéresser aux technologies permettant de mettre en contact les molécules substrat de la phase gazeuse (H<sub>2</sub> et CO<sub>2</sub>) avec les microorganismes de la phase aqueuse. Le choix s'est orienté vers les contacteurs dans lesquels le gaz est dispersé sous forme de bulles. Les différentes étapes du transfert seront : (1) la diffusion de la molécule jusqu'à l'interface gaz-liquide, (2) le transfert de la molécule dans le milieu par absorption (solubilisation) et diffusion jusqu'à la bactérie, (3) l'assimilation de la molécule par la bactérie qui produit des métabolites ou sous-produits de réaction, et (4) le transfert des métabolites et diffusion dans le milieu.

Les bioréacteurs gaz-liquide (milieu de culture / microorganismes / gaz) existent déjà pour différentes applications telles que les cultures d'organismes aérobies, le traitement de l'eau ou de l'air, la fermentation des gaz de synthèse  $\text{CO}$ ,  $\text{H}_2$  (Munasinghe and Khanal, 2010).

Les bioréacteurs gaz-liquide les plus courants sont des réacteurs à cuve agitée en continu (Younesi et al., 2008), les bioréacteurs à garnissage à lit fixe ou fluidisé (Bredwell et al., 1999; Lu et al., 2004) et les colonnes à bulles (Datar et al., 2004). C'est ce dernier type de réacteur qui a inspiré le design de nos premières versions de contacteurs.

La première version de nos CGL repose sur une simple utilisation de flacons laveurs dans lesquels le gaz est introduit par un tube en verre sans diffuseur. Les bulles se forment à l'extrémité du tube et remontent la colonne de liquide (120 mm) avant de sortir du CGL : c'est la version 1.0 (v 1.0). Dans la deuxième version (v 1.1), la sortie de la tige en verre est équipée d'un tuyau poreux qui se termine avec un diffuseur (type diffuseur d'aquarium). Pour la troisième version (v 1.2), de la laine d'acier servant de garnissage est ajoutée. Dans tous les cas, les CGL sont placés dans un bain-marie pour maintenir une température à  $30^\circ\text{C}$ .

Finalement, en s'inspirant de la technologie des contacteurs à membranes utilisés dans le domaine de l'environnement (Chabanon et al., 2011; Picard et al., 2012), un module membranaire a été conçu et constitue la version 2.0 (v 2.0). Ce module a été conçu et fabriqué par Jean-Christophe Rémy et Jean-Christophe Rouch du Laboratoire de Génie Chimique que nous tenons à remercier pour la rapidité et la très grande efficacité de leur aide.

Les différents contacteurs CGL utilisés sont schématisés dans la Figure 75.

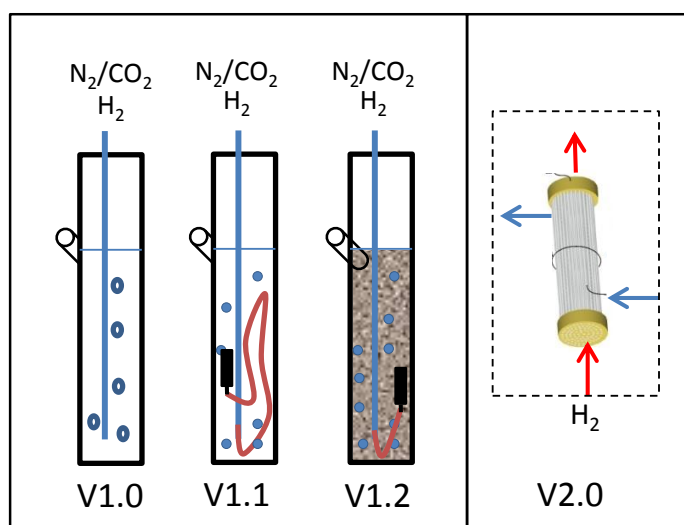


Figure 75 : Schéma des différentes versions des contacteurs gaz-liquide. Une version 1 en flacons laveurs avec deux améliorations et une version 2 mettant en œuvre un contacteur à membrane.

V 1.0	Flacon de diamètre 4.6 cm et hauteur de liquide 120 mm
V 1.1	Flacon avec tuyaux souple poreux 150 mm + diffuseur aquarium
V 1.2	V 1.1 avec l'ajout de garnissage de laine d'acier
V 2.0	Module de fibre creuse « Oxyplus »

Différentes expériences ont été menées en faisant varier le taux d'inoculum, le débit d'hydrogène, en ajoutant un inhibiteur des méthanogènes (BES), et en étudiant l'influence d'un catalyseur métallique sur la productivité. Les molécules organiques produites ont été identifiées et quantifiées par HPLC, les cinétiques de production ont été déterminées et le rendement d'utilisation de l'hydrogène a été calculé selon l'équation :

$$\frac{R_{\text{molécule}}}{Q_{H_2}} * n * V_m$$

avec  $R_{\text{molécule}}$  = vitesse de production de la molécule (formiate ou acétate) en moles/jours ;  $Q_{H_2}$  = débit d'hydrogène fourni en L/jours ;  $n$  = le nombre de moles d'hydrogène requises pour la production d'une mole d'acétate (4) ou formiate (1) ; et  $V_m$  = volume molaire des gaz parfaits (22.4 L/moles)

Le Tableau 15 regroupe les résultats obtenus pour chaque série d'expériences dans les différentes versions de CGL entre mars 2014 et septembre 2015. Certaines expériences (deux séries de quatre CGL indiquées par l'exposant (a) ont été réalisées par Yan Rafrafi, post-doctorant au LGC en 2013-2014.

Tableau 15 : Résultats obtenus pour toutes les séries d'expériences réalisées dans les différentes versions de contacteurs gaz-liquide. (a) Expériences réalisées par Yan Rafrafi. (b) Les résultats obtenus pour les deux CGL v1.2 ne sont pas reproductibles, c'est pourquoi les résultats sont donnés indépendamment sans faire la moyenne. (c) La concentration initiale en acétate est 2.2 g/L. (d) La concentration initiale en acétate est 1.3 g/L.

Design CGL	Inoculum	% d'inoc	Débit H2 mL/min	Ajout BES	Nbre de CGL	Catalyseur métallique	Produit majoritaire (autres)	Moyenne vitesse max (mg/L/j)	Moyenne [ ] max (mg/L)	Temps pr atteindre [ ] max (jours)	Moyenne Rdmt d'utilisation H2 (%)	
v 1.0 bulleur simple	<i>S. ovata</i>	10%	20	-	4	-	Acétate Ethanol	867 234	2904 1411	9 10	0.9% 0.5%	
	Boues	3%	NC	-	6	-	Acétate	301	1652	12	-	
	Boues	3%	6	-	2	-	Acétate	292	1828	14	1.1%	
			2		2			173	1631	14	1.9%	
			0-2		2			43	323	14	-	
	Marais salants <sup>(a)</sup>	10%	3	-	2	Grille Acier	Formiate (acétate)	190	417	8	0.5%	
					2	-		127	283	8	0.3%	
	Boues <sup>(a)</sup>	10%	6	-	0.5 mM	1	Grille Acier	Acétate	105	1436	12	0.4%
						1	-		59	1066	14	0.2%
						1	Grille Acier		289	2053	17	1.0%
1						-	180		1656	17	0.7%	
Boues	3%	0.5	-	2	-	Acétate	28	262	14	1.2%		
v 1.1 bulleur + diffuseur	Boues	3%	0.5	-	2	-	Acétate	235	1299	8	10.2%	
	Boues	3%	0.5	-	4	-	Acétate	225	1687	14	9.8%	
	Boues	10%	0.5	10 mM	2	-	Acétate (butyrate)	169	2927	27	7.4%	
v 1.2 bulleur + diffuseur + laine d'acier	Boues	10%	0.5	10 mM	2 <sup>(b)</sup>	Mousse Acier	Acétate (butyrate)	293 201	10671 5674	41	12.8% 8.8%	
	Biomasse fixée	-	0.5	10 mM	2 <sup>(b)</sup>	Mousse Acier	Acétate (butyrate)	376 238	7057 <sup>(c)</sup> 4658 <sup>(d)</sup>	15	16.4% 10.4%	
v 2.0 Module membrane	Boues	10%	0.8	10 mM	1	-	Acétate (éthanol)	372	5803	28	10.1%	

## 1.1 Version 1.0

Pour cette version initiale, des résultats intéressants ont été obtenus avec une culture pure de *Sporomusa ovata*. Puis, les travaux d'optimisation se sont ensuite focalisés sur la mise en œuvre de cultures mixtes.

### 1.1.1 Culture de *Sporomusa ovata*

Le microorganisme *S. ovata* est un microorganisme connu pour ses capacités d'électrosynthèse (Nevin et al., 2010). Une productivité maximale de 1.12 mM/j a été reportée par Nie et al. (2013) avec un rendement faradique de 84%. Les manipulations avec *S. ovata* ont été réalisées par François Duquenne lors de son stage de deuxième année d'ingénieur. Les cultures dans les CGL (v1.0) ont donné des

résultats décrits dans la communication publiée dans Energy & Environmental Science insérée dans le Chapitre 5.

Durant les précultures, il a été observé que les microorganismes n'étaient pas capables de croître sans extrait de levure. Celui-ci a donc été conservé dans le milieu et des expériences avec ou sans flux d'hydrogène ont été menées en parallèle pour étudier l'influence de ce donneur d'électrons sur les capacités de production de *S. ovata*. Le débit d'hydrogène a été volontairement fixé à 20 mL/min, pour assurer un apport non limitant.

Sans l'ajout d'hydrogène, jusqu'à  $1638 \pm 270$  mg/L d'acétate ont été produits en 14 jours. Avec l'ajout d'hydrogène, la production d'acétate a presque triplé avec une concentration maximale de  $4542 \pm 90$  mg/L en 9 jours. La vitesse de production d'acétate, initialement de 14.5 mM/j diminue après 4 jours et de l'éthanol commence alors à être produit jusqu'à  $1411 \pm 156$  mg/L après 10 jours de culture. Le ratio de production lié à l'utilisation de l'hydrogène en tant que donneur d'électrons est de 0.49 g d'éthanol par gramme d'acétate. Ces essais sont très intéressants car ils révèlent la possibilité de produire de l'éthanol à partir de CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub> chez le microorganisme *S. ovata* jusqu'à 35 mM ce qui, à notre connaissance, n'a jamais été montré auparavant. En effet, *S. ovata* est connue pour ses capacités de production d'acétate mais seule une très faible production d'éthanol (inférieure à 1 mM) a été décrite jusqu'à maintenant (Möller et al., 1984).

### 1.1.2 Cultures mixtes

Il a été choisi de reprendre les mêmes inocula qui ont été mis en œuvre auparavant dans les systèmes d'électrosynthèse microbienne (Chapitre 5). Deux sources d'inocula environnementaux ont donc été testées pour évaluer leur capacité à produire des molécules organiques à partir de CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub> dans ces contacteurs gaz-liquide :

- des boues biologiques hydrolysées et acclimatées
- des sédiments de marais salants de la côte méditerranéenne

Ces deux types d'inoculum sont intéressants car ils peuvent naturellement être riches en bactéries autotrophes capables d'utiliser l'hydrogène comme donneur d'électrons (chimolithoautotrophes). De plus, un inoculum provenant de marais salants peut être mis en œuvre dans un milieu très salin, ce qui augmente la robustesse du procédé en limitant les risques de contamination par des organismes non halotolérant. Pour acclimater les boues biologiques, elles sont placées 5 jours à 30°C dans un réacteur alimenté en continu par deux flux gazeux composé d'hydrogène et de N<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> (80-20%), avec l'objectif d'enrichir cet inoculum en bactéries acétogènes.

Avec la version 1.0 des CGL inoculés avec les boues biologiques acclimatées, les meilleures performances sont obtenues lorsque le débit d'hydrogène est maximal. Ainsi, une concentration d'acétate de plus de 1900 mg/L a été obtenue après 14 jours en injectant 6 mL H<sub>2</sub>/min, alors que la production d'acétate n'a pas dépassé 500 mg/L lorsque l'alimentation en H<sub>2</sub> est alternée respectivement entre 0 mL/min la nuit et 2 mL/min le jour (Figure 76).



Après 14 jours avec une alimentation continue d'hydrogène, les concentrations d'acétate n'augmentent plus : la vitesse de consommation de l'acétate devient équivalente à la vitesse de production de l'acétate ou bien sa production est inhibée par excès de produit. Les CGL qui étaient soumis à une alimentation discontinue d'hydrogène, sont alimentés en continu (2mL/min) à partir du jour 15. Les concentrations en acétate augmentent alors immédiatement, ce qui confirme que la production était bien limitée par l'apport d'hydrogène.

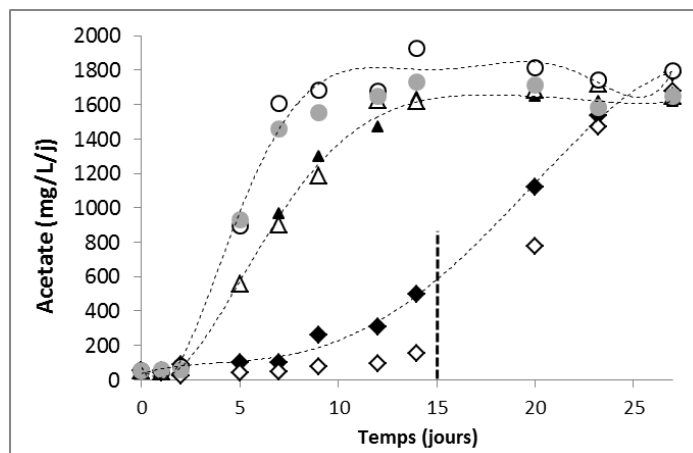


Figure 76. Evolution de la concentration en acétate pour six CGL inoculés avec de la boue biologique acclimatée. Les CGL sont alimentés avec un flux de  $N_2$ - $CO_2$  constant (10 mL/min) et différents débits d'hydrogène : 6 mL/min pour les résultats représentés par des cercles, 2 mL/min pour les résultats représentés par des triangles et une alimentation discontinue alternant 2mL/min le jour et 0 mL/min la nuit pour les résultats représentés par des losanges. Au jour 15, la ligne en pointillés représente le moment où l'alimentation discontinue est remplacée par une alimentation continue à 2 mL/min pour les résultats présentés par les losanges.

La mise en œuvre de l'inoculum constitué de sédiments de marais salants a conduit dans un premier temps à la production de formiate avec un maximum de 417 mg/L suivi de la production d'acétate à de faibles concentrations ( $254 \pm 22$  mg/L). Compte tenu de ces résultats très inférieurs à ceux obtenus avec les boues, les sédiments de marais salants ont été éliminés du champ de l'étude.

Dans les CGL 1.0, l'utilisation de l'hydrogène n'est pas du tout optimisée et la plus grande partie du gaz passe dans la colonne de liquide avec un temps de rétention très court sans être consommé par les microorganismes. Le taux de transformation de l'hydrogène en acétate ou formiate dans les CGL v1.0 ne dépasse pas 2%.

Ce système n'est pas convenable pour le concept BIORARE, pour lequel il est important de valoriser un maximum l'hydrogène produit dans l'électrolyseur microbien. De plus, le débit d'hydrogène fourni et disponible en entrée du CGL sera limité par les performances du MEC situé en amont. Par exemple, avec l'électrolyseur de laboratoire proposé au chapitre 6, le débit d'hydrogène est au maximum de 0.5 mL/min. Il faut donc être capable de travailler avec de faibles débits d'hydrogène de cet ordre-là, tout en maximisant son utilisation.

## 1.2 Version 1.1

Pour augmenter le temps de séjour du gaz dans les CGL, la version 1.1 a été imaginée. Un tuyau poreux connecté à un diffuseur de fines bulles de gaz a été connecté en sortie du tube en verre d'alimentation en gaz.

Les expériences ont été menées avec un débit plus faible d'hydrogène limité à 0.5 mL/min pour être en adéquation avec les données expérimentales obtenues avec l'électrolyseur du Chapitre 6. Grâce à l'augmentation du temps de séjour du gaz et l'augmentation de la surface d'échange des bulles (bulles plus fines), les vitesses de production et les concentrations maximales d'acétate obtenues restent les mêmes alors que le débit est divisé par 8. Le taux d'utilisation de l'hydrogène est passé de 1% à 10%. L'amélioration entre les versions 1.0 et 1.1 de CGL est illustrée par la Figure 77, qui présente les résultats (en duplicat) d'un CGL v1.0 et d'un CGL v1.1 avec un débit d'hydrogène de 0.5 mL/min.

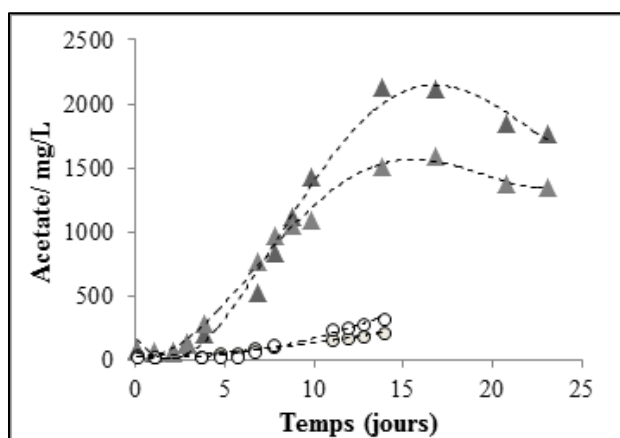


Figure 77 : Production d'acétate dans deux CGL optimisés (v1.1) (triangles), comparés à la production d'acétate dans deux CGL de base (v1.0) (cercles). Chaque CGL est inoculé avec de la boue biologique acclimatée (3% v/v) et est alimenté par de l'hydrogène à un débit de 0.5 mL/min et par un flux de N<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> à 10 mL/min.

Après 14 jours, les concentrations en acétate n'augmentent plus. Pour la suite des expériences, un inhibiteur de méthanogènes (Bromoethanesulfonate - BES) a été ajouté dans les milieux de culture pour éviter la re-consommation de l'acétate produit. Grâce à la présence de BES, les expériences en batch ont pu être conduites sur des temps plus longs. En conséquence, des concentrations en acétate plus importantes ont été atteintes. Par exemple, une concentration de 2927 mg/L a été obtenue après 27 jours en ajoutant 10 mM de BES dans un CGL v1.1.

## 1.3 Version 1.2

L'ajout de garnissage (laine d'acier) dans le CGL permet d'augmenter significativement les concentrations maximales en acétate produit, en conservant pendant 40 jours une vitesse de production de l'ordre de 200 à 300 mg/L/j selon les essais (Figure 78). Les résultats obtenus avec les CGL v1.2 ne sont pas reproductibles et cela est probablement lié à la quantité et la disposition de la mousse d'acier insérée dans les CGL. Après 40 jours, la concentration maximale obtenue est de 5674 mg/L pour l'un des CGL et de 10671 mg/L pour le répliquat, avec un taux d'utilisation de l'hydrogène jusqu'à 12.8%.

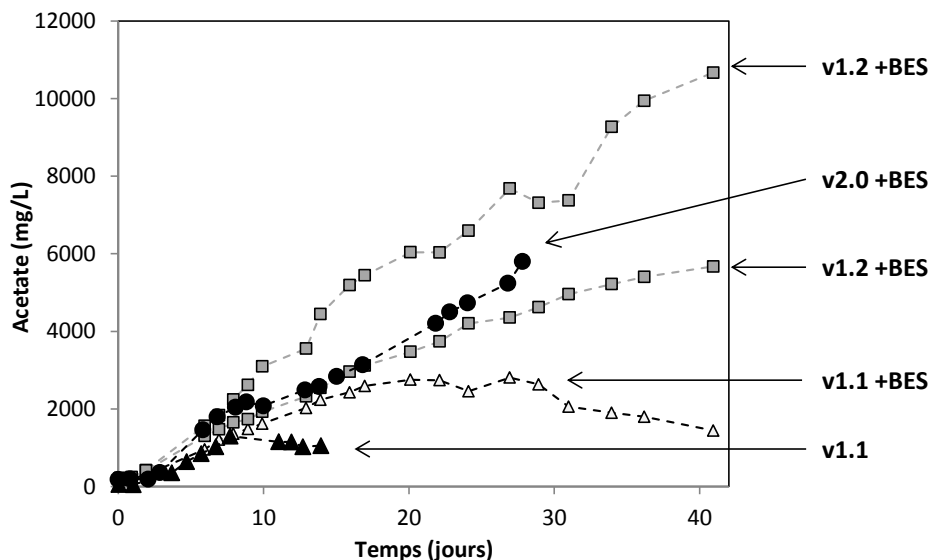


Figure 78 : Production d'acétate (mg/L) en fonction du temps (jours). Comparaison des concentrations obtenues avec les différentes améliorations apportées aux contacteurs gaz-liquide. Chacun des essais est réalisé dans des CGL inoculés avec de la boue biologique acclimatée (3% v/v) et alimenté par de l'hydrogène à un débit de 0.5 mL/min (sauf v2.0 avec un débit de 0.8 mL/min) et par un flux de N<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> à 10 mL/min. Les triangles pleins : v1.1 sans ajout de BES ; les triangles vides : v1.1 avec ajout de 10 mM BES ; carré pleins : v1.2 avec 10 mM BES ; ronds pleins : v2.0 avec 10 mM BES.

Dans les versions 1.2 des CGL, un autre point marquant est la production de butyrate, qui commence après 13 jours ou 24 jours selon les essais et atteint 950 mg/L en moyenne au jour 40. Dans la version 1.1, la concentration en butyrate obtenue est deux fois inférieure (Figure 79). Dans tous les cas, le butyrate commence à être produit lorsque la concentration en acétate atteint environ 3000 mg/L.

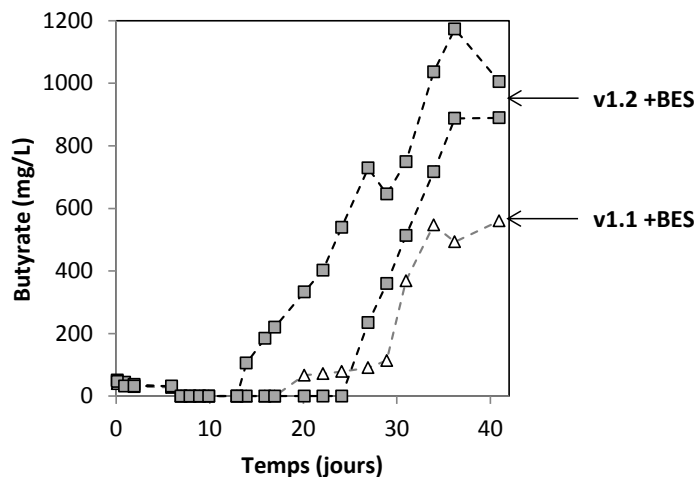


Figure 79 : Production de butyrate en fonction du temps dans les versions de CGL 1.1 et 1.2 avec 10 mM de BES dans les milieux de culture. Chacun des essais est réalisé dans des CGL inoculés avec de la boue biologique acclimatée (3% v/v) et alimenté par de l'hydrogène à un débit de 0.5 mL/min et par un flux de N<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> à 10 mL/min

Dans la version 1.2, les laines d'acier sont colonisées par la biomasse. Un nouveau batch a été relancé en remplaçant simplement le milieu par du milieu propre. De meilleures performances ont ainsi été obtenues grâce à cette méthode réutilisant la biomasse fixée sur la laine d'acier (Figure 80). La cinétique

maximale de production d'acétate obtenue sur les premiers jours a été améliorée de 18% et de 28% par rapport à l'utilisation du même CGL v1.2 inoculé à partir de boues (la vitesse de production est passée de 293 à 376 mg/L/j et de 201 à 238 mg/L/j suivant les essais). Cette amélioration peut être expliquée par au moins deux facteurs :

- En retirant les acides organiques produits, le renouvellement du milieu lève les potentielles inhibitions de la croissance et de la production
- La biomasse fixée sur la laine d'acier est déjà acclimatée à son environnement et spécialisée pour la croissance et la production autotrophe à partir de l'hydrogène comme donneur d'électrons. De plus, la laine d'acier pourrait jouer un rôle en accélérant la catalyse microbienne grâce à l'adsorption d'hydrogène à sa surface. Ce dernier point est développé dans la deuxième partie de ce chapitre

Dans les essais avec biomasse fixée, les concentrations en acétate atteignent 7057 mg/L et 4656 mg/L en 15 jours, selon les CGL alors qu'il fallait un minimum de 25 jours avec les mêmes CGL inoculés avec des boues. Cependant, notons que la concentration en acétate n'est pas nulle au début des essais avec la biomasse fixée car une partie de l'acétate produit lors de la première phase de l'expérience reste dans les CGL. La production réelle est donc de 4888 mg/L et 3334 mg/L en 15 jours après le renouvellement du milieu. Cela correspond donc à une amélioration plus modeste mais significative de 10% et 16%.

En ce qui concerne le butyrate, il est produit dès le début du nouveau batch et atteint 500 mg/L en 15 jours (Figure 80). Si sa vitesse de production reste constante, la concentration en butyrate atteindrait 1440 mg/L en 36 jours, ce qui représente une amélioration de 40% par rapport à l'expérience précédente (Figure 79).

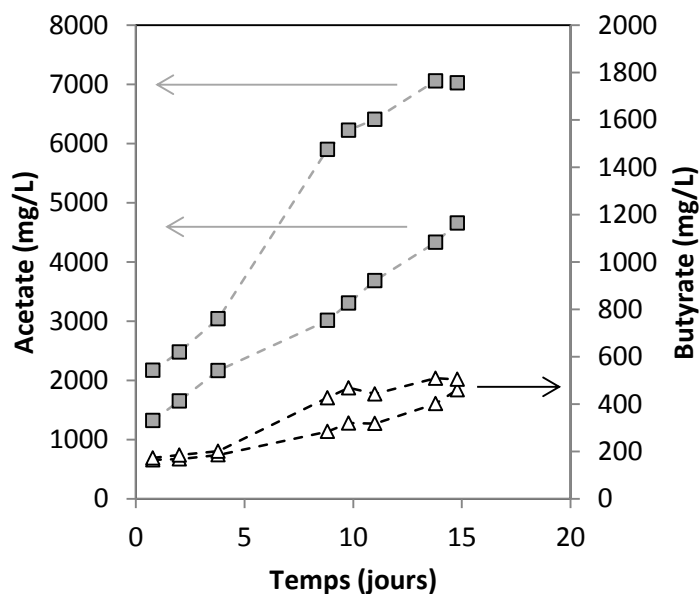


Figure 80 : Evolution de la concentration en acétate et butyrate dans le CGL v1.2, dont le milieu vient d'être remplacé par un milieu propre après un premier batch de 40 jours. La laine d'acier, qui a été colonisée lors de la première phase de l'expérience, sert d'inoculum. Les CGL sont alimentés par de l'hydrogène à un débit de 0.5 mL/min et par un flux de  $N_2$ - $CO_2$  à 10 mL/min.

## 1.4 Version 2.0

Pour continuer d'améliorer les performances des contacteurs, leur conception a été complètement revue avec l'aide de M. Rémy et de M. Rouch (équipe GIMD au LGC), en s'inspirant des contacteurs à membranes utilisés dans le traitement de l'eau. En effet, les bioréacteurs à fibres creuses, notamment utilisés pour le traitement des effluents urbains (Picard et al., 2012) commencent à susciter de l'intérêt pour la fermentation des gaz de synthèse (F. Zhang et al., 2013) et semblent donc convenir pour notre application.

Il s'agit de la version v 2.0 des CGL. Un seul test a pu être effectué avant que les travaux de thèse n'arrivent à leur terme. Ce premier test a montré que les performances obtenues avec ce nouveau design sont équivalentes aux performances obtenues avec la version 1.2 (Figure 78), ce qui est très encourageant. En effet, avec le module membranaire, la marge de progression est importante, car le premier test a été réalisé avec des paramètres imposés arbitrairement. Le système peut donc être optimisé pour améliorer encore le taux d'utilisation de l'hydrogène et augmenter ainsi le rendement de production des molécules d'intérêts.

Les paramètres pouvant faire l'objet d'amélioration sont :

- le débit de la pompe de recirculation qui permet d'ajuster le temps de séjour de la biomasse ;
- le volume de milieu ;
- le taux d'inoculation dans le réacteur déporté ;
- l'alimentation en CO<sub>2</sub>.

Ce dernier paramètre est particulièrement important : en effet, dans la configuration utilisée (Figure 81), un mélange N<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> (80-20%) est utilisé pour des raisons de convenance. Ce mélange a été choisi au tout début des manipulations parce qu'il correspond aux conditions standard de culture de *G. sulfurreducens*. Il ne se justifie plus d'utiliser ici le CO<sub>2</sub> à seulement 20% et l'alimentation du CGL en CO<sub>2</sub> pur devrait améliorer les performances. D'autre part le mélange N<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> est injecté dans le réacteur déporté pour l'alimentation en carbone inorganique. L'hydrogène, lui, circule dans les fibres du module membranaire et, lorsqu'il n'est pas consommé en surface de la fibre (seulement 10% de l'hydrogène injecté est converti en acétate d'après nos calculs), il est alors dirigé avec le liquide dans le réacteur déporté où il est perdu par la sortie des gaz N<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>.

Il pourrait donc être judicieux d'étanchéifier le réacteur déporté et d'injecter le CO<sub>2</sub> directement dans les fibres creuses avec l'hydrogène.

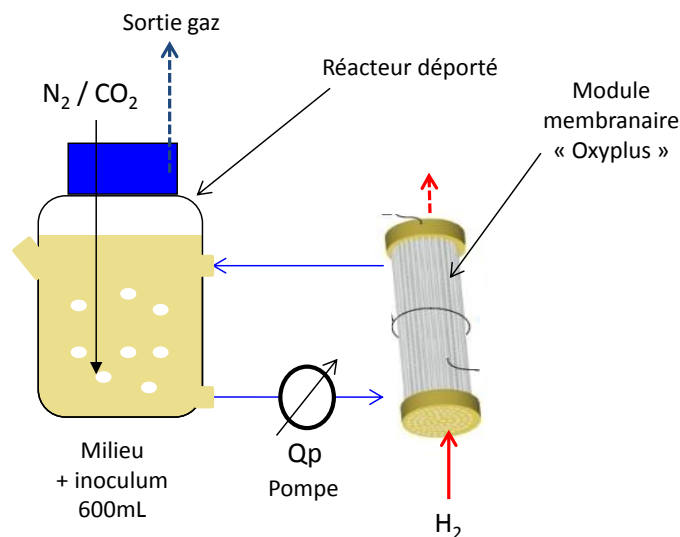


Figure 81 : Schéma de la version 2.0 des contacteurs gaz-liquide. Il s'agit d'un module membranaire « Oxyplus » connecté à un réacteur déporté. Une pompe avec un débit  $Q_p$  permet la circulation du milieu dans le module.

En utilisant le module membranaire v2.0 inoculé avec les boues biologiques acclimatées, une concentration de 5,8 g/L d'acétate est obtenue après 28 jours et de l'éthanol est détecté au jour 15, 17 et 21 dans une gamme de concentrations de 56 à 60 mg/L.

### 1.5 Bilan :

L'amélioration des CGL a permis d'augmenter les vitesses de production d'acétate ainsi que les concentrations maximales obtenues à partir de  $\text{CO}_2$  et d'hydrogène. En considérant un faible débit d'hydrogène de 0.5 mL/min, représentatif des débits obtenus avec l'électrolyseur microbien de laboratoire (Chapitre 6), les vitesses maximales de production d'acétate ont augmentées de  $28 \pm 17$  mg/L/j dans la version 1.0, à  $213 \pm 28$  mg/L/j dans la version 1.1, jusqu'à  $277 \pm 76$  mg/L/j dans la version 1.2 pour atteindre 372 mg/L/j dans la version 2.0. Les concentrations maximales obtenues dépendent non seulement du type de CGL employé mais également de l'utilisation de BES, inhibiteur des méthanogènes. Sans l'emploi de BES et avec un débit d'hydrogène de 0.5 mL/min, la concentration maximale atteinte dans la v1.1 est de 1687 mg/L, soit six fois plus importante que la concentration maximale obtenue avec la version 1.0 dans le même temps de 14 jours (262 mg/L). Avec l'ajout de BES dans les milieux de culture, la durée des expériences peut être allongée car la concentration en acétate continue d'augmenter pendant de longues périodes. La concentration en acétate augmente ainsi pendant 27 jours jusqu'à 3492 mg/L avant de commencer à stagner puis à diminuer dans la version 1.1. Dans la version 1.2, la concentration en acétate atteint un maximum de 7300 mg/L en 27 jours et continue d'augmenter jusqu'à 10.7 g/L en 41 jours, avec seulement une légère diminution de la vitesse de production. Au vu de l'évolution des concentrations (Figure 78), il semble que le titre maximal en acétate aurait pu être supérieur à 10 g/L dans les CGL v1.2 si les expériences avaient été poursuivies au-delà de 41 jours. Pour les essais effectués avec le nouveau module membranaire (v2.0), une concentration de 5803 mg/L est atteinte en 28 jours. Comme pour la v1.2, la concentration en acétate était toujours en augmentation lorsque l'expérience a été stoppée.

Les essais effectués en flacons laveur ainsi que les résultats obtenus avec le nouveau module membranaire ouvrent la voie à une multitude de possibilités pour répondre aux objectifs de productivités et de taux de conversion de l'hydrogène. On peut imaginer combiner l'utilisation du module membranaire avec une biomasse fixée et un fonctionnement en continu pour extraire les molécules synthétisées et maintenir le système à des concentrations en produits non inhibitrices.

## **2 Catalyse microbienne hétérogène**

Pour certains essais, l'ajout d'un catalyseur métallique sous la forme d'une grille en acier ou d'une laine d'acier s'est révélé avoir un impact positif sur les productions de métabolites (Tableau 15). L'hypothèse formulée est que la surface conductrice introduite joue le rôle d'un catalyseur sur lequel l'hydrogène peut s'adsorber, ce qui faciliterait son utilisation par les microorganismes.

Ce nouveau concept a été protégé par un brevet déposé en collaboration avec les partenaires IRSTEA et Suez-Environnement du projet Biorare et une communication a été soumise au journal « Angewandte Chemie ».

### **2.1 Principe général de l'invention**

Un grand nombre de microorganismes autotrophes sont capables d'utiliser l'hydrogène comme source d'énergie pour réaliser des synthèses de composés d'intérêt. Il est ainsi possible de transformer du dioxyde de carbone ( $\text{CO}_2$ ) en molécules d'intérêt par l'action de microorganismes appropriés alimentés en hydrogène. L'invention proposée établit que la présence d'un catalyseur solide conducteur métallique accroît significativement les vitesses de réaction. A notre connaissance, un tel processus catalytique qui associe catalyse microbienne et catalyse hétérogène sur un catalyseur solide n'a jamais encore été envisagé.

### **2.2 Publication 5 : Catalyse microbienne hétérogène pour l'hydrogénation du $\text{CO}_2$**

## Heterogeneous Microbial Catalysis for CO<sub>2</sub> Hydrogenation

Elise Blanchet, Yan Rafrafi, Luc Etcheverry, Benjamin Erable and Alain Bergel

*Submitted to Angewandte Chemie in January 2016*

### Abstract

H<sub>2</sub> + CO<sub>2</sub> conversions offer a large range of possibilities for converting hydrogen to chemical compounds that can be easily stored, transported and used as fuels or exploited as platform molecules for chemical syntheses. The present study shows that multispecies microbial communities coming from environmental inocula can catalyse the conversion of H<sub>2</sub> + CO<sub>2</sub> to formate or acetate. The maximum productions (0.4 and 10.6 g/L for formate and acetate, respectively) and reaction rates were of the same order of magnitude as those reported in the literature with pure cultures, provided that a conductive material was present in the reactor. This is the first demonstration of the catalytic effect of conductive material on microbial hydrogenation. The concept of heterogeneous microbial catalysis should now be investigated for possibly numerous applications in gas/microbial reactions and may offer a new pathway for understanding electron transfer in multispecies microbial communities.

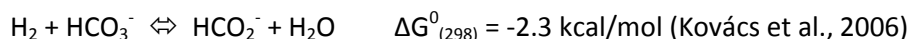
**Keywords:** heterogeneous microbial catalysis; CO<sub>2</sub> hydrogenation; hydrogen; microbial electrosynthesis

Electrical energy is a very attractive energy vector, which can be produced from fully renewable sources such as wind, sunlight, marine streams, tides, etc. Unfortunately, these sources are intermittent and show great geographic variability. A strategy to store electrical energy is to capture it in the covalent bonds of chemical compounds that can be stored, transported and consumed on demand. Hydrogen, produced from electricity by water electrolysis, holds great promise of being the first step in the transformation of electrical energy to chemical energy. Nevertheless, hydrogen is not easy to store on a large scale because it is explosive and highly diffusive. An additional process step is required to produce easier-to-handle chemical compounds.

For this second step, the combination of hydrogen with carbon dioxide (H<sub>2</sub> + CO<sub>2</sub>) offers an extraordinarily large variety of possible reactions (Kondratenko et al., 2013; Wang et al., 2011; Yang and Wang, 2015), sometimes considered as an alternative to the Fischer-Tropsch process (CO + H<sub>2</sub>) (Klibanov et al., 1982). A huge number of studies have been devoted to the design of selective homogeneous (Jessop et al., 2004) and heterogeneous catalysts to drive CO<sub>2</sub> hydrogenation into added-value molecules. Methane can be produced in this way (Martin et al., 2013; Pearson et al., 2012). Methanol is another targeted molecule because of its possible uses either as a liquid fuel or as feedstock for the production of other chemicals (Jadhav et al., 2014; Yan et al., 2014; Rice et al., 2002). Formate can also be synthesized from CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>, to be used either directly as a liquid energy carrier (Rice et al., 2002) or in the chemical industry (Federsel et al., 2010; Himeda, 2007; Huff and Sanford, 2011; Kang et al., 2014; Kovács et al., 2006; Leitner, 1995; Li et al., 2012; Noyori and Hashiguchi, 1997). A great advantage of the production of formate by CO<sub>2</sub>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> hydrogenation is that it occurs close to equilibrium. The reaction



can consequently be reversed easily by changing the operating conditions in order to recover hydrogen from formate:



This equilibrium has long been envisioned as a reversible hydrogen storage system (Williams et al., 1978) and still remains the subject of promising studies in this direction (Bi et al., 2014; Boddien et al., 2011; Himeda et al., 2011; Reda et al., 2008)

Microorganisms offer very interesting catalytic possibilities for  $\text{H}_2 + \text{CO}_2$  conversions. The capacity of *E. coli* to produce formate from  $\text{CO}_2$  and  $\text{H}_2$  (Woods, 1936) and, reversely,  $\text{H}_2$  from formic acid (Stephenson and Stickland, 1932) was identified in the 1930's. Catalysis of this reversible reaction by *Alcaligenes eutrophus* (renamed *Cupriavidus necator*) was proposed as a hydrogen storage system as early as 1982 (Klibanov et al., 1982). Conversion of  $\text{CO}_2$  and  $\text{H}_2$  to formate was then observed with other microorganisms (da Silva et al., 2013; Wu et al., 1993), enzymes (Schuchmann and Müller, 2013) and by coupling enzymes with electrochemistry (Reda et al., 2008; Srikanth et al., 2014). The capacity of acetogenic microorganisms to transform  $\text{CO}_2$  and  $\text{H}_2$  to acetate (Diekert and Wohlfarth, 1994) was first reported in 1932 (Fischer et al., 1932). Acetogenic organisms such as *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii*, and *Clostridium ragsdalei* can also produce ethanol (Mock et al., 2015). In some cases butyrate, 2,3-butanediol, or butanol can be synthesized in addition to acetate (Schiel-Bengelsdorf and Dürre, 2012).

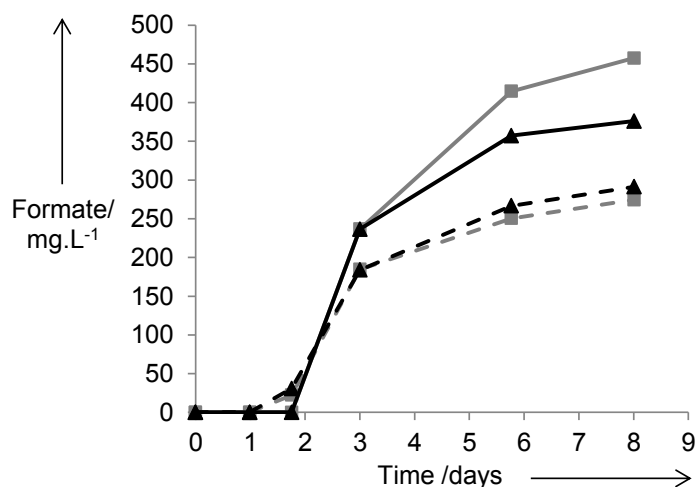
To date, the microbial catalysis of  $\text{CO}_2$  hydrogenation has mainly been performed with pure cultures. The use of multispecies inocula remains very rare (F. Zhang et al., 2013). In contrast, environmental inocula have had interesting successes in the catalysis of  $\text{CO}_2$  electrochemical reduction (Bajracharya et al., 2015; Jiang et al., 2013; LaBelle et al., 2014; Marshall et al., 2013, 2012; Mohanakrishna et al., 2015; Su et al., 2013). In so-called microbial electrochemical technology (Schröder et al., 2015), environmental inocula are commonly used to form multispecies microbial electroactive biofilms that catalyse the reduction of  $\text{CO}_2$  using a cathode as electron donor.

If the objective is to scale up to large sized commercial reactors, environmental inocula present the great advantage, over pure cultures, of not requiring sterile conditions (Kleerebezem and van Loosdrecht, 2007). Microbial consortia coming from environmental inocula can consequently be the source of robust microbial  $\text{CO}_2$  hydrogenation catalysts that can operate without the drastic constraints related to pure cultures. In particular they allow non-sterile gas inlets.

Two different environmental inocula were checked here with the objective of tapping different microbial populations for microbial catalysts of  $\text{CO}_2$  hydrogenation. Sediments collected from a salt marsh (Rousseau et al., 2013, 2014) and biological sludge collected from a wastewater treatment plant (Blanchet et al., 2015) were used because they had previously demonstrated their excellent capacity to form efficient electroactive microbial biofilms. Moreover, using an inoculum from salt marsh in a solution of high salinity increases the robustness of the process by drastically limiting the risk of contamination by non-halotolerant microorganisms. The main purpose of the study was to look for a possible enhancement of the microbial catalysis by solid conductive materials. Metallic materials were

consequently added with the objective of favouring a speculative electron exchange from hydrogen to CO<sub>2</sub>-reducing electroactive microorganisms.

A minimal medium having high salinity and inoculated with salt marsh sediments was continuously fed with hydrogen and CO<sub>2</sub>. After one to two days of initial latency, formate was produced in the four reactors (Figure 1). The maximum formate production rate obtained from day 2 to day 3 was 190 mg/L/d in the reactors equipped with a stainless steel grid, while it was only 126 mg/L/d in the control reactors not equipped with a grid. After 8 days, the two reactors equipped with such grids produced 417 ±57 mg/L formate, while only 283 ±12 mg/L was obtained in the absence of grids.



**Fig 1.** Formate production in 210 mL high-salinity medium (NaCl 45 g/L, i.e. 1.5 times seawater salinity) inoculated with salt marsh sediments (10% v/v). Hydrogen and N<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub> (80:20) were bubbled through a pipe, both at 3 mL/min. Two reactors (continuous lines) were equipped with 98 cm<sup>2</sup> stainless steel grids.

The same experimental set-up was implemented with the minimal medium, without the addition of salts, inoculated with biological sludge. The methanogenic inhibitor sodium 2-bromoethanesulfonate (BES) was added into two of the four reactors. Acetate was produced in the four reactors (Figure 2). In the presence of BES, a maximum concentration of acetate of 2053 mg/L was reached after 17 days in the presence of the stainless steel grid, while 1656 mg/L was obtained during the same period without the grid. The maximum production rates were 289 and 180 mg/L/d with and without the grid, respectively. In the absence of BES, the maximum concentrations of acetate were 1436 mg/L in the presence of a stainless steel grid and 1066 mg/L in its absence (at days 12 and 14 respectively) and the maximum production rates were 105 and 59 mg/L/d.

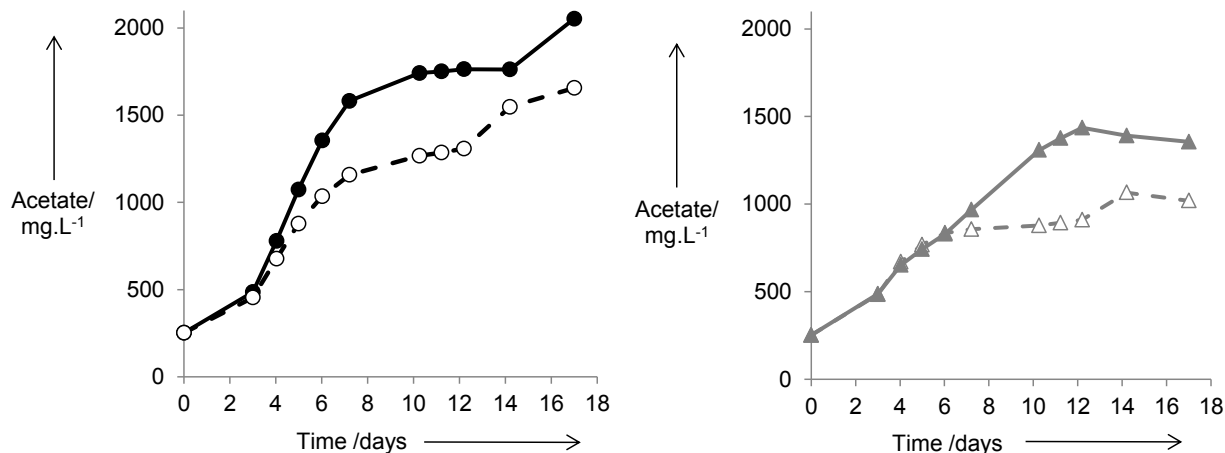


Fig 2. Acetate production in 210 mL minimal medium inoculated with biological sludge (10% v/v). Hydrogen and N<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub> (80:20) were bubbled through a pipe, both at 6 mL/min. BES 0.5 mM was added in two reactors (A), while there was no BES in the other two (B). The initial concentration of 252 mg/L was due to the natural acetate content of the inoculum. In each case, one reactor was equipped with a 320 cm<sup>2</sup> stainless steel grid (continuous line), while the other was a control without a grid.

Finally, the experimental set-up was modified so as to enhance gas-liquid mass transfer. The gas flux was provided to the solution through a porous pipe with a porous sparger at the end, which formed fine bubbles. The system inoculated with biological sludge was implemented in four reactors, two of which were filled with steel wool. BES 10 mM was added into the reactors and acetate was produced in all four. Because of the higher concentration of BES, acetate concentration increased continuously for a longer time than in the previous experiments performed without BES or with a lower concentration (0.5 mM). BES inhibited the development of methanogenic species that converted acetate to methane (Jiang et al., 2013; Su et al., 2013).

The presence of steel wool considerably increased the acetate production, up to concentrations of 5674 and 10671 mg/L after 41 days. The two reactors filled with steel wool showed significant experimental deviation. The actual surface area of the steel wool that filled the two reactors may have differed from one reactor to the other and could have been a source of deviation. In the absence of steel wool, the maximum acetate concentration was  $2810 \pm 798$  mg/L around day 27. The maximum production rates calculated between day 2 and day 12 were 285 and 204 mg/L/d with and without steel wool, respectively.

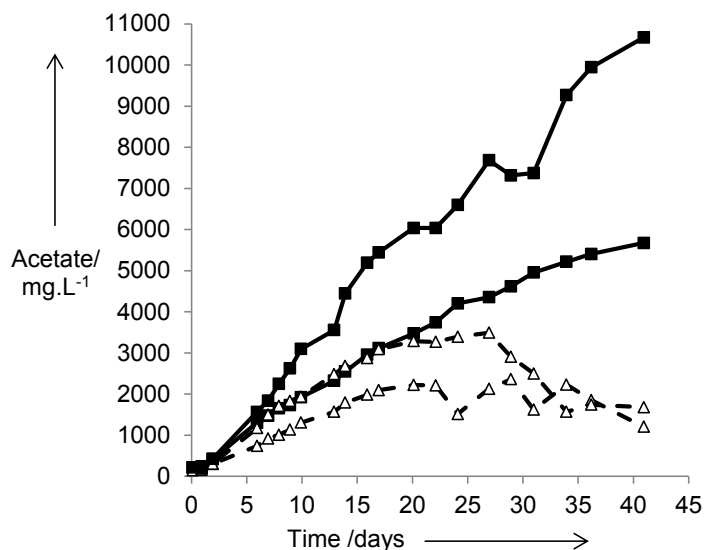


Fig 3. Acetate production in 210 mL medium inoculated with biological sludge (10% v/v). Hydrogen (0.5 to 1.0 mL/min) and N<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub> (80:20) (3 mL/min). The experimental set-up was improved by implementing a porous pipe ending with a gas sparger. BES 10 mM was added in all reactors. Two reactors were filled with steel wool (continuous lines) and two were not (dashed lines).

In the literature, using pure cultures, the microbial catalysis of CO<sub>2</sub> conversion to formate led to 0.4 mM in 24 h with *Methanobacter formicicum* (Wu et al., 1993) and 10 mM after 2.5 days with *Desulfovibrio vulgaris* (da Silva et al., 2013). The maximal concentration of 506 mg/L (11 mM) in 22 h (Klibanov et al., 1982) was obtained with immobilized cells of *Alcaligenes eutrophus* under 1 atm H<sub>2</sub>. Here, the same order of magnitude (417 ±57 mg/L) was obtained in 8 days with a multispecies culture, without optimizing the reactor design and under a hydrogen partial pressure of only 0.5 atm.

Regarding acetate production, concentrations up to 44.7 g/L after 11 days have been reported in the literature with *Acetobacter woodii* under pressurized H<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub> (Demler and Weuster-Botz, 2011). More than 50 g/L acetate has recently been reached in less than 4 days with recombinant strains (Straub et al., 2014). The preliminary experiments described here yielded up to 10 g/L acetate under low hydrogen pressure. These results showed the great interest of environmental inocula associated with the enhancing effect of a conductive material.

The simple experimental set-ups used did not allow the process efficiency to be assessed in terms of hydrogen yield. When hydrogen was simply bubbled through the solution using a pipe, hydrogen yields were less than 1% but using a gas sparger improved the hydrogen yields to 10.6 ±1.8 % in the presence of steel wool. This increase in hydrogen yield illustrated the great range of improvement that still exists having regard to the efficient gas/liquid contacting solutions available in the chemical industry. Moreover, working under gas pressure should increase the reaction efficiency even more.

To our knowledge, only one study has dealt with a multispecies community to produce volatile fatty acids from CO<sub>2</sub> (F. Zhang et al., 2013). Concentrations of 7.4 g/L acetate and 1.8 g/L butyrate were

obtained after 64 days. Here the metallic catalyst allowed a similar concentration to be reached in less than 25 days.

The results reported here point out the promising potential of environmental inocula to develop microbial catalysts for CO<sub>2</sub> hydrogenation. Interestingly, acetate or formate was produced, depending on the inoculum source. Adding the methanogenic inhibitor BES increased the acetate concentrations, showing that methane was probably also produced with the biological sludge inoculum.

In each case, the presence of a conductive material increased the maximum concentrations and the production rates. To our knowledge, this is the first demonstration of heterogeneous hydrogenation catalysis that involves gas, a solid catalyst and microbial cells. The pioneering experiments reported here are not sufficient to decipher the detailed mechanism but they support the occurrence of surface-driven catalysis. Firstly, epifluorescence imaging at the end of the experiments showed only small, and very rare, microbial settlement sites on the metal surface, showing that the catalysis did not occur via the formation of a microbial biofilm on the solid surface. Secondly, the presence of the stainless steel grid no longer had a catalytic effect when it was used for a second successive experiment without prior strong cleaning. A reactional scheme can be postulated, based on conventional hydrogen oxidation on conductive materials (Figure 4A). Actually, the mechanism may be similar to the direct electron transfer pathway postulated for microbial electrosynthesis (Figure 4B) but, in the present case, hydrogen plays the role of the electron source while, in electrosynthesis, the electrode is provided with electrons from the electric circuit. The mechanism of electrosynthesis has not been fully deciphered yet but outer-membrane cytochromes or membrane-bound enzymes, such as hydrogenases, are postulated to be involved in electron transfer from the electrode (Huang et al., 2011; Lovley, 2011b; Rabaey and Rozendal, 2010; Rosenbaum et al., 2011; Deutzmann et al., 2015). The previously reported demonstration that NAD<sup>+</sup> can be hydrogenated to NADH with hydrogen gas and a platinum catalyst supports the possible involvement of redox proteins in catalytic hydrogenation (Bergel et al., 1987).

Beyond the first two examples described here, many other reactions may be checked for the possible occurrence of similar gas/solid/microbial catalysis. For instance, the microbial conversion of syngas (CO + H<sub>2</sub>), which has led to several successes (Daniell et al., 2012; Mohammadi et al., 2011), may be a field worth investigating. Microorganisms that have the capacity to exchange electrons directly with conductive materials are now thought to be extremely diverse (Chabert et al., 2015; Logan, 2009; Sharma and Kundu, 2010). In consequence, many ecological systems might be able to achieve similar catalytic activity, provided they are screened under appropriate conditions. For instance, solid conductive particles have been observed to enhance direct interspecies electron transfer (DIET, Figure 4C) in several microbial communities (Aulenta et al., 2013; Kato et al., 2012a, 2012b; F. Liu et al., 2012). The gas/solid/microorganism scheme may be an additional pathway to be looked for in this context (Figure 4D).

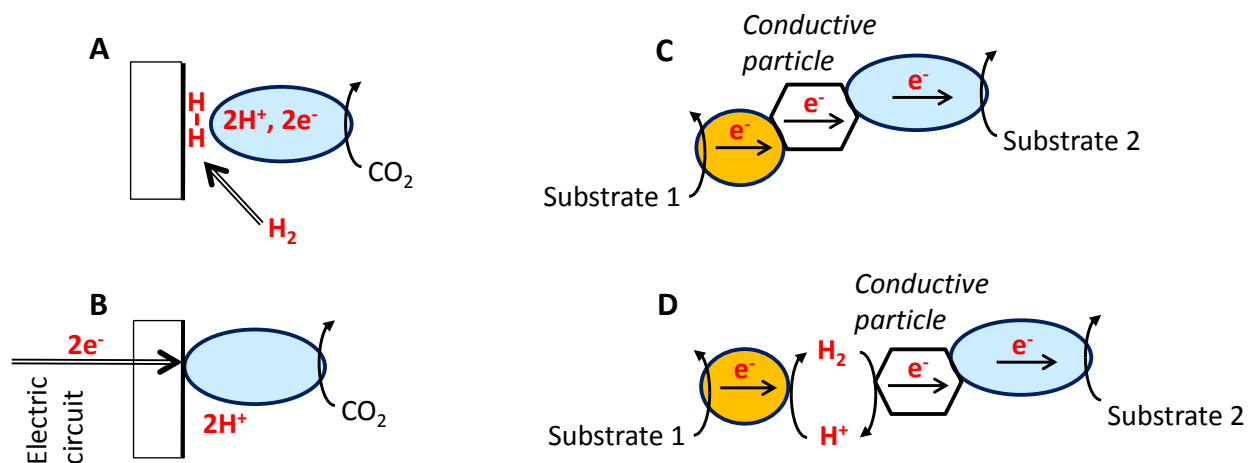


Fig 4. Postulated scheme for microbial heterogeneous catalysis and comparison with microbial electrosynthesis and direct interspecies electron transfer (DIET). A) In heterogeneous microbial catalysis, hydrogen is supposed to be firstly adsorbed on the catalyst surface and then oxidized into electrons and protons. This scheme is close to the so-called direct electron transfer pathway postulated for microbial electrosynthesis (Lovley and Nevin, 2013; Nevin et al., 2011, 2010; Lovley, 2011a) (B), except that electrons are provided by the external electric circuit in microbial electrosynthesis. C) In DIET, electrons produced by a microbial species that has oxidized a first substrate are transferred to another species that reduces another substrate. DIET can be enhanced by the mediation of conductive materials such as magnetite nanoparticles (Kato et al., 2012a) or granular activated carbon (F. Liu et al., 2012). The microbial heterogeneous catalysis described here may be another interspecies electron transfer scheme when the first species produces hydrogen (D).

### Experimental Section

The minimal medium was the “2260 Freshwater” ATCC medium omitting electron acceptor and donor (Dumas et al., 2008). It contained KCl (0.1 g/L),  $NaH_2PO_4$  (0.6 g/L),  $NH_4Cl$  (1.5 g/L),  $NaHCO_3$  (2.5 g/L), trace minerals (10 mL/L, ATCC MD-TMS) and vitamins (10 mL/L, ATCC MD-VS). The high-salinity medium was the same medium with the addition of NaCl (45 g/L),  $MgCl_2$  (0.1 g/L) and  $CaCl_2$  (0.01 g/L).

Biological sludge was collected from a treatment plant (Suez Environnement, Evry, France) and exposed to a  $H_2 - N_2:CO_2$  (80:20%) atmosphere for 5 days at 30°C to favour the development of homoacetogenic bacteria. HPLC detected acetic acid at 1980 mg/L and butyric acid at 23 mg/L after the 5-day acclimation. This inoculum was implemented with minimal medium. Sediments were collected from a salt marsh of the Mediterranean Sea (Gruissan, France). HPLC detected lactic acid (370 mg/L), formic acid (91 mg/L) and butyric acid (83 mg/L) in this inoculum. It was implemented with the high salinity minimal medium.

Washing bottles were used as gas/liquid contactors. Gas feeding was achieved with a simple pipe, except in the last experimental run, for which a porous tube was equipped with gas sparger.  $N_2:CO_2$  and  $H_2$  flows were each controlled with a valve then mixed and injected into the reactor through a third valve. The conductive catalyst was either 316L stainless steel grids (0.6 mm diameter wires, 5 mm mesh, Toul’Inox, France) with a total geometric surface area of 320 cm<sup>2</sup> or commercial steel wool (grade 000, Fe 93%, C 6.1%, Mn 0.8%). Reactors were maintained at 30°C in a water bath. Initially, the pH was around 7.1 and ranged from 5.5 to 7.3 at the end of the experiments depending on the amount of acetate produced.

Samples were filtered at 0.2  $\mu\text{m}$  and analysed for organic acids, sugar and ethanol by HPLC (Thermo Scientific, France) using a Rezex ROA-Organic acid H+ (8%), 250\*4.6 mm phase-reverse column (Phenomenex, France) thermostated at 30°C and associated with a refractive index detector in series with a UV detector. The elution was performed at 170  $\mu\text{L}/\text{min}$  with sulfuric acid 10 mM (pH 2.2). The column was calibrated with a mixture of formate, acetate, lactate, propionate, butyrate, and ethanol in the concentration range from 0.1 to 2 g/L.

The stainless steel grid was stained with acridine orange 0.01% (A6014 Sigma) for 10 min, then washed, dried at ambient temperature and imaged with a Carl Zeiss Axioimager M2 microscope equipped for epifluorescence with an HBO 50W ac mercury light source and the Zeidd 09 filter (excitor HP450-490, reflector FT 10, Barrier filter LP520).

### Acknowledgements

This work was part of the ANR-10-BTBR-02 (BIORARE) project partly funded by the French Agence Nationale de la Recherche (ANR) and the Comité des Investissements d'Avenir. The authors thank Dr Laure Renvoisé and Suez Environnement for supplying the biological sludge used as the inoculum.

### References

- [1] E. V. Kondratenko, G. Mul, J. Baltrusaitis, G. O. Larrazábal, J. Pérez-Ramírez, *Energy Environ. Sci.* 2013, 6, 3112.
- [2] W. Wang, S. Wang, X. Ma, J. Gong, *Chem. Soc. Rev.* 2011, 40, 3703–3727.
- [3] N. Yang, R. Wang, *J. Clean. Prod.* 2015, 103, 784–792.
- [4] A. M. Klibanov, B. N. Alberti, S. E. Zale, *Biotechnol. Bioeng.* 1982, 24, 25–36.
- [5] P. G. Jessop, F. Joó, C.-C. Tai, *Coord. Chem. Rev.* 2004, 248, 2425–2442.
- [6] M. R. Martin, J. J. Fornero, R. Stark, L. Mets, L. T. Angenent, M. R. Martin, J. J. Fornero, R. Stark, L. Mets, L. T. Angenent, *Archaea* 2013, 2013, 2013, e157529.
- [7] R. J. Pearson, M. D. Eisaman, J. W. G. Turner, P. P. Edwards, Z. Jiang, V. L. Kuznetsov, K. A. Littau, L. di Marco, S. R. G. Taylor, *Proc. IEEE* 2012, 100, 440–460.
- [8] S. G. Jadhav, P. D. Vaidya, B. M. Bhanage, J. B. Joshi, *Chem. Eng. Res. Des.* 2014, 92, 2557–2567.
- [9] X. Yan, H. Guo, D. Yang, S. Qiu, X. Yao, *Curr. Org. Chem.* 2014, 18, 1335–1345.
- [10] C. Rice, S. Ha, R. I. Masel, P. Waszczuk, A. Wieckowski, T. Barnard, *J. Power Sources* 2002, 111, 83–89.
- [11] C. Federsel, R. Jackstell, M. Beller, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2010, 49, 6254–6257.
- [12] Y. Himeda, *Eur. J. Inorg. Chem.* 2007, 2007, 3927–3941.
- [13] C. A. Huff, M. S. Sanford, *J. Am. Chem. Soc.* 2011, 133, 18122–18125.
- [14] P. Kang, S. Zhang, T. J. Meyer, M. Brookhart, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2014, 53, 8709–8713.
- [15] G. Kovács, G. Schubert, F. Joó, I. Pápai, *Catal. Today* 2006, 115, 53–60.
- [16] W. Leitner, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1995, 34, 2207–2221.
- [17] H. Li, P. H. Opgenorth, D. G. Wernick, S. Rogers, T.-Y. Wu, W. Higashide, P. Malati, Y.-X. Huo, K. M. Cho, J. C. Liao, *Science* 2012, 335, 1596–1596.
- [18] R. Noyori, S. Hashiguchi, *Acc. Chem. Res.* 1997, 30, 97–102.
- [19] R. Williams, R. S. Crandall, A. Bloom, *Appl. Phys. Lett.* 1978, 33, 381–383.
- [20] Q.-Y. Bi, J.-D. Lin, Y.-M. Liu, X.-L. Du, J.-Q. Wang, H.-Y. He, Y. Cao, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2014, 53, 13583–13587.
- [21] A. Boddien, F. Gärtner, C. Federsel, P. Sponholz, D. Mellmann, R. Jackstell, H. Junge, M. Beller, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2011, 50, 6411–6414.
- [22] Y. Himeda, S. Miyazawa, T. Hirose, *ChemSusChem* 2011, 4, 487–493.
- [23] T. Reda, C. M. Plugge, N. J. Abram, J. Hirst, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2008, 105, 10654–10658.
- [24] D. D. Woods, *Biochem. J.* 1936, 30, 515–527.
- [25] M. Stephenson, L. H. Stickland, *Biochem. J.* 1932, 26, 712–724.

## Chapitre 7 : Synthèse de molécules organiques à partir de dioxyde de carbone et d'hydrogène

- [26] S. M. da Silva, J. Voordouw, C. Leitaó, M. Martins, G. Voordouw, I. A. C. Pereira, *Microbiology* 2013, 159, 1760–1769.
- [27] W.-M. Wu, R. F. Hickey, M. K. Jain, J. G. Zeikus, *Arch. Microbiol.* 1993, 159, 57–65.
- [28] K. Schuchmann, V. Müller, *Science* 2013, 342, 1382–1385.
- [29] S. Srikanth, M. Maesen, X. Dominguez-Benetton, K. Vanbroekhoven, D. Pant, *Bioresour. Technol.* 2014, 165, 350–354.
- [30] G. Diekert, G. Wohlfarth, *Antonie Van Leeuwenhoek* 1994, 66, 209–221.
- [31] F. Fischer, R. Lieske, K. Winzer, *Biochem* 1932, 245, 2–12.
- [32] J. Mock, Y. Zheng, A. P. Mueller, S. Ly, L. Tran, S. Segovia, S. Nagaraju, M. Köpke, P. Dürre, R. K. Thauer, *J. Bacteriol.* 2015, 197, 2965–2980.
- [33] B. Schiel-Bengelsdorf, P. Dürre, *FEBS Lett.* 2012, 586, 2191–2198.
- [34] F. Zhang, J. Ding, Y. Zhang, M. Chen, Z.-W. Ding, M. C. M. van Loosdrecht, R. J. Zeng, *Water Res.* 2013, 47, 6122–6129.
- [35] S. Bajracharya, A. ter Heijne, X. D. Benetton, K. Vanbroekhoven, C. J. N. Buisman, D. P. B. T. B. Strik, D. Pant, *Bioresour. Technol.* 2015, 195, 14–24.
- [36] Y. Jiang, M. Su, Y. Zhang, G. Zhan, Y. Tao, D. Li, *Int. J. Hydrog. Energy* 2013, 38, 3497–3502.
- [37] E. V. LaBelle, C. W. Marshall, J. A. Gilbert, H. D. May, *PLoS ONE* 2014, 9, e109935.
- [38] C. W. Marshall, D. E. Ross, E. B. Fichot, R. S. Norman, H. D. May, *Environ. Sci. Technol.* 2013, 47, 6023–6029.
- [39] C. W. Marshall, D. E. Ross, E. B. Fichot, R. S. Norman, H. D. May, *Appl. Environ. Microbiol.* 2012, 78, 8412–8420.
- [40] G. Mohanakrishna, J. S. Seelam, K. Vanbroekhoven, D. Pant, *Faraday Discuss.* 2015, DOI 10.1039/C5FD00041F.
- [41] M. Su, Y. Jiang, D. Li, *J. Microbiol. Biotechnol.* 2013, 23, 1140–1146.
- [42] U. Schröder, F. Harnisch, L. T. Angenent, *Energy Env. Sci* 2015, 8, 513–519.
- [43] R. Kleerebezem, M. C. van Loosdrecht, *Curr. Opin. Biotechnol.* 2007, 18, 207–212.
- [44] R. Rousseau, X. Dominguez-Benetton, M.-L. Délia, A. Bergel, *Electrochem. Commun.* 2013, 33, 1–4.
- [45] R. Rousseau, C. Santaella, W. Achouak, J.-J. Godon, A. Bonnafous, A. Bergel, M.-L. Délia, *ChemElectroChem* 2014, 1, 1966–1975.
- [46] E. Blanchet, E. Desmond, B. Erable, A. Bridier, T. Bouchez, A. Bergel, *Bioresour. Technol.* 2015, 185, 106–115.
- [47] M. Demler, D. Weuster-Botz, *Biotechnol. Bioeng.* 2011, 108, 470–474.
- [48] M. Straub, M. Demler, D. Weuster-Botz, P. Dürre, *J. Biotechnol.* 2014, 178, 67–72.
- [49] J. S. Deutzmann, M. Sahin, A. M. Spormann, *mBio* 2015, 6, e00496–15.
- [50] L. Huang, J. M. Regan, X. Quan, *Bioresour. Technol.* 2011, 102, 316–323.
- [51] D. R. Lovley, *Energy Environ. Sci.* 2011, 4, 4896.
- [52] K. Rabaey, R. A. Rozendal, *Nat. Rev. Microbiol.* 2010, 8, 706–716.
- [53] M. Rosenbaum, F. Aulenta, M. Villano, L. T. Angenent, *Bioresour. Technol.* 2011, 102, 324–333.
- [54] A. Bergel, H. Durliat, M. Comtat, *J. Chim. Phys.* 1987, 84, 593.
- [55] J. Daniell, M. Köpke, S. D. Simpson, *Energies* 2012, 5, 5372–5417.
- [56] M. Mohammadi, G. D. Najafpour, H. Younesi, P. Lahijani, M. H. Uzir, A. R. Mohamed, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 2011, 15, 4255–4273.
- [57] B. E. Logan, *Nat. Rev. Microbiol.* 2009, 7, 375–381.
- [58] V. Sharma, P. P. Kundu, *Enzyme Microb. Technol.* 2010, 47, 179–188.
- [59] N. Chabert, O. Amin Ali, W. Achouak, *Bioelectrochemistry* 2015, 106, Part A, 88–96.
- [60] S. Kato, K. Hashimoto, K. Watanabe, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2012, 109, 10042–10046.
- [61] S. Kato, K. Hashimoto, K. Watanabe, *Environ. Microbiol.* 2012, 14, 1646–1654.
- [62] F. Liu, A.-E. Rotaru, P. M. Shrestha, N. S. Malvankar, K. P. Nevin, D. R. Lovley, *Energy Environ. Sci.* 2012, 5, 8982.
- [63] F. Aulenta, S. Rossetti, S. Amalfitano, M. Majone, V. Tandoi, *ChemSusChem* 2013, 6, 433–436.
- [64] D. R. Lovley, *Environ. Microbiol. Rep.* 2011, 3, 27–35.
- [65] D. R. Lovley, K. P. Nevin, *Curr. Opin. Biotechnol.* 2013, 24, 385–390.
- [66] K. P. Nevin, S. A. Hensley, A. E. Franks, Z. M. Summers, J. Ou, T. L. Woodard, O. L. Snoeyenbos-West, D. R. Lovley, *Appl. Environ. Microbiol.* 2011, 77, 2882–2886.
- [67] K. P. Nevin, T. L. Woodard, A. E. Franks, Z. M. Summers, D. R. Lovley, *mBio* 2010, 1, e00103–10.
- [68] C. Dumas, R. Basseguy, A. Bergel, *Electrochimica Acta* 2008, 53, 2494–2500.





### 3 Comment comparer les résultats obtenus en CGL à ceux de l'électrosynthèse microbienne ?

La comparaison entre les performances obtenues avec les contacteurs gaz-liquide et celles des systèmes d'électrosynthèse microbienne n'est pas aisée et a fait l'objet d'un court commentaire dans la communication publiée dans Energy & Environmental Science insérée dans le Chapitre 5

La difficulté à établir une juste comparaison entre électrosynthèse microbienne et CGL réside dans la grande différence entre la réaction catalytique hétérogène (électrosynthèse en surface d'un catalyseur) et la réaction gaz-liquide même si elle est prise ici comme une réaction homogène par souci de simplification. En effet, les microorganismes autotrophes ayant des cinétiques lentes, il ne devrait pas être très difficile de dimensionner convenablement un contacteur gaz-liquide pour que les étapes limitant la vitesse de production ne soient pas liées au transfert des gaz vers la solution. Même avec cette hypothèse simplificatrice, la comparaison du procédé électrochimique, par essence hétérogène, avec le procédé microbien, supposé homogène, demeure un épineux problème. Nous avons proposé dans l'article (cf. Chapitre 5) une première approche simple qui consiste à définir les géométries du réacteur d'électrosynthèse et du contacteur gaz-liquide qui permettraient d'atteindre les mêmes vitesses de production pour un volume de solution de un litre. Prenons pour exemple les résultats obtenus pour la production d'acétate avec les boues biologiques acclimatées utilisées comme inoculum.

Le contacteur gaz-liquide atteint une vitesse de 7.2 mM/jour avec un volume de 210 mL. On peut penser augmenter le volume de solution à 1 L en conservant les mêmes conditions simplement en augmentant la hauteur de colonne de liquide. Le contacteur garde son diamètre de 5 cm et la hauteur de liquide passe de 11 à 51 cm. On peut estimer que la vitesse de production restera égale à 7.2 mM/jour, car la consommation d'hydrogène et de CO<sub>2</sub> le long de la colonne est très faible, si bien que l'ensemble du volume travaille dans des conditions de composition identiques. La production sera ainsi de 7.2 mmoles d'acétate par jour.

Le réacteur d'électrosynthèse, avec 600 mL de volume de solution et une cathode de 21 cm<sup>2</sup> de surface, assure une vitesse de production de 0.29 mM/jour, soit 83 mmoles/j/m<sup>2</sup>. Dans le réacteur d'électrosynthèse on peut espérer maintenir la même vitesse de production par rapport à la surface de la cathode. Pour obtenir une vitesse de production de 7.2 mmoles/j, il faudrait donc une surface de cathode de 867 cm<sup>2</sup> (7.2 / 83 m<sup>2</sup>). Avec une architecture de type filtre-pressé, on peut envisager une unité d'électrosynthèse composée de deux réacteurs en série chacun équipés d'une cathode d'une largeur de 10 cm et d'une longueur de 43 cm. La distance inter-électrode doit être la plus petite possible pour minimiser la chute ohmique. En considérant une distance de 5 mm entre la cathode et la membrane qui sépare les compartiments cathodique et anodique, les deux réacteurs auront une contenance de 430 mL, qui peut être complétée par un réacteur déporté de 570 mL relié via des tuyaux et équipé avec une pompe de recirculation. En résumé, sur la base de nos résultats expérimentaux, pour atteindre une vitesse de production de 7.2 mmole/j d'acétate avec un volume de solution de 1L, il faut soit un CGL de 5 cm de diamètre avec une hauteur de liquide de 51 cm, soit un réacteur d'électrosynthèse assurant une surface de cathode de 867 cm<sup>2</sup> (par exemple deux réacteurs en série de 10x43 cm<sup>2</sup>) intégré dans une boucle avec un réacteur déporté de 570 mL.

Cet exemple illustre la complexité technique des systèmes d'électrosynthèse (des systèmes électrochimiques en général d'ailleurs) en comparaison des CGL. Le système nécessite deux électrodes à proximité l'une de l'autre, un séparateur entre elles, une étanchéité de chaque compartiment, des tuyaux et connecteurs pour alimenter les compartiments... De plus, le transfert ionique doit être facilité en augmentant la salinité des solutions mais en veillant à ne pas affecter les populations microbiennes, les gradients de pH et le phénomène d'osmose doivent être gérés, et les problèmes de colmatages de la membrane peuvent engendrer des problèmes supplémentaires.

Evidemment, tous ces obstacles peuvent être surmontés mais au prix d'une complexification du système et de la définition de conditions opératoires très strictes. Notons tout de même que les performances de nos systèmes d'électrosynthèse (0.29 mM/j) sont nettement inférieures aux meilleures performances reportées dans la bibliographie de 17.2 mM/j (Marshall et al., 2013) et jusqu'à 52 mM/j (LaBelle et al., 2014). Cependant, il convenait de faire ici la comparaison avec les données obtenues pour le même système microbien dans les deux équipements. Il semblerait maintenant opportun que chaque étude d'électrosynthèse effectuée à des potentiels auxquels le dégagement d'hydrogène est possible, présente systématiquement la comparaison avec la synthèse dans les mêmes conditions par simple apport d'hydrogène.

#### 4 Bilan sur les essais en contacteurs gaz-liquide

Le travail effectué sur la deuxième étape du procédé Biorare dissocié permet de dégager les résultats suivants :

- Une souche pure acétogène a été mise en œuvre en CGL : *S. ovata* ; elle a permis de produire des concentrations en acétate de l'ordre de 3 g/L en 9 jours, soit bien plus que les concentrations maximales reportées dans la bibliographie avec cette souche
- Il a été fait la démonstration que *S. ovata* est capable de synthétiser de l'éthanol (concentration maximale de 35 mM) dans un bioréacteur alimenté avec H<sub>2</sub> et CO<sub>2</sub>. Auparavant, seule une production de 1mM d'éthanol avait été reportée avec cette souche (Möller et al., 1984)
- Les deux sources de populations microbiennes mixtes autotrophes sélectionnées (boues biologiques acclimatées et sédiments de marais salants de la côte méditerranéenne) sont capables de catalyser la réduction du CO<sub>2</sub> en utilisant l'hydrogène comme donneur d'électrons
- Les sédiments de marais salants ont permis de produire 417 mg/L de formiate en 8 jours
- Les boues biologiques acclimatées ont produit jusqu'à 10 g/L d'acétate et 1.2 g/L de butyrate en 40 jours
- Pour améliorer les taux de production et la diversité des molécules organiques synthétisées, l'influence de plusieurs paramètres expérimentaux a été étudié : le taux d'inoculum, le débit d'hydrogène, le type de contacteur gaz liquide, l'ajout d'un inhibiteur des méthanogènes, l'ajout d'un catalyseur métallique solide.
- L'optimisation du contacteur gaz-liquide avec l'ajout d'un tube poreux et d'un diffuseur permet d'améliorer le taux d'utilisation de l'hydrogène de 1 à 10%. Ainsi, un faible débit d'hydrogène (0.5 mL/min) peut être utilisé tout en maintenant la productivité en molécules synthétisées.
- L'utilisation d'un module de fibres creuses améliore de 34% la vitesse maximale de production d'acétate par rapport à la version 1.2 des CGL.

- En culture mixte, l'ajout d'un inhibiteur des méthanogènes est essentiel pour allonger les durées de culture et atteindre des concentrations en acétate supérieures à 2 g/L.
- L'ajout d'une grille en acier ou d'un garnissage conducteur solide améliore la synthèse microbienne de molécules organiques. L'hypothèse formulée est que la surface d'acier joue le rôle de catalyseur sur lequel l'hydrogène peut s'adsorber, ce qui faciliterait son utilisation par les microorganismes.



# Conclusions générales



Les travaux de thèse présentés dans ce manuscrit s'inscrivent dans le cadre du projet Biorare (Bioélectrosynthèse pour le raffinage des déchets résiduels). Ils visent à concevoir et développer un système d'électrosynthèse microbienne, technologie innovante qui permet de convertir le CO<sub>2</sub> en molécules organiques en utilisant une cathode comme source d'électrons de la réduction microbienne du CO<sub>2</sub>. L'originalité du procédé «Biorare» est de coupler l'électrosynthèse microbienne avec l'oxydation de déchets à l'anode afin d'augmenter le rendement énergétique du procédé. Il deviendrait ainsi possible de traiter un effluent à l'anode et de valoriser du CO<sub>2</sub> à la cathode. Ce procédé constitue une technologie extrêmement prometteuse pour la bioraffinerie de déchets organiques. Une rapide analyse de la bibliographie montre à quel point les recherches se multiplient sur les technologies électro-microbiennes ces dix dernières années. Cependant le concept de l'électrosynthèse microbienne est encore jeune et de multiples défis restent à relever pour envisager un développement industriel. Nous espérons que ces travaux de thèse permettent de faire un pas en avant vers le développement du procédé.

Le premier objectif de la thèse était d'optimiser les performances des anodes microbiennes formées à partir de résidus de station d'épuration. Sur les deux types de boues testées, seules les boues biologiques étaient directement adaptées pour une utilisation brute en tant que substrat et sources de microorganismes électroactifs pour la formation d'anodes avec des densités de courant atteignant 10 A/m<sup>2</sup>. En revanche, ces performances n'étaient que très peu reproductibles. En accord avec le consortium Biorare, nos efforts se sont alors focalisés sur la mise en œuvre de biodéchets. Ils représentent en France un gisement de matière organique très intéressant de 22 millions de tonnes et leur valorisation est aujourd'hui obligatoire. Les biodéchets bruts se sont avérés difficilement utilisables pour la formation de bioanodes à cause de leur acidité et de leur charge organique trop importantes. Leur dilution est alors apparue nécessaire. Nous avons mis en place une méthode, dite « méthode en trois étapes » pour augmenter les densités de courant jusqu'à 7 A/m<sup>2</sup>, de façon reproductible et dans des conditions proches de celles qui pourraient être appliquées à grande échelle, en substituant les milieux synthétiques utilisés habituellement par des eaux usées urbaines. Cette méthode s'est en outre révélée être un excellent moyen de régénérer les bioanodes. Ensuite, nous avons tenté d'augmenter les densités de courant en passant d'une électrode 2D à une électrode 3D. Il a alors été mis en évidence que les mêmes performances électrocatalytiques étaient obtenues pour une bioélectrode alimentée en biodéchets, qu'elle soit formée sur du tissu de carbone 2D ou du feutre de carbone 3D. Pour le futur développement industriel, les électrodes 2D doivent être considérées comme une solution pertinente, particulièrement si l'objectif est de concevoir des électrodes multi-couches.

Le deuxième objectif de ce travail était la formation de biocathodes de réduction du CO<sub>2</sub> pour la synthèse de molécules organiques. Cette partie du travail était plus ambitieuse et la lecture des quelques références bibliographiques traitant de ce sujet laissaient présager une voie difficile. La stratégie, dite « d'électrode réversible », qui avait fait ses preuves pour la formation de biocathodes de réduction d'oxygène a été adaptée pour tenter de former des biocathodes de réduction de CO<sub>2</sub>. Cependant, la réduction du CO<sub>2</sub> en molécules organiques n'a pas été possible ni en culture mixte, ni en culture pure. Une densité de courant maximale de réduction de 3 A/m<sup>2</sup> a toutefois été obtenue avec un biofilm sélectionné, mais uniquement en présence d'un accepteur d'électrons alternatif (fumarate) et pendant



un maximum de 48 heures. Finalement, des essais plus conventionnels de formation de biocathodes, ont mis en évidence que la réduction microbienne du CO<sub>2</sub> dans le compartiment cathodique d'un réacteur électrochimique était souvent médiée par l'hydrogène. Dans ces conditions de transfert indirect d'électrons, le travail a mis en lumière l'intérêt de réaliser la réduction microbienne de CO<sub>2</sub> dans un biocontacteur gaz-liquide alimenté en CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>. Cela a conduit à découpler le procédé initial en deux étapes : la production d'hydrogène dans une cellule d'électrolyse microbienne qui oxyde les biodéchets et, en aval, la synthèse de molécules organiques à partir de l'hydrogène produit et de CO<sub>2</sub> dans un bioréacteur gaz-liquide.

La dernière partie de ce travail a alors consisté à développer et tester les deux dispositifs du procédé ainsi découplé. En premier lieu, une cellule d'électrolyse microbienne a été dimensionnée à l'échelle du laboratoire (3 L) et fabriquée avec l'objectif de produire 0.9 L d'hydrogène par jour. Cet objectif a été atteint en utilisant comme anolyte des eaux usées supplémentées avec le substrat modèle acétate. Une membrane de microfiltration et une membrane échangeuse de cations ont été comparées avec, respectivement de l'eau ou une solution phosphatée en tant que catholyte. Nous avons montré que la membrane échangeuse de cations et le catholyte phosphaté étaient la meilleure option puisque ce couple permet de réduire la tension d'électrolyse de 34% par rapport à la configuration utilisant la membrane de microfiltration. Le coût énergétique minimum calculé pour la production d'un mètre cube d'hydrogène était ainsi de 2.28 kW.h/m<sup>3</sup> H<sub>2</sub>.

Un travail sur l'amélioration des biocontacteurs gaz-liquide a été mené en parallèle, avec pour objectif d'augmenter la production de molécules synthétisées tout en maximisant l'utilisation de l'hydrogène. Avec le faible débit d'hydrogène de 0.5 mL/min, représentatif des débits obtenus avec la cellule d'électrolyse microbienne, la vitesse de production d'acétate a atteint 372 mg/L/j. En 41 jours, la concentration en acétate produit a dépassé 10 g/L. En fonction des systèmes microbiens hydrogénotrophes mis en œuvre, du formiate, du butyrate ou de l'éthanol ont pu également être synthétisés à partir de CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>. Le rendement d'utilisation de l'hydrogène a atteint 16% mais devrait pouvoir être encore largement amélioré.

Nos essais ont déjà permis d'identifier quelques paramètres clés pour l'élaboration d'une stratégie de développement industrielle ultérieure. Afin d'établir un cahier des charges détaillé pour l'application de l'électrosynthèse microbienne à la bioraffinerie des déchets organiques, de nombreuses perspectives peuvent désormais être proposées.

Les études sur la formation de bioanodes en milieux réels ont montré l'intérêt de la méthode en trois étapes et ont aussi pointé du doigt la nécessité de travailler avec un matériau d'électrode comme le tissu de carbone avec un réseau de fibres suffisamment dense pour assurer une colonisation régulière de toute la surface. Ces pistes sont encourageantes, un travail sur la disposition de plusieurs bioélectrodes en multi-couches dans le compartiment anodique ainsi qu'une réflexion sur leur architecture devraient être engagés, en incluant la problématique de colmatage, de mélange et de transfert du substrat.

Par ailleurs, une idée intéressante discutée au sein du consortium Biorare serait de remplacer les eaux usées proposées dans cette thèse comme milieu de dilution à l'anode par des effluents de sortie de

digesteur anaérobie. Ce type d'effluent est naturellement plus conducteur que les eaux usées et pourrait permettre de lever les limitations liées à la faible conductivité de l'analyte tout en proposant un procédé cohérent, n'utilisant que des effluents disponibles sur une plateforme de méthanisation.

En dehors de l'ingénierie sur la bioanode, le procédé d'électrolyse microbienne développé pourrait être amélioré à plusieurs niveaux : la régulation automatique du pH, l'automatisation de l'apport en substrat, et également la possibilité de récupérer les gaz produits à l'anode pour les valoriser ou les réinjecter sous pression pour créer une contrainte de cisaillement en cas de colmatage. Un travail sur le matériau ou la géométrie de la cathode pourrait aussi permettre de réduire la tension d'électrolyse, en augmentant par exemple sa surface développée ou en travaillant sur le couplage entre matériau et catalyse par les acides faibles pour la réduction de l'eau.

Pour ce qui concerne la biosynthèse de molécules à partir de CO<sub>2</sub>, deux types de recherche pourraient être menées en parallèle :

- Un axe focalisé sur le transfert direct d'électrons à la cathode ; dans ce cadre il serait judicieux de choisir des réactions de synthèse avec un potentiel redox suffisamment éloigné de celui de la production d'hydrogène (-0.41/ESH). La réaction de réduction du CO<sub>2</sub> et du fumarate en glycérol est un bon exemple. Le temps a manqué pour pouvoir le démontrer, mais la culture de la souche *Geobacter sulfurreducens* à la cathode pourrait aboutir à une biocathode intéressante et un minimum d'énergie électrique à fournir pour la production de glycérol. Une autre perspective d'intérêt serait de mettre en œuvre *Geobacter metallireducens* pour la réduction d'acétate en éthanol à la cathode.
- Un axe que nous avons déjà balisé et qui est très prometteur reste à développer : l'optimisation de la synthèse de molécules à partir de CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub> par des cultures mixtes sélectionnées ou des cultures pures dans un contacteur gaz-liquide. Il faut poursuivre les essais qui ont été initiés avec le module membranaire à fibres creuses pour améliorer encore le taux d'utilisation de l'hydrogène. Une des perspectives envisagées seraient d'utiliser des membranes métalliques, permettant ainsi de combiner les avantages des membranes pour la distribution des gaz avec le concept de catalyse chimio-microbienne qui a été breveté au cours de cette thèse. Pour affiner les connaissances et compléter le brevet, il conviendrait de mener une étude de la population microbienne qui se développe dans les CGL. Avant le développement de CGL à plus grande échelle, il faut aussi trouver les paramètres clés permettant une pression de sélection suffisante pour éviter le développement de méthanogènes. En effet, il est sans doute nécessaire d'éliminer l'utilisation d'un inhibiteur de méthanogénèse tel que le BES pour un procédé à grande échelle. Sur cette base de connaissances, des co-cultures pourraient être mises en œuvre pour aller bien au-delà de la synthèse des molécules simples obtenues jusqu'à présent.

Finalement, les résultats obtenus lorsque les systèmes seront optimisés constitueront une base solide à la fois pour le dimensionnement d'un prototype à plus grande échelle et également pour affiner l'analyse de cycle de vie (ACV) du procédé. Je souhaite au consortium Biorare, qui regroupe l'ensemble des compétences multidisciplinaires nécessaires pour aborder ces multiples pistes, de continuer à progresser pour transformer cette aventure scientifique en une avancée industrielle durable.



# Références bibliographiques



- Adamse, A.D., 1980. New isolation of *Clostridium aceticum* (Wieringa). *Antonie Van Leeuwenhoek* 46, 523–531. doi:10.1007/BF00394009
- Aelterman, P., Versichele, M., Marzorati, M., Boon, N., Verstraete, W., 2008. Loading rate and external resistance control the electricity generation of microbial fuel cells with different three-dimensional anodes. *Bioresour. Technol.* 99, 8895–8902. doi:10.1016/j.biortech.2008.04.061
- Agler, M.T., Spirito, C.M., Usack, J.G., Werner, J.J., Angenent, L.T., 2012. Chain elongation with reactor microbiomes: upgrading dilute ethanol to medium-chain carboxylates. *Energy Environ. Sci.* 5, 8189. doi:10.1039/c2ee22101b
- Agler, M.T., Wrenn, B.A., Zinder, S.H., Angenent, L.T., 2011. Waste to bioproduct conversion with undefined mixed cultures: the carboxylate platform. *Trends Biotechnol.* 29, 70–78. doi:10.1016/j.tibtech.2010.11.006
- Ahn, Y., Logan, B.E., 2010. Effectiveness of domestic wastewater treatment using microbial fuel cells at ambient and mesophilic temperatures. *Bioresour. Technol.* 101, 469–475. doi:10.1016/j.biortech.2009.07.039
- Alleau, T., 2005. Pourquoi l'hydrogène. Extr. CLEFS CEA - N°50-51.
- Allen, R.M., Bennetto, H.P., 1993. Microbial fuel-cells. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 39-40, 27–40. doi:10.1007/BF02918975
- Andreesen, J.R., Gottschalk, G., Schlegel, H.G., 1970. *Clostridium formicoaceticum* nov. spec. Isolation, description and distinction from *C. aceticum* and *C. thermoaceticum*. *Arch. Für Mikrobiol.* 72, 154–174. doi:10.1007/BF00409521
- Angenent, L.T., Agler, M., 2014. Production of carboxylates and methane from biomass waste.
- Angenent, L.T., Rosenbaum, M.A., 2013. Microbial electrocatalysis to guide biofuel and biochemical bioprocessing. *Biofuels* 4, 131–134. doi:10.4155/bfs.12.93
- Ariesyady, H.D., Ito, T., Okabe, S., 2007. Functional bacterial and archaeal community structures of major trophic groups in a full-scale anaerobic sludge digester. *Water Res.* 41, 1554–1568. doi:10.1016/j.watres.2006.12.036
- Aulenta, F., Rossetti, S., Amalfitano, S., Majone, M., Tandoi, V., 2013. Conductive Magnetite Nanoparticles Accelerate the Microbial Reductive Dechlorination of Trichloroethene by Promoting Interspecies Electron Transfer Processes. *ChemSusChem* 6, 433–436. doi:10.1002/cssc.201200748
- Bajracharya, S., Heijne, A. ter, Benetton, X.D., Vanbroekhoven, K., Buisman, C.J.N., Strik, D.P.B.T.B., Pant, D., 2015. Carbon dioxide reduction by mixed and pure cultures in microbial electrosynthesis using an assembly of graphite felt and stainless steel as a cathode. *Bioresour. Technol.* 195, 14–24. doi:10.1016/j.biortech.2015.05.081
- Balch, W.E., Schoberth, S., Tanner, R.S., Wolfe, R.S., 1977. *Acetobacterium*, a New Genus of Hydrogen-Oxidizing, Carbon Dioxide-Reducing, Anaerobic Bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 27, 355–361. doi:10.1099/00207713-27-4-355
- Baudler, A., Riedl, S., Schröder, U., 2014. Long-term performance of primary and secondary electroactive biofilms using layered corrugated carbon electrodes. *Front. Energy Res.* 2, 30. doi:10.3389/fenrg.2014.00030
- Bennetto, H.P., 1981. Rates of reduction of phenothiazine 'redox' dyes by *E. coli*. *Chem. Ind.* 770–778.
- Bergel, A., Durliat, H., Comtat, M., 1987. Attempts for the regeneration of the coenzyme NADH by electrochemical reduction and catalytic hydrogenation. *J. Chim. Phys.* 84, 593.
- Bergel, A., Féron, D., Mollica, A., 2005. Catalysis of oxygen reduction in PEM fuel cell by seawater biofilm. *Electrochem. Commun.* 7, 900–904. doi:10.1016/j.elecom.2005.06.006
- Bi, Q.-Y., Lin, J.-D., Liu, Y.-M., Du, X.-L., Wang, J.-Q., He, H.-Y., Cao, Y., 2014. An Aqueous Rechargeable Formate-Based Hydrogen Battery Driven by Heterogeneous Pd Catalysis. *Angew. Chem. Int. Ed.* 53, 13583–13587. doi:10.1002/anie.201409500

- Björnsson, L., Hugenholtz, P., Tyson, G.W., Blackall, L.L., 2002. Filamentous Chloroflexi (green non-sulfur bacteria) are abundant in wastewater treatment processes with biological nutrient removal. *Microbiol. Read. Engl.* 148, 2309–2318.
- Blanchet, E., Desmond, E., Erable, B., Bridier, A., Bouchez, T., Bergel, A., 2015. Comparison of synthetic medium and wastewater used as dilution medium to design scalable microbial anodes: Application to food waste treatment. *Bioresour. Technol.* 185, 106–115. doi:10.1016/j.biortech.2015.02.097
- Blanchet, E., Pécastaings, S., Erable, B., Roques, C., Bergel, A., 2014. Protons accumulation during anodic phase turned to advantage for oxygen reduction during cathodic phase in reversible bioelectrodes. *Bioresour. Technol.*
- Boddien, A., Gärtner, F., Federsel, C., Sponholz, P., Mellmann, D., Jackstell, R., Junge, H., Beller, M., 2011. CO<sub>2</sub>-“Neutral” Hydrogen Storage Based on Bicarbonates and Formates. *Angew. Chem. Int. Ed.* 50, 6411–6414. doi:10.1002/anie.201101995
- Boghani, H.C., Kim, J.R., Dinsdale, R.M., Guwy, A.J., Premier, G.C., 2013. Control of power sourced from a microbial fuel cell reduces its start-up time and increases bioelectrochemical activity. *Bioresour. Technol.* 140, 277–285. doi:10.1016/j.biortech.2013.04.087
- Bond, D.R., Holmes, D.E., Tender, L.M., Lovley, D.R., 2002. Electrode-reducing microorganisms that harvest energy from marine sediments. *Science* 295, 483–485. doi:10.1126/science.1066771
- Bond, D.R., Lovley, D.R., 2003. Electricity Production by *Geobacter sulfurreducens* Attached to Electrodes. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1548–1555. doi:10.1128/AEM.69.3.1548-1555.2003
- Borole, A.P., Reguera, G., Ringeisen, B., Wang, Z.-W., Feng, Y., Kim, B.H., 2011. Electroactive biofilms: Current status and future research needs. *Energy Environ. Sci.* 4, 4813–4834. doi:10.1039/C1EE02511B
- Both Engel, A., Holade, Y., Tingry, S., Cherifi, A., Cornu, D., Servat, K., Napporn, T.W., Kokoh, K.B., 2015. Electrospun Carbon Fibers: Promising Electrode Material for Abiotic and Enzymatic Catalysis. *J. Phys. Chem. C* 119, 16724–16733. doi:10.1021/acs.jpcc.5b04352
- Bo, T., Zhu, X., Zhang, L., Tao, Y., He, X., Li, D., Yan, Z., 2014. A new upgraded biogas production process: Coupling microbial electrolysis cell and anaerobic digestion in single-chamber, barrel-shape stainless steel reactor. *Electrochem. Commun.* 45, 67–70. doi:10.1016/j.elecom.2014.05.026
- Braun, M., Mayer, F., Gottschalk, G., 1981. *Clostridium aceticum* (Wieringa), a microorganism producing acetic acid from molecular hydrogen and carbon dioxide. *Arch. Microbiol.* 128, 288–293. doi:10.1007/BF00422532
- Bredwell, M.D., Srivastava, P., Worden, R.M., 1999. Reactor Design Issues for Synthesis-Gas Fermentations. *Biotechnol. Prog.* 15, 834–844. doi:10.1021/bp990108m
- Bridier, A., Desmond-Le Quemener, E., Bureau, C., Champigneux, P., Renvoise, L., Audic, J.-M., Blanchet, E., Bergel, A., Bouchez, T., 2015. Successive bioanode regenerations to maintain efficient current production from biowaste. *Bioelectrochemistry* 106, 133–140. doi:10.1016/j.bioelechem.2015.05.007
- Butti, S.K., Velvizhi, G., Sulonen, M.L.K., Haavisto, J.M., Oguz Koroglu, E., Yusuf Cetinkaya, A., Singh, S., Arya, D., Annie Modestra, J., Vamsi Krishna, K., Verma, A., Ozkaya, B., Lakaniemi, A.-M., Puhakka, J.A., Venkata Mohan, S., 2016. Microbial electrochemical technologies with the perspective of harnessing bioenergy: Maneuvering towards upscaling. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 53, 462–476. doi:10.1016/j.rser.2015.08.058
- Cai, W.-F., Fang, X.-W., Xu, M.-X., Liu, X.-H., Wang, Y.-H., 2015. Sequential recovery of copper and nickel from wastewater without net energy input. *Water Sci. Technol.* 71, 754–760. doi:10.2166/wst.2015.024
- Call, D., Logan, B.E., 2008. Hydrogen Production in a Single Chamber Microbial Electrolysis Cell Lacking a Membrane. *Environ. Sci. Technol.* 42, 3401–3406. doi:10.1021/es8001822

- Caporaso, J.G., Bittinger, K., Bushman, F.D., DeSantis, T.Z., 2010a. PyNAST: a flexible tool for aligning sequences to a template alignment. *Bioinformatics* 26, 266–267. doi:10.1093/bioinformatics/btp636
- Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K., Fierer, N., Peña, A.G., Goodrich, J.K., Gordon, J.I., Huttley, G.A., Kelley, S.T., Knights, D., Koenig, J.E., Ley, R.E., Lozupone, C.A., McDonald, D., Muegge, B.D., Pirrung, M., Reeder, J., Sevinsky, J.R., Turnbaugh, P.J., Walters, W.A., Widmann, J., Yatsunencko, T., Zaneveld, J., Knight, R., 2010b. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods* 7, 335–336. doi:10.1038/nmeth.f.303
- Carbajosa, S., Malki, M., Caillard, R., Lopez, M.F., Palomares, F.J., Martín-Gago, J.A., Rodríguez, N., Amils, R., Fernández, V.M., De Lacey, A.L., 2010. Electrochemical growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans* on a graphite electrode for obtaining a biocathode for direct electrocatalytic reduction of oxygen. *Biosens. Bioelectron.* 26, 877–880. doi:10.1016/j.bios.2010.07.037
- Carmona-Martínez, A.A., Trably, E., Milferstedt, K., Lacroix, R., Etcheverry, L., Bernet, N., 2015. Long-term continuous production of H<sub>2</sub> in a microbial electrolysis cell (MEC) treating saline wastewater. *Water Res.* 81, 149–156. doi:10.1016/j.watres.2015.05.041
- Carrillo-Reyes, J., Trably, E., Bernet, N., Latrille, E., Razo-Flores, E., 2016. High robustness of a simplified microbial consortium producing hydrogen in long term operation of a biofilm fermentative reactor. *Int. J. Hydrog. Energy* 41, 2367–2376. doi:10.1016/j.ijhydene.2015.11.131
- Catal, T., Lesnik, K.L., Liu, H., 2015. Suppression of methanogenesis for hydrogen production in single-chamber microbial electrolysis cells using various antibiotics. *Bioresour. Technol.* 187, 77–83. doi:10.1016/j.biortech.2015.03.099
- Catal, T., Li, K., Bermek, H., Liu, H., 2008. Electricity production from twelve monosaccharides using microbial fuel cells. *J. Power Sources* 175, 196–200. doi:10.1016/j.jpowsour.2007.09.083
- Cavaillé, L., Grousseau, E., Pocquet, M., Lepeuple, A.-S., Uribelarrea, J.-L., Hernandez-Raquet, G., Paul, E., 2013. Polyhydroxybutyrate production by direct use of waste activated sludge in phosphorus-limited fed-batch culture. *Bioresour. Technol.* 149, 301–309. doi:10.1016/j.biortech.2013.09.044
- Cercado, B., Byrne, N., Bertrand, M., Pocaznoi, D., Rimboud, M., Achouak, W., Bergel, A., 2013. Garden compost inoculum leads to microbial bioanodes with potential-independent characteristics. *Bioresour. Technol.* 134, 276–284. doi:10.1016/j.biortech.2013.01.123
- Cercado-Quezada, B., Delia, M.-L., Bergel, A., 2010a. Testing various food-industry wastes for electricity production in microbial fuel cell. *Bioresour. Technol.* 101, 2748–2754. doi:10.1016/j.biortech.2009.11.076
- Cercado-Quezada, B., Delia, M.-L., Bergel, A., 2010b. Treatment of dairy wastes with a microbial anode formed from garden compost. *J. Appl. Electrochem.* 40, 225–232. doi:10.1007/s10800-009-0001-5
- Cescut, J., Fillaudeau, L., Molina-Jouve, C., Uribelarrea, J.-L., 2014. Carbon accumulation in *Rhodotorula glutinis* induced by nitrogen limitation. *Biotechnol. Biofuels* 7, 164. doi:10.1186/s13068-014-0164-0
- Chabanon, E., Bouallou, C., Remigy, J.C., Lasseguette, E., Medina, Y., Favre, E., Nguyen, P.T., Roizard, D., 2011. Study of an innovative gas-liquid contactor for CO<sub>2</sub> absorption. *Energy Procedia*, 10th International Conference on Greenhouse Gas Control Technologies 4, 1769–1776. doi:10.1016/j.egypro.2011.02.052
- Chabert, N., Amin Ali, O., Achouak, W., 2015. All ecosystems potentially host electrogenic bacteria. *Bioelectrochemistry*, Special Issue on “Biological fuel cells” 106, Part A, 88–96. doi:10.1016/j.bioelechem.2015.07.004



- Chae, K.-J., Choi, M.-J., Lee, J.-W., Kim, K.-Y., Kim, I.S., 2009. Effect of different substrates on the performance, bacterial diversity, and bacterial viability in microbial fuel cells. *Bioresour. Technol.* 100, 3518–3525. doi:10.1016/j.biortech.2009.02.065
- Chang, I.S., Moon, H., Bretschger, O., Jang, J.K., Park, H.I., Nealon, K.H., Kim, B.H., 2006. Electrochemically active bacteria (EAB) and mediator-less microbial fuel cells. *J. Microbiol. Biotechnol.* 16, 163–177.
- Chaudhuri, S.K., Lovley, D.R., 2003. Electricity generation by direct oxidation of glucose in mediatorless microbial fuel cells. *Nat. Biotechnol.* 21, 1229–1232. doi:10.1038/nbt867
- Cheng, K.Y., Ho, G., Cord-Ruwisch, R., 2010. Anodophilic Biofilm Catalyzes Cathodic Oxygen Reduction. *Environ. Sci. Technol.* 44, 518–525. doi:10.1021/es9023833
- Cheng, S., Liu, H., Logan, B.E., 2006. Increased Power Generation in a Continuous Flow MFC with Advective Flow through the Porous Anode and Reduced Electrode Spacing. *Environ. Sci. Technol.* 40, 2426–2432. doi:10.1021/es051652w
- Cheng, S., Xing, D., Call, D.F., Logan, B.E., 2009. Direct Biological Conversion of Electrical Current into Methane by Electromethanogenesis. *Environ. Sci. Technol.* 43, 3953–3958. doi:10.1021/es803531g
- Chen, S., He, G., Hu, X., Xie, M., Wang, S., Zeng, D., Hou, H., Schröder, U., 2012a. A Three-Dimensionally Ordered Macroporous Carbon Derived From a Natural Resource as Anode for Microbial Bioelectrochemical Systems. *ChemSusChem* 5, 1059–1063. doi:10.1002/cssc.201100783
- Chen, S., He, G., Liu, Q., Harnisch, F., Zhou, Y., Chen, Y., Hanif, M., Wang, S., Peng, X., Hou, H., Schröder, U., 2012b. Layered corrugated electrode macrostructures boost microbial bioelectrocatalysis. *Energy Environ. Sci.* 5, 9769. doi:10.1039/c2ee23344d
- Chen, S., Hou, H., Harnisch, F., Patil, S.A., Carmona-Martinez, A.A., Agarwal, S., Zhang, Y., Sinha-Ray, S., Yarin, A.L., Greiner, A., Schröder, U., 2011. Electrospun and solution blown three-dimensional carbon fiber nonwovens for application as electrodes in microbial fuel cells. *Energy Environ. Sci.* 4, 1417. doi:10.1039/c0ee00446d
- Chen, S., Liu, Q., He, G., Zhou, Y., Hanif, M., Peng, X., Wang, S., Hou, H., 2012c. Reticulated carbon foam derived from a sponge-like natural product as a high-performance anode in microbial fuel cells. *J. Mater. Chem.* 22, 18609. doi:10.1039/c2jm33733a
- Chen, W.-F., Sasaki, K., Ma, C., Frenkel, A.I., Marinkovic, N., Muckerman, J.T., Zhu, Y., Adzic, R.R., 2012. Hydrogen-Evolution Catalysts Based on Non-Noble Metal Nickel–Molybdenum Nitride Nanosheets. *Angew. Chem. Int. Ed.* 51, 6131–6135. doi:10.1002/anie.201200699
- Choi, J., Chang, H.N., Han, J.-I., 2010. Performance of microbial fuel cell with volatile fatty acids from food wastes. *Biotechnol. Lett.* 33, 705–714. doi:10.1007/s10529-010-0507-2
- Choi, S., 2015. Microscale microbial fuel cells: Advances and challenges. *Biosens. Bioelectron.* 69, 8–25. doi:10.1016/j.bios.2015.02.021
- Clauwaert, P., Verstraete, W., 2008. Methanogenesis in membraneless microbial electrolysis cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 82, 829–836. doi:10.1007/s00253-008-1796-4
- Cohen, B., 1931. The Bacteria Culture as an Electrical Half-Cell. *J. Bacteriol.* 21, 18–19.
- Cole, J.R., Wang, Q., Cardenas, E., Fish, J., Chai, B., Farris, R.J., Kulam-Syed-Mohideen, A.S., McGarrell, D.M., Marsh, T., Garrity, G.M., Tiedje, J.M., 2009. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.* 37, D141–D145. doi:10.1093/nar/gkn879
- Collins, M.D., Lawson, P.A., Willems, A., Cordoba, J.J., Fernandez-Garayzabal, J., Garcia, P., Cai, J., Hippe, H., Farrow, J.A.E., 1994. The Phylogeny of the Genus *Clostridium*: Proposal of Five New Genera and Eleven New Species Combinations. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44, 812–826. doi:10.1099/00207713-44-4-812

- Commault, A.S., Lear, G., Packer, M.A., Weld, R.J., 2013. Influence of anode potentials on selection of *Geobacter* strains in microbial electrolysis cells. *Bioresour. Technol.* 139, 226–234. doi:10.1016/j.biortech.2013.04.047
- Coppi, M.V., O’Neil, R.A., Lovley, D.R., 2004. Identification of an uptake hydrogenase required for hydrogen-dependent reduction of Fe(III) and other electron acceptors by *Geobacter sulfurreducens*. *J. Bacteriol.* 186, 3022–3028.
- Corbella, C., Guivernau, M., Viñas, M., Puigagut, J., 2015. Operational, design and microbial aspects related to power production with microbial fuel cells implemented in constructed wetlands. *Water Res.* 84, 232–242. doi:10.1016/j.watres.2015.06.005
- Crisuolo, A., Gribaldo, S., 2010. BMGE (Block Mapping and Gathering with Entropy): a new software for selection of phylogenetic informative regions from multiple sequence alignments. *BMC Evol. Biol.* 10, 210. doi:10.1186/1471-2148-10-210
- Cusick, R.D., Bryan, B., Parker, D.S., Merrill, M.D., Mehanna, M., Kiely, P.D., Liu, G., Logan, B.E., 2011. Performance of a pilot-scale continuous flow microbial electrolysis cell fed winery wastewater. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89, 2053–2063. doi:10.1007/s00253-011-3130-9
- Daniell, J., Köpke, M., Simpson, S.D., 2012. Commercial Biomass Syngas Fermentation. *Energies* 5, 5372–5417. doi:10.3390/en5125372
- Daniel, S.L., Hsu, T., Dean, S.I., Drake, H.L., 1990. Characterization of the H<sub>2</sub>- and CO-dependent chemolithotrophic potentials of the acetogens *Clostridium thermoaceticum* and *Acetogenium kivui*. *J. Bacteriol.* 172, 4464–4471.
- Da Silva, S., Basséguy, R., Bergel, A., 2004. Electrochemical deprotonation of phosphate on stainless steel. *Electrochimica Acta* 49, 4553–4561. doi:10.1016/j.electacta.2004.04.039
- da Silva, S.M., Voordouw, J., Leitao, C., Martins, M., Voordouw, G., Pereira, I.A.C., 2013. Function of formate dehydrogenases in *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough energy metabolism. *Microbiology* 159, 1760–1769. doi:10.1099/mic.0.067868-0
- Datar, R.P., Shenkman, R.M., Cateni, B.G., Huhnke, R.L., Lewis, R.S., 2004. Fermentation of biomass-generated producer gas to ethanol. *Biotechnol. Bioeng.* 86, 587–594. doi:10.1002/bit.20071
- Daud, S.M., Kim, B.H., Ghasemi, M., Daud, W.R.W., 2015. Separators used in microbial electrochemical technologies: Current status and future prospects. *Bioresour. Technol.* 195, 170–179. doi:10.1016/j.biortech.2015.06.105
- Demler, M., Weuster-Botz, D., 2011. Reaction engineering analysis of hydrogenotrophic production of acetic acid by *Acetobacterium woodii*. *Biotechnol. Bioeng.* 108, 470–474. doi:10.1002/bit.22935
- De Silva Muñoz, L., Bergel, A., Basséguy, R., 2007. Role of the reversible electrochemical deprotonation of phosphate species in anaerobic biocorrosion of steels. *Corros. Sci.* 49, 3988–4004. doi:10.1016/j.corsci.2007.04.003
- De Silva Muñoz, L., Bergel, A., Féron, D., Basséguy, R., 2010. Hydrogen production by electrolysis of a phosphate solution on a stainless steel cathode. *Int. J. Hydrog. Energy* 35, 8561–8568. doi:10.1016/j.ijhydene.2010.05.101
- Desloover, J., Arends, J.B.A., Henebel, T., Rabaey, K., 2012. Operational and technical considerations for microbial electrosynthesis. *Biochem. Soc. Trans.* 40, 1233–1238. doi:10.1042/BST20120111
- Deutzmann, J.S., Sahin, M., Spormann, A.M., 2015. Extracellular Enzymes Facilitate Electron Uptake in Biocorrosion and Bioelectrosynthesis. *mBio* 6, e00496–15. doi:10.1128/mBio.00496-15
- Dhar, B.R., Lee, H.-S., 2013. Membranes for bioelectrochemical systems: challenges and research advances. *Environ. Technol.* 34, 1751–1764. doi:10.1080/09593330.2013.822007
- Diekert, G., Wohlfarth, G., 1994. Metabolism of homoacetogens. *Antonie Van Leeuwenhoek* 66, 209–221. doi:10.1007/BF00871640
- Dopson, M., Ni, G., Sleutels, T.H., 2015. Possibilities for extremophilic microorganisms in microbial electrochemical systems. *FEMS Microbiol. Rev.* fuv044. doi:10.1093/femsre/fuv044

- Dorn, M., Andreesen, J.R., Gottschalk, G., 1978. Fermentation of fumarate and L-malate by *Clostridium formicoaceticum*. *J. Bacteriol.* 133, 26–32.
- Dowd, S.E., Callaway, T.R., Wolcott, R.D., Sun, Y., McKeegan, T., Hagevoort, R.G., Edrington, T.S., 2008. Evaluation of the bacterial diversity in the feces of cattle using 16S rDNA bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP). *BMC Microbiol.* 8, 125. doi:10.1186/1471-2180-8-125
- Drake, H.L., Gößner, A.S., Daniel, S.L., 2008. Old Acetogens, New Light. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1125, 100–128. doi:10.1196/annals.1419.016
- Dumas, C., Basseguy, R., Bergel, A., 2008. Microbial electrocatalysis with *Geobacter sulfurreducens* biofilm on stainless steel cathodes. *Electrochimica Acta* 53, 2494–2500. doi:10.1016/j.electacta.2007.10.018
- Edgar, R.C., 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 26, 2460–2461. doi:10.1093/bioinformatics/btq461
- Edgar, R.C., Haas, B.J., Clemente, J.C., Quince, C., Knight, R., 2011. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 27, 2194–2200. doi:10.1093/bioinformatics/btr381
- ElMekawy, A., Srikanth, S., Bajracharya, S., Hegab, H.M., Nigam, P.S., Singh, A., Mohan, S.V., Pant, D., 2015. Food and agricultural wastes as substrates for bioelectrochemical system (BES): The synchronized recovery of sustainable energy and waste treatment. *Food Res. Int., Byproducts from agri-food industry: new strategies for their revalorization* 73, 213–225. doi:10.1016/j.foodres.2014.11.045
- Epifanio, M., Inguva, S., Kitching, M., Mosnier, J.-P., Marsili, E., 2015. Effects of atmospheric air plasma treatment of graphite and carbon felt electrodes on the anodic current from *Shewanella* attached cells. *Bioelectrochemistry Amst. Neth.* 106, 186–193. doi:10.1016/j.bioelechem.2015.03.011
- Erbale, B., Féron, D., Bergel, A., 2012. Microbial catalysis of the oxygen reduction reaction for microbial fuel cells: a review. *ChemSusChem* 5, 975–987. doi:10.1002/cssc.201100836
- Erbale, B., Vandecandelaere, I., Faimali, M., Delia, M.-L., Etcheverry, L., Vandamme, P., Bergel, A., 2010. Marine aerobic biofilm as biocathode catalyst. *Bioelectrochemistry, From fundamentals to microbial power plants: Electrochemically Active Biofilms* 78, 51–56. doi:10.1016/j.bioelechem.2009.06.006
- Escapa, A., Mateos, R., Martínez, E.J., Blanes, J., 2016. Microbial electrolysis cells: An emerging technology for wastewater treatment and energy recovery. From laboratory to pilot plant and beyond. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 55, 942–956. doi:10.1016/j.rser.2015.11.029
- Escapa, A., San-Martín, M.I., Mateos, R., Morán, A., 2015. Scaling-up of membraneless microbial electrolysis cells (MECs) for domestic wastewater treatment: Bottlenecks and limitations. *Bioresour. Technol.* 180, 72–78. doi:10.1016/j.biortech.2014.12.096
- Fan, Y., Sharbrough, E., Liu, H., 2008. Quantification of the Internal Resistance Distribution of Microbial Fuel Cells. *Environ. Sci. Technol.* 42, 8101–8107. doi:10.1021/es801229j
- Federsel, C., Jackstell, R., Beller, M., 2010. State-of-the-Art Catalysts for Hydrogenation of Carbon Dioxide. *Angew. Chem. Int. Ed.* 49, 6254–6257. doi:10.1002/anie.201000533
- Feng, Y., Wang, X., Logan, B.E., Lee, H., 2008. Brewery wastewater treatment using air-cathode microbial fuel cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 78, 873–880. doi:10.1007/s00253-008-1360-2
- Fischer, F., Lieske, R., Winzer, K., 1932. Biologische Gasreaktionen, II. Mitteilung: über die Bildung von Essigsäure bei der biologischen Umsetzung von Kohlenoxyd und Kohlensäure mit Wasserstoff zu Methan. *Biochem* 245, 2–12.
- Foladori, P., Bruni, L., Tamburini, S., Ziglio, G., 2010. Direct quantification of bacterial biomass in influent, effluent and activated sludge of wastewater treatment plants by using flow cytometry. *Water Res.* 44, 3807–3818. doi:10.1016/j.watres.2010.04.027

- Fontaine, F.E., Peterson, W.H., McCoy, E., Johnson, M.J., Ritter, G.J., 1942. A New Type of Glucose Fermentation by *Clostridium thermoaceticum*. *J. Bacteriol.* 43, 701–715.
- Fontanille, P., Kumar, V., Christophe, G., Nouaille, R., Larroche, C., 2012. Bioconversion of volatile fatty acids into lipids by the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. *Bioresour. Technol.* 114, 443–449. doi:10.1016/j.biortech.2012.02.091
- Forsythe, S.J., 2011. *The Microbiology of Safe Food*. John Wiley & Sons.
- Franks, A.E., Nevin, K.P., Jia, H., Izallalen, M., Woodard, T.L., Lovley, D.R., 2008. Novel strategy for three-dimensional real-time imaging of microbial fuel cell communities: monitoring the inhibitory effects of proton accumulation within the anode biofilm. *Energy Environ. Sci.* 2, 113–119. doi:10.1039/B816445B
- Freguia, S., Rabaey, K., Yuan, Z., Keller, J., 2008. Sequential anode–cathode configuration improves cathodic oxygen reduction and effluent quality of microbial fuel cells. *Water Res.* 42, 1387–1396. doi:10.1016/j.watres.2007.10.007
- Freguia, S., Teh, E.H., Boon, N., Leung, K.M., Keller, J., Rabaey, K., 2010a. Microbial fuel cells operating on mixed fatty acids. *Bioresour. Technol.* 101, 1233–1238. doi:10.1016/j.biortech.2009.09.054
- Freguia, S., Tsujimura, S., Kano, K., 2010b. Electron transfer pathways in microbial oxygen biocathodes. *Electrochimica Acta* 55, 813–818. doi:10.1016/j.electacta.2009.09.027
- Fricke, K., Harnisch, F., Schröder, U., 2008. On the use of cyclic voltammetry for the study of anodic electron transfer in microbial fuel cells. *Energy Environ. Sci.* 1, 144. doi:10.1039/b802363h
- Gaddy, J.L., 2000. Biological production of ethanol from waste gases with *Clostridium ljungdahlii*.
- Ghasemi, M., Daud, W.R.W., Hassan, S.H.A., Oh, S.-E., Ismail, M., Rahimnejad, M., Jahim, J.M., 2013. Nano-structured carbon as electrode material in microbial fuel cells: A comprehensive review. *J. Alloys Compd.* 580, 245–255. doi:10.1016/j.jallcom.2013.05.094
- Gil-Carrera, L., Escapa, A., Moreno, R., Morán, A., 2013. Reduced energy consumption during low strength domestic wastewater treatment in a semi-pilot tubular microbial electrolysis cell. *J. Environ. Manage.* 122, 1–7. doi:10.1016/j.jenvman.2013.03.001
- Gottschalk, G., Braun, M., 1981. NOTES: Revival of the Name *Clostridium aceticum*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 31, 476–476. doi:10.1099/00207713-31-4-476
- Goud, R.K., Babu, P.S., Mohan, S.V., 2011. Canteen based composite food waste as potential anodic fuel for bioelectricity generation in single chambered microbial fuel cell (MFC): Bio-electrochemical evaluation under increasing substrate loading condition. *Int. J. Hydrog. Energy* 36, 6210–6218. doi:10.1016/j.ijhydene.2011.02.056
- Grätzel, M., 2001. Photoelectrochemical cells. *Nature* 414, 338–344. doi:10.1038/35104607
- Gregory, K.B., Bond, D.R., Lovley, D.R., 2004. Graphite electrodes as electron donors for anaerobic respiration. *Environ. Microbiol.* 6, 596–604. doi:10.1111/j.1462-2920.2004.00593.x
- Grootscholten, T.I.M., Steinbusch, K.J.J., Hamelers, H.V.M., Buisman, C.J.N., 2013. Chain elongation of acetate and ethanol in an upflow anaerobic filter for high rate MCFA production. *Bioresour. Technol., Biorefineries* 135, 440–445. doi:10.1016/j.biortech.2012.10.165
- Grousseau, E., Blanchet, E., Déléris, S., Albuquerque, M.G.E., Paul, E., Uribe Larrea, J.-L., 2014. Phosphorus limitation strategy to increase propionic acid flux towards 3-hydroxyvaleric acid monomers in *Cupriavidus necator*. *Bioresour. Technol.* 153, 206–215. doi:10.1016/j.biortech.2013.11.072
- Grunwald, S., Mottet, A., Grousseau, E., Plassmeier, J.K., Popović, M.K., Uribe Larrea, J.-L., Gorret, N., Guillouet, S.E., Sinskey, A., 2015. Kinetic and stoichiometric characterization of organoautotrophic growth of *Ralstonia eutropha* on formic acid in fed-batch and continuous cultures. *Microb. Biotechnol.* 8, 155–163. doi:10.1111/1751-7915.12149
- Guindon, S., Gascuel, O., 2003. A Simple, Fast, and Accurate Algorithm to Estimate Large Phylogenies by Maximum Likelihood. *Syst. Biol.* 52, 696–704. doi:10.1080/10635150390235520

- Guo, K., Freguia, S., Dennis, P.G., Chen, X., Donose, B.C., Keller, J., Gooding, J.J., Rabaey, K., 2013. Effects of Surface Charge and Hydrophobicity on Anodic Biofilm Formation, Community Composition, and Current Generation in Bioelectrochemical Systems. *Environ. Sci. Technol.* 47, 7563–7570. doi:10.1021/es400901u
- Guo, Y., Xu, J., Zhang, Y., Xu, H., Yuan, Z., Li, D., 2010. Medium optimization for ethanol production with *Clostridium autoethanogenum* with carbon monoxide as sole carbon source. *Bioresour. Technol.* 101, 8784–8789. doi:10.1016/j.biortech.2010.06.072
- Haas, B.J., Gevers, D., Earl, A.M., Feldgarden, M., Ward, D.V., Giannoukos, G., Ciulla, D., Tabbaa, D., Highlander, S.K., Sodergren, E., Methé, B., DeSantis, T.Z., Petrosino, J.F., Knight, R., Birren, B.W., 2011. Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons. *Genome Res.* 21, 494–504. doi:10.1101/gr.112730.110
- Habermann, W., Pommer, E.H., 1991. Biological fuel cells with sulphide storage capacity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 35, 128–133. doi:10.1007/BF00180650
- Harnisch, F., Schröder, U., 2009. Selectivity versus mobility: separation of anode and cathode in microbial bioelectrochemical systems. *ChemSusChem* 2, 921–926. doi:10.1002/cssc.200900111
- He, G., Gu, Y., He, S., Schröder, U., Chen, S., Hou, H., 2011. Effect of fiber diameter on the behavior of biofilm and anodic performance of fiber electrodes in microbial fuel cells. *Bioresour. Technol.* 102, 10763–10766. doi:10.1016/j.biortech.2011.09.006
- Heidrich, E.S., Dolfig, J., Scott, K., Edwards, S.R., Jones, C., Curtis, T.P., 2012. Production of hydrogen from domestic wastewater in a pilot-scale microbial electrolysis cell. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 6979–6989. doi:10.1007/s00253-012-4456-7
- Henstra, A.M., Sipma, J., Rinzema, A., Stams, A.J., 2007. Microbiology of synthesis gas fermentation for biofuel production. *Curr. Opin. Biotechnol., Energy biotechnology / Environmental biotechnology* 18, 200–206. doi:10.1016/j.copbio.2007.03.008
- He, Z., Minteer, S.D., Angenent, L.T., 2005. Electricity Generation from Artificial Wastewater Using an Upflow Microbial Fuel Cell. *Environ. Sci. Technol.* 39, 5262–5267. doi:10.1021/es0502876
- Hickey, R., Datta, R., Tsai, S., Basu, R., 2008. MEMBRANE SUPPORTED BIOREACTOR FOR CONVERSION OF SYNGAS COMPONENTS TO LIQUID PRODUCTS. 20080305539.
- Himeda, Y., 2007. Conversion of CO<sub>2</sub> into Formate by Homogeneously Catalyzed Hydrogenation in Water: Tuning Catalytic Activity and Water Solubility through the Acid–Base Equilibrium of the Ligand. *Eur. J. Inorg. Chem.* 2007, 3927–3941. doi:10.1002/ejic.200700494
- Himeda, Y., Miyazawa, S., Hirose, T., 2011. Interconversion between Formic Acid and H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> using Rhodium and Ruthenium Catalysts for CO<sub>2</sub> Fixation and H<sub>2</sub> Storage. *ChemSusChem* 4, 487–493. doi:10.1002/cssc.201000327
- Huang, L., Regan, J.M., Quan, X., 2011. Electron transfer mechanisms, new applications, and performance of biocathode microbial fuel cells. *Bioresour. Technol., Special Issue: Biofuels - II: Algal Biofuels and Microbial Fuel Cells* 102, 316–323. doi:10.1016/j.biortech.2010.06.096
- Hubenova, Y., Mitov, M., 2015. Extracellular electron transfer in yeast-based biofuel cells: A review. *Bioelectrochemistry Amst. Neth.* 106, 177–185. doi:10.1016/j.bioelechem.2015.04.001
- Huff, C.A., Sanford, M.S., 2011. Cascade Catalysis for the Homogeneous Hydrogenation of CO<sub>2</sub> to Methanol. *J. Am. Chem. Soc.* 133, 18122–18125. doi:10.1021/ja208760j
- Hu, H., Fan, Y., Liu, H., 2008. Hydrogen production using single-chamber membrane-free microbial electrolysis cells. *Water Res.* 42, 4172–4178. doi:10.1016/j.watres.2008.06.015
- Ishii, S., Shimoyama, T., Hotta, Y., Watanabe, K., 2008. Characterization of a filamentous biofilm community established in a cellulose-fed microbial fuel cell. *BMC Microbiol.* 8, 6. doi:10.1186/1471-2180-8-6

- Jacques, P.-A., Artero, V., Pécaut, J., Fontecave, M., 2009. Cobalt and nickel diimine-dioxime complexes as molecular electrocatalysts for hydrogen evolution with low overvoltages. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 20627–20632. doi:10.1073/pnas.0907775106
- Jadhav, S.G., Vaidya, P.D., Bhanage, B.M., Joshi, J.B., 2014. Catalytic carbon dioxide hydrogenation to methanol: A review of recent studies. *Chem. Eng. Res. Des.* 92, 2557–2567. doi:10.1016/j.cherd.2014.03.005
- Janicek, A., Fan, Y., Liu, H., 2014. Design of microbial fuel cells for practical application: a review and analysis of scale-up studies. *Biofuels* 5, 79–92. doi:10.4155/bfs.13.69
- Jessop, P.G., Joó, F., Tai, C.-C., 2004. Recent advances in the homogeneous hydrogenation of carbon dioxide. *Coord. Chem. Rev., Vignettes of Homogeneous Catalysis* 248, 2425–2442. doi:10.1016/j.ccr.2004.05.019
- Jiang, Y., Su, M., Zhang, Y., Zhan, G., Tao, Y., Li, D., 2013. Bioelectrochemical systems for simultaneously production of methane and acetate from carbon dioxide at relatively high rate. *Int. J. Hydrog. Energy* 38, 3497–3502. doi:10.1016/j.ijhydene.2012.12.107
- Kadier, A., Simayi, Y., Kalil, M.S., Abdeshahian, P., Hamid, A.A., 2014. A review of the substrates used in microbial electrolysis cells (MECs) for producing sustainable and clean hydrogen gas. *Renew. Energy* 71, 466–472. doi:10.1016/j.renene.2014.05.052
- Kang, P., Zhang, S., Meyer, T.J., Brookhart, M., 2014. Rapid Selective Electrocatalytic Reduction of Carbon Dioxide to Formate by an Iridium Pincer Catalyst Immobilized on Carbon Nanotube Electrodes. *Angew. Chem. Int. Ed.* 53, 8709–8713. doi:10.1002/anie.201310722
- Karlsson, J.L., Volcani, B.E., Barker, H.A., 1948. The Nutritional Requirements of *Clostridium aceticum*1. *J. Bacteriol.* 56, 781–782.
- Kato Marcus, A., Torres, C.I., Rittmann, B.E., 2007. Conduction-based modeling of the biofilm anode of a microbial fuel cell. *Biotechnol. Bioeng.* 98, 1171–1182. doi:10.1002/bit.21533
- Kato, S., Hashimoto, K., Watanabe, K., 2012a. Microbial interspecies electron transfer via electric currents through conductive minerals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 10042–10046. doi:10.1073/pnas.1117592109
- Kato, S., Hashimoto, K., Watanabe, K., 2012b. Methanogenesis facilitated by electric syntrophy via (semi)conductive iron-oxide minerals. *Environ. Microbiol.* 14, 1646–1654. doi:10.1111/j.1462-2920.2011.02611.x
- Katuri, K.P., Werner, C.M., Jimenez-Sandoval, R.J., Chen, W., Jeon, S., Logan, B.E., Lai, Z., Amy, G.L., Saikaly, P.E., 2014. A Novel Anaerobic Electrochemical Membrane Bioreactor (AnEMBR) with Conductive Hollow-fiber Membrane for Treatment of Low-Organic Strength Solutions. *Environ. Sci. Technol.* 48, 12833–12841. doi:10.1021/es504392n
- Kaur, A., Kim, J.R., Michie, I., Dinsdale, R.M., Guwy, A.J., Premier, G.C., 2013. Microbial fuel cell type biosensor for specific volatile fatty acids using acclimated bacterial communities. *Biosens. Bioelectron.* 47, 50–55. doi:10.1016/j.bios.2013.02.033
- Kelly, P.T., He, Z., 2014. Nutrients removal and recovery in bioelectrochemical systems: A review. *Bioresour. Technol.* 153, 351–360. doi:10.1016/j.biortech.2013.12.046
- Kenealy, W.R., Cao, Y., Weimer, P.J., 1995. Production of caproic acid by cocultures of ruminal cellulolytic bacteria and *Clostridium kluveri* grown on cellulose and ethanol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44, 507–513. doi:10.1007/BF00169952
- Ketep, S.F., Bergel, A., Calmet, A., Erable, B., 2014. Stainless steel foam increases the current produced by microbial bioanodes in bioelectrochemical systems. *Energy Environ. Sci.* 7, 1633. doi:10.1039/c3ee44114h
- Ketep, S.F., Fourest, E., Bergel, A., 2013. Experimental and theoretical characterization of microbial bioanodes formed in pulp and paper mill effluent in electrochemically controlled conditions. *Bioresour. Technol.* 149, 117–125. doi:10.1016/j.biortech.2013.09.025

- Kiely, P.D., Regan, J.M., Logan, B.E., 2011. The electric picnic: synergistic requirements for exoelectrogenic microbial communities. *Curr. Opin. Biotechnol., Energy biotechnology – Environmental biotechnology* 22, 378–385. doi:10.1016/j.copbio.2011.03.003
- Kim, B.-H., Kim, H.-J., Hyun, M.-S., Park, D.-H., 1999. Direct electrode reaction of Fe(III)-reducing bacterium, *Shewanella putrefaciens*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 9, 127–131.
- Kim, G. t., Webster, G., Wimpenny, J. w. t., Kim, B. h., Kim, H. j., Weightman, A. j., 2006. Bacterial community structure, compartmentalization and activity in a microbial fuel cell. *J. Appl. Microbiol.* 101, 698–710. doi:10.1111/j.1365-2672.2006.02923.x
- Kim, H.J., Park, H.S., Hyun, M.S., Chang, I.S., Kim, M., Kim, B.H., 2002. A mediator-less microbial fuel cell using a metal reducing bacterium, *Shewanella putrefaciens*. *Enzyme Microb. Technol.* 30, 145–152. doi:10.1016/S0141-0229(01)00478-1
- Kim, J.R., Min, B., Logan, B.E., 2005. Evaluation of procedures to acclimate a microbial fuel cell for electricity production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68, 23–30. doi:10.1007/s00253-004-1845-6
- Kipf, E., Zengerle, R., Gescher, J., Kerzenmacher, S., 2014. How Does the Choice of Anode Material Influence Electrical Performance? A Comparison of Two Microbial Fuel Cell Model Organisms. *ChemElectroChem* 1, 1849–1853. doi:10.1002/celc.201402036
- Kleerebezem, R., van Loosdrecht, M.C., 2007. Mixed culture biotechnology for bioenergy production. *Curr. Opin. Biotechnol., Energy biotechnology / Environmental biotechnology* 18, 207–212. doi:10.1016/j.copbio.2007.05.001
- Klibanov, A.M., Alberti, B.N., Zale, S.E., 1982. Enzymatic synthesis of formic acid from H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> and production of hydrogen from formic acid. *Biotechnol. Bioeng.* 24, 25–36. doi:10.1002/bit.260240104
- Koch, C., Popiel, D., Harnisch, F., 2014. Functional Redundancy of Microbial Anodes fed by Domestic Wastewater. *ChemElectroChem* 1, 1923–1931. doi:10.1002/celc.201402216
- Kondratenko, E.V., Mul, G., Baltrusaitis, J., Larrazábal, G.O., Pérez-Ramírez, J., 2013. Status and perspectives of CO<sub>2</sub> conversion into fuels and chemicals by catalytic, photocatalytic and electrocatalytic processes. *Energy Environ. Sci.* 6, 3112. doi:10.1039/c3ee41272e
- Köpke, M., Held, C., Hujer, S., Liesegang, H., Wiezer, A., Wollherr, A., Ehrenreich, A., Liebl, W., Gottschalk, G., Dürre, P., 2010. *Clostridium ljungdahlii* represents a microbial production platform based on syngas. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 13087–13092. doi:10.1073/pnas.1004716107
- Kovács, G., Schubert, G., Joó, F., Pápai, I., 2006. Theoretical investigation of catalytic HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-hydrogenation in aqueous solutions. *Catal. Today, Proceedings of the 8th International Conference on Carbon Dioxide Utilization Dedicated to Professor Michele Aresta* 115, 53–60. doi:10.1016/j.cattod.2006.02.018
- Krieg, T., Sydow, A., Schröder, U., Schrader, J., Holtmann, D., 2014. Reactor concepts for bioelectrochemical syntheses and energy conversion. *Trends Biotechnol.* 32, 645–655. doi:10.1016/j.tibtech.2014.10.004
- Krulwich, T.A., 1995. Alkaliphiles: “basic” molecular problems of pH tolerance and bioenergetics. *Mol. Microbiol.* 15, 403–410. doi:10.1111/j.1365-2958.1995.tb02253.x
- Krumholz, L.R., Harris, S.H., Tay, S.T., Suflita, J.M., 1999. Characterization of Two Subsurface H<sub>2</sub>-Utilizing Bacteria, *Desulfomicrobium hypogaeum* sp. nov. and *Acetobacterium psammolithicum* sp. nov., and Their Ecological Roles. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2300–2306.
- Kumar, R., Singh, L., Zularisam, A.W., 2016. Exoelectrogens: Recent advances in molecular drivers involved in extracellular electron transfer and strategies used to improve it for microbial fuel cell applications. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 56, 1322–1336. doi:10.1016/j.rser.2015.12.029
- LaBelle, E.V., Marshall, C.W., Gilbert, J.A., May, H.D., 2014. Influence of Acidic pH on Hydrogen and Acetate Production by an Electrosynthetic Microbiome. *PLoS ONE* 9, e109935. doi:10.1371/journal.pone.0109935

- Lacroix, R., Silva, S.D., Gaig, M.V., Rousseau, R., Délia, M.-L., Bergel, A., 2014. Modelling potential/current distribution in microbial electrochemical systems shows how the optimal bioanode architecture depends on electrolyte conductivity. *Phys. Chem. Chem. Phys.* PCCP 16, 22892–22902. doi:10.1039/c4cp02177k
- Leang, C., Ueki, T., Nevin, K.P., Lovley, D.R., 2012. A Genetic System for *Clostridium ljungdahlii*: A Chassis for Autotrophic Production of Biocommodities and a Model Homoacetogen. *Appl. Environ. Microbiol.* AEM.02891–12. doi:10.1128/AEM.02891-12
- Lee, H.-S., Rittmann, B.E., 2010. Significance of Biological Hydrogen Oxidation in a Continuous Single-Chamber Microbial Electrolysis Cell. *Environ. Sci. Technol.* 44, 948–954. doi:10.1021/es9025358
- Leitner, W., 1995. Carbon Dioxide as a Raw Material: The Synthesis of Formic Acid and Its Derivatives from CO<sub>2</sub>. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 34, 2207–2221. doi:10.1002/anie.199522071
- Liguori, R., Amore, A., Faraco, V., 2013. Waste valorization by biotechnological conversion into added value products. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 6129–6147. doi:10.1007/s00253-013-5014-7
- Li, H., Oppenorth, P.H., Wernick, D.G., Rogers, S., Wu, T.-Y., Higashide, W., Malati, P., Huo, Y.-X., Cho, K.M., Liao, J.C., 2012. Integrated Electromicrobial Conversion of CO<sub>2</sub> to Higher Alcohols. *Science* 335, 1596–1596. doi:10.1126/science.1217643
- Liu, F., Rotaru, A.-E., Shrestha, P.M., Malvankar, N.S., Nevin, K.P., Lovley, D.R., 2012. Promoting direct interspecies electron transfer with activated carbon. *Energy Environ. Sci.* 5, 8982. doi:10.1039/c2ee22459c
- Liu, H., Cheng, S., Logan, B.E., 2005. Power Generation in Fed-Batch Microbial Fuel Cells as a Function of Ionic Strength, Temperature, and Reactor Configuration. *Environ. Sci. Technol.* 39, 5488–5493. doi:10.1021/es050316c
- Liu, H., Ramnarayanan, R., Logan, B.E., 2004. Production of electricity during wastewater treatment using a single chamber microbial fuel cell. *Environ. Sci. Technol.* 38, 2281–2285.
- Liu, J., Zhang, F., He, W., Yang, W., Feng, Y., Logan, B.E., 2014. A microbial fluidized electrode electrolysis cell (MFEEC) for enhanced hydrogen production. *J. Power Sources* 271, 530–533. doi:10.1016/j.jpowsour.2014.08.042
- Liu, W., Huang, S., Zhou, A., Zhou, G., Ren, N., Wang, A., Zhuang, G., 2012. Hydrogen generation in microbial electrolysis cell feeding with fermentation liquid of waste activated sludge. *Int. J. Hydrog. Energy, ICCE-2011* 37, 13859–13864. doi:10.1016/j.ijhydene.2012.04.090
- Liu, Y., Harnisch, F., Fricke, K., Schröder, U., Climent, V., Feliu, J.M., 2010. The study of electrochemically active microbial biofilms on different carbon-based anode materials in microbial fuel cells. *Biosens. Bioelectron.* 25, 2167–2171. doi:10.1016/j.bios.2010.01.016
- Liu, Y., Harnisch, F., Fricke, K., Sietmann, R., Schröder, U., 2008. Improvement of the anodic bioelectrocatalytic activity of mixed culture biofilms by a simple consecutive electrochemical selection procedure. *Biosens. Bioelectron.* 24, 1006–1011. doi:10.1016/j.bios.2008.08.001
- Liu, Z., Liu, J., Zhang, S., Su, Z., 2009. Study of operational performance and electrical response on mediator-less microbial fuel cells fed with carbon- and protein-rich substrates. *Biochem. Eng. J.* 45, 185–191. doi:10.1016/j.bej.2009.03.011
- Li, W., Sun, J., Hu, Y., Zhang, Y., Deng, F., Chen, J., 2014. Simultaneous pH self-neutralization and bioelectricity generation in a dual bioelectrode microbial fuel cell under periodic reversion of polarity. *J. Power Sources*. doi:10.1016/j.jpowsour.2014.06.047
- Li, W.-W., Sheng, G.-P., Liu, X.-W., Yu, H.-Q., 2011. Recent advances in the separators for microbial fuel cells. *Bioresour. Technol., Special Issue: Biofuels - II: Algal Biofuels and Microbial Fuel Cells* 102, 244–252. doi:10.1016/j.biortech.2010.03.090
- Li, W.-W., Yu, H.-Q., 2011. From wastewater to bioenergy and biochemicals via two-stage bioconversion processes: a future paradigm. *Biotechnol. Adv.* 29, 972–982. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.08.012



- Li, W.-W., Yu, H.-Q., He, Z., 2014. Towards sustainable wastewater treatment by using microbial fuel cells-centered technologies. *Energy Environ. Sci.* 7, 911–924. doi:10.1039/C3EE43106A
- Li, X.M., Cheng, K.Y., Selvam, A., Wong, J.W.C., 2013. Bioelectricity production from acidic food waste leachate using microbial fuel cells: Effect of microbial inocula. *Process Biochem.* 48, 283–288. doi:10.1016/j.procbio.2012.10.001
- Ljungdhal, L.G., 1986. The Autotrophic Pathway of Acetate Synthesis in Acetogenic Bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 40, 415–450. doi:10.1146/annurev.mi.40.100186.002215
- Logan, B., Cheng, S., Watson, V., Estadt, G., 2007. Graphite Fiber Brush Anodes for Increased Power Production in Air-Cathode Microbial Fuel Cells. *Environ. Sci. Technol.* 41, 3341–3346. doi:10.1021/es062644y
- Logan, B.E., 2012. Essential Data and Techniques for Conducting Microbial Fuel Cell and other Types of Bioelectrochemical System Experiments. *ChemSusChem* 5, 988–994. doi:10.1002/cssc.201100604
- Logan, B.E., 2009. Exoelectrogenic bacteria that power microbial fuel cells. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 375–381. doi:10.1038/nrmicro2113
- Logan, B.E., Hamelers, B., Rozendal, R., Schröder, U., Keller, J., Freguia, S., Aelterman, P., Verstraete, W., Rabaey, K., 2006. Microbial Fuel Cells: Methodology and Technology†. *Environ. Sci. Technol.* 40, 5181–5192. doi:10.1021/es0605016
- Logan, B.E., Regan, J.M., 2006. Electricity-producing bacterial communities in microbial fuel cells. *Trends Microbiol.* 14, 512–518. doi:10.1016/j.tim.2006.10.003
- Logan, B.E., Wallack, M.J., Kim, K.-Y., He, W., Feng, Y., Saikaly, P.E., 2015. Assessment of Microbial Fuel Cell Configurations and Power Densities. *Environ. Sci. Technol. Lett.* 2, 206–214. doi:10.1021/acs.estlett.5b00180
- Lovley, D.R., 2011a. Powering microbes with electricity: direct electron transfer from electrodes to microbes. *Environ. Microbiol. Rep.* 3, 27–35. doi:10.1111/j.1758-2229.2010.00211.x
- Lovley, D.R., 2011b. Live wires: direct extracellular electron exchange for bioenergy and the bioremediation of energy-related contamination. *Energy Environ. Sci.* 4, 4896. doi:10.1039/c1ee02229f
- Lovley, D.R., 2008. The microbe electric: conversion of organic matter to electricity. *Curr. Opin. Biotechnol.* 19, 564–571. doi:10.1016/j.copbio.2008.10.005
- Lovley, D.R., 2006. Bug juice: harvesting electricity with microorganisms. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 497–508. doi:10.1038/nrmicro1442
- Lovley, D.R., Nevin, K., 2012. Microbial production of multi-carbon chemicals and fuels from water and carbon dioxide using electric current. US20120288898 A1.
- Lovley, D.R., Nevin, K.P., 2013. Electrobiocommodities: powering microbial production of fuels and commodity chemicals from carbon dioxide with electricity. *Curr. Opin. Biotechnol., Energy biotechnology • Environmental biotechnology* 24, 385–390. doi:10.1016/j.copbio.2013.02.012
- Ludwig, W., Strunk, O., Westram, R., Richter, L., Meier, H., Yadhukumar, Buchner, A., Lai, T., Steppi, S., Jobb, G., Förster, W., Brettske, I., Gerber, S., Ginhart, A.W., Gross, O., Grumann, S., Hermann, S., Jost, R., König, A., Liss, T., Lüßmann, R., May, M., Nonhoff, B., Reichel, B., Strehlow, R., Stamatakis, A., Stuckmann, N., Vilbig, A., Lenke, M., Ludwig, T., Bode, A., Schleifer, K.-H., 2004. ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res.* 32, 1363–1371. doi:10.1093/nar/gkh293
- Lu, L., Xing, D., Liu, B., Ren, N., 2012. Enhanced hydrogen production from waste activated sludge by cascade utilization of organic matter in microbial electrolysis cells. *Water Res.* 46, 1015–1026. doi:10.1016/j.watres.2011.11.073

- Lütgens, M., Gottschalk, G., 1982. Cell and ATP yields of *Citrobacter freundii* growing with fumarate and H<sub>2</sub> or formate in continuous culture. *J. Gen. Microbiol.* 128, 1915–1921. doi:10.1099/00221287-128-8-1915
- Lu, W.-Z., Teng, L.-H., Xiao, W.-D., 2004. Simulation and experiment study of dimethyl ether synthesis from syngas in a fluidized-bed reactor. *Chem. Eng. Sci., ISCRE18* 59, 5455–5464. doi:10.1016/j.ces.2004.07.031
- Magnuson, T.S., Isoyama, N., Hodges-Myerson, A.L., Davidson, G., Maroney, M.J., Geesey, G.G., Lovley, D.R., 2001. Isolation, characterization and gene sequence analysis of a membrane-associated 89 kDa Fe(III) reducing cytochrome c from *Geobacter sulfurreducens*. *Biochem. J.* 359, 147–152. doi:10.1042/bj3590147
- Mahadevan, R., Bond, D.R., Butler, J.E., Esteve-Núñez, A., Coppi, M.V., Palsson, B.O., Schilling, C.H., Lovley, D.R., 2006. Characterization of Metabolism in the Fe(III)-Reducing Organism *Geobacter sulfurreducens* by Constraint-Based Modeling. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 1558–1568. doi:10.1128/AEM.72.2.1558-1568.2006
- Manohar, A.K., Mansfeld, F., 2009. The internal resistance of a microbial fuel cell and its dependence on cell design and operating conditions. *Electrochimica Acta* 54, 1664–1670. doi:10.1016/j.electacta.2008.06.047
- Marshall, C.W., Ross, D.E., Fichot, E.B., Norman, R.S., May, H.D., 2013. Long-term Operation of Microbial Electrosynthesis Systems Improves Acetate Production by Autotrophic Microbiomes. *Environ. Sci. Technol.* 47, 6023–6029. doi:10.1021/es400341b
- Marshall, C.W., Ross, D.E., Fichot, E.B., Norman, R.S., May, H.D., 2012. Electrosynthesis of Commodity Chemicals by an Autotrophic Microbial Community. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 8412–8420. doi:10.1128/AEM.02401-12
- Martin, M.R., Fornero, J.J., Stark, R., Mets, L., Angenent, L.T., Martin, M.R., Fornero, J.J., Stark, R., Mets, L., Angenent, L.T., 2013. A Single-Culture Bioprocess of *Methanothermobacter thermautotrophicus* to Upgrade Digester Biogas by CO<sub>2</sub>-to-CH<sub>4</sub> Conversion with H<sub>2</sub>, A Single-Culture Bioprocess of *Methanothermobacter thermautotrophicus* to Upgrade Digester Biogas by CO<sub>2</sub>-to-CH<sub>4</sub> Conversion with H<sub>2</sub>. *Archaea* 2013, 2013, e157529. doi:10.1155/2013/157529, 10.1155/2013/157529
- Mei, X., Guo, C., Liu, B., Tang, Y., Xing, D., 2015. Shaping of bacterial community structure in microbial fuel cells by different inocula. *RSC Adv.* 5, 78136–78141. doi:10.1039/C5RA16382J
- Miksch, K., Cema, G., Corvini, P.F.-X., Felis, E., Sochacki, A., Surmacz-Górska, J., Wiszniowski, J., Żabczynski, S., 2013. R&D priorities in the field of sustainable remediation and purification of agro-industrial and municipal wastewater. *New Biotechnol.* doi:10.1016/j.nbt.2013.11.002
- Millo, D., 2012. Spectroelectrochemical analyses of electroactive microbial biofilms. *Biochem. Soc. Trans.* 40, 1284–1290. doi:10.1042/BST20120115
- Mock, J., Zheng, Y., Mueller, A.P., Ly, S., Tran, L., Segovia, S., Nagaraju, S., Köpke, M., Dürre, P., Thauer, R.K., 2015. Energy Conservation Associated with Ethanol Formation from H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> in *Clostridium autoethanogenum* Involving Electron Bifurcation. *J. Bacteriol.* 197, 2965–2980. doi:10.1128/JB.00399-15
- Mohammadi, M., Najafpour, G.D., Younesi, H., Lahijani, P., Uzir, M.H., Mohamed, A.R., 2011. Bioconversion of synthesis gas to second generation biofuels: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 15, 4255–4273. doi:10.1016/j.rser.2011.07.124
- Mohanakrishna, G., Seelam, J.S., Vanbroekhoven, K., Pant, D., 2015. An enriched electroactive homoacetogenic biocathode for the microbial electrosynthesis of acetate through carbon dioxide reduction. *Faraday Discuss.* doi:10.1039/C5FD00041F

- Möller, B., Oßmer, R., Howard, B.H., Gottschalk, G., Hippe, H., 1984. *Sporomusa*, a new genus of gram-negative anaerobic bacteria including *Sporomusa sphaeroides* spec. nov. and *Sporomusa ovata* spec. nov. *Arch. Microbiol.* 139, 388–396. doi:10.1007/BF00408385
- Morozan, A., Stamatina, I., Stamatina, L., Dumitru, A., Scott, K., 2007. Carbon electrodes for microbial fuel cells. *J. Optoelectron. Adv. Mater.* 9, 221.
- Munasinghe, P.C., Khanal, S.K., 2010. Biomass-derived syngas fermentation into biofuels: Opportunities and challenges. *Bioresour. Technol.* 101, 5013–5022. doi:10.1016/j.biortech.2009.12.098
- Munoz, L.D., Erable, B., Etcheverry, L., Riess, J., Basséguy, R., Bergel, A., 2010. Combining phosphate species and stainless steel cathode to enhance hydrogen evolution in microbial electrolysis cell (MEC). *Electrochem. Commun.* 12, 183–186. doi:10.1016/j.elecom.2009.11.017
- Nanchaiah, Y.V., Venkata Mohan, S., Lens, P.N.L., 2015. Metals removal and recovery in bioelectrochemical systems: A review. *Bioresour. Technol., Microbial Fuel Cells* 195, 102–114. doi:10.1016/j.biortech.2015.06.058
- Nevin, K.P., Hensley, S.A., Franks, A.E., Summers, Z.M., Ou, J., Woodard, T.L., Snoeyenbos-West, O.L., Lovley, D.R., 2011. Electrosynthesis of Organic Compounds from Carbon Dioxide Is Catalyzed by a Diversity of Acetogenic Microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 2882–2886. doi:10.1128/AEM.02642-10
- Nevin, K.P., Woodard, T.L., Franks, A.E., Summers, Z.M., Lovley, D.R., 2010. Microbial Electrosynthesis: Feeding Microbes Electricity To Convert Carbon Dioxide and Water to Multicarbon Extracellular Organic Compounds. *mBio* 1, e00103–10. doi:10.1128/mBio.00103-10
- Nie, H., Zhang, T., Cui, M., Lu, H., Lovley, D.R., Russell, T.P., 2013. Improved cathode for high efficient microbial-catalyzed reduction in microbial electrosynthesis cells. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 15, 14290. doi:10.1039/c3cp52697f
- Niessen, J., Harnisch, F., Rosenbaum, M., Schröder, U., Scholz, F., 2006. Heat treated soil as convenient and versatile source of bacterial communities for microbial electricity generation. *Electrochem. Commun.* 8, 869–873. doi:10.1016/j.elecom.2006.03.025
- Noyori, R., Hashiguchi, S., 1997. Asymmetric Transfer Hydrogenation Catalyzed by Chiral Ruthenium Complexes. *Acc. Chem. Res.* 30, 97–102.
- Oh, S., Logan, B.E., 2005. Hydrogen and electricity production from a food processing wastewater using fermentation and microbial fuel cell technologies. *Water Res.* 39, 4673–4682. doi:10.1016/j.watres.2005.09.019
- Ortiz-Martínez, V.M., Salar-García, M.J., de los Ríos, A.P., Hernández-Fernández, F.J., Egea, J.A., Lozano, L.J., 2015. Developments in microbial fuel cell modeling. *Chem. Eng. J.* 271, 50–60. doi:10.1016/j.cej.2015.02.076
- Pant, D., Arslan, D., Van Bogaert, G., Gallego, Y.A., De Wever, H., Diels, L., Vanbroekhoven, K., 2013. Integrated conversion of food waste diluted with sewage into volatile fatty acids through fermentation and electricity through a fuel cell. *Environ. Technol.* 34, 1935–1945. doi:10.1080/09593330.2013.828763
- Pant, D., Singh, A., Van Bogaert, G., Gallego, Y.A., Diels, L., Vanbroekhoven, K., 2011. An introduction to the life cycle assessment (LCA) of bioelectrochemical systems (BES) for sustainable energy and product generation: Relevance and key aspects. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 15, 1305–1313. doi:10.1016/j.rser.2010.10.005
- Pant, D., Van Bogaert, G., Diels, L., Vanbroekhoven, K., 2010. A review of the substrates used in microbial fuel cells (MFCs) for sustainable energy production. *Bioresour. Technol.* 101, 1533–1543. doi:10.1016/j.biortech.2009.10.017
- Park, D.H., Zeikus, J.G., 2000. Electricity Generation in Microbial Fuel Cells Using Neutral Red as an Electronophore. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1292–1297. doi:10.1128/AEM.66.4.1292-1297.2000

- Parot, S., Délia, M.-L., Bergel, A., 2008. Acetate to enhance electrochemical activity of biofilms from garden compost. *Electrochimica Acta* 53, 2737–2742. doi:10.1016/j.electacta.2007.10.059
- Parot, S., Necessian, O., Delia, M.-L., Achouak, W., Bergel, A., 2009. Electrochemical checking of aerobic isolates from electrochemically active biofilms formed in compost. *J. Appl. Microbiol.* 106, 1350–1359. doi:10.1111/j.1365-2672.2008.04103.x
- Patil, S.A., Harnisch, F., Koch, C., Hübschmann, T., Fetzer, I., Carmona-Martínez, A.A., Müller, S., Schröder, U., 2011. Electroactive mixed culture derived biofilms in microbial bioelectrochemical systems: The role of pH on biofilm formation, performance and composition. *Bioresour. Technol.* 102, 9683–9690. doi:10.1016/j.biortech.2011.07.087
- Patil, S.A., Surakasi, V.P., Koul, S., Ijmulwar, S., Vivek, A., Shouche, Y.S., Kapadnis, B.P., 2009. Electricity generation using chocolate industry wastewater and its treatment in activated sludge based microbial fuel cell and analysis of developed microbial community in the anode chamber. *Bioresour. Technol.* 100, 5132–5139. doi:10.1016/j.biortech.2009.05.041
- Paul, D., Austin, F.W., Arick, T., Bridges, S.M., Burgess, S.C., Dandass, Y.S., Lawrence, M.L., 2010. Genome Sequence of the Solvent-Producing Bacterium *Clostridium carboxidivorans* Strain P7T. *J. Bacteriol.* 192, 5554–5555. doi:10.1128/JB.00877-10
- Pearson, R.J., Eisaman, M.D., Turner, J.W.G., Edwards, P.P., Jiang, Z., Kuznetsov, V.L., Littau, K.A., di Marco, L., Taylor, S.R.G., 2012. Energy Storage via Carbon-Neutral Fuels Made From CO<sub>2</sub>, Water, and Renewable Energy. *Proc. IEEE* 100, 440–460. doi:10.1109/JPROC.2011.2168369
- Pfeffer, C., Larsen, S., Song, J., Dong, M., Besenbacher, F., Meyer, R.L., Kjeldsen, K.U., Schreiber, L., Gorby, Y.A., El-Naggar, M.Y., Leung, K.M., Schramm, A., Risgaard-Petersen, N., Nielsen, L.P., 2012. Filamentous bacteria transport electrons over centimetre distances. *Nature* 491, 218–221. doi:10.1038/nature11586
- Phillips, J.R., Klasson, K.T., Clausen, E.C., Gaddy, J.L., 1993. Biological production of ethanol from coal synthesis gas. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 39–40, 559–571. doi:10.1007/BF02919018
- Picard, C., Logette, S., Schrotter, J.C., Aimar, P., Remigy, J.C., 2012. Mass transfer in a membrane aerated biofilm. *Water Res.* 46, 4761–4769. doi:10.1016/j.watres.2012.05.056
- Pierce, E., Xie, G., Barabote, R.D., Saunders, E., Han, C.S., Detter, J.C., Richardson, P., Brettin, T.S., Das, A., Ljungdahl, L.G., Ragsdale, S.W., 2008. The complete genome sequence of *Moorella thermoacetica* (f. *Clostridium thermoaceticum*). *Environ. Microbiol.* 10, 2550–2573. doi:10.1111/j.1462-2920.2008.01679.x
- Pierra, M., 2013. Couplage de la fermentation sombre et de l'électrolyse microbienne pour la production d'hydrogène : formation et maintenance du biofilm électro-actif. Montpellier 2.
- Pisciotta, J.M., Zaybak, Z., Call, D.F., Nam, J.-Y., Logan, B.E., 2012. Enrichment of Microbial Electrolysis Cell Biocathodes from Sediment Microbial Fuel Cell Bioanodes. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 5212–5219. doi:10.1128/AEM.00480-12
- Pocaznoi, D., 2012. Optimisation d'anodes microbiennes à partir de lixiviat de sol pour la conception de piles à combustible microbiennes. Toulouse, INPT.
- Pocaznoi, D., Calmet, A., Etcheverry, L., Erable, B., Bergel, A., 2012a. Stainless steel is a promising electrode material for anodes of microbial fuel cells. *Energy Environ. Sci.* 5, 9645–9652. doi:10.1039/C2EE22429A
- Pocaznoi, D., Erable, B., Etcheverry, L., Delia, M.-L., Bergel, A., 2012b. Forming microbial anodes under delayed polarisation modifies the electron transfer network and decreases the polarisation time required. *Bioresour. Technol.* 114, 334–341. doi:10.1016/j.biortech.2012.03.042
- Pocaznoi, D., Erable, B., Etcheverry, L., Delia, M.-L., Bergel, A., 2012c. Towards an engineering-oriented strategy for building microbial anodes for microbial fuel cells. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 14, 13332–13343. doi:10.1039/C2CP42571H

- Potter, M.C., 1911. Electrical Effects Accompanying the Decomposition of Organic Compounds. Proc. R. Soc. Lond. Ser. B Contain. Pap. Biol. Character 84, 260–276.
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., Glockner, F.O., 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 41, D590–D596. doi:10.1093/nar/gks1219
- Rabaey, I., Ossieur, W., Verhaege, M., Verstraete, W., 2005. Continuous microbial fuel cells convert carbohydrates to electricity. *Water Sci. Technol. J. Int. Assoc. Water Pollut. Res.* 52, 515–523.
- Rabaey, K., Boon, N., Siciliano, S.D., Verhaege, M., Verstraete, W., 2004. Biofuel Cells Select for Microbial Consortia That Self-Mediate Electron Transfer. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 5373–5382. doi:10.1128/AEM.70.9.5373-5382.2004
- Rabaey, K., Girguis, P., Nielsen, L.K., 2011. Metabolic and practical considerations on microbial electrosynthesis. *Curr. Opin. Biotechnol., Energy biotechnology – Environmental biotechnology* 22, 371–377. doi:10.1016/j.copbio.2011.01.010
- Rabaey, K., Lissens, G., Siciliano, S.D., Verstraete, W., 2003. A microbial fuel cell capable of converting glucose to electricity at high rate and efficiency. *Biotechnol. Lett.* 25, 1531–1535.
- Rabaey, K., Rozendal, R.A., 2010. Microbial electrosynthesis — revisiting the electrical route for microbial production. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 706–716. doi:10.1038/nrmicro2422
- Rabaey, K., Van de Sompel, K., Maignien, L., Boon, N., Aelterman, P., Clauwaert, P., De Schamphelaire, L., Pham, H.T., Vermeulen, J., Verhaege, M., Lens, P., Verstraete, W., 2006. Microbial fuel cells for sulfide removal. *Environ. Sci. Technol.* 40, 5218–5224.
- Rabelo, S.C., Carrere, H., Maciel Filho, R., Costa, A.C., 2011. Production of bioethanol, methane and heat from sugarcane bagasse in a biorefinery concept. *Bioresour. Technol.* 102, 7887–7895. doi:10.1016/j.biortech.2011.05.081
- Reda, T., Plugge, C.M., Abram, N.J., Hirst, J., 2008. Reversible interconversion of carbon dioxide and formate by an electroactive enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 10654–10658. doi:10.1073/pnas.0801290105
- Reguera, G., McCarthy, K.D., Mehta, T., Nicoll, J.S., Tuominen, M.T., Lovley, D.R., 2005. Extracellular electron transfer via microbial nanowires. *Nature* 435, 1098–1101. doi:10.1038/nature03661
- Ren, L., Siegert, M., Ivanov, I., Pisciotta, J.M., Logan, B.E., 2013. Treatability studies on different refinery wastewater samples using high-throughput microbial electrolysis cells (MECs). *Bioresour. Technol.* 136, 322–328. doi:10.1016/j.biortech.2013.03.060
- Rice, C., Ha, S., Masel, R.I., Waszczuk, P., Wieckowski, A., Barnard, T., 2002. Direct formic acid fuel cells. *J. Power Sources* 111, 83–89. doi:10.1016/S0378-7753(02)00271-9
- Rimboud, M., Desmond-Le Quemener, E., Erable, B., Bouchez, T., Bergel, A., 2015. Multi-system Nernst–Michaelis–Menten model applied to bioanodes formed from sewage sludge. *Bioresour. Technol., Microbial Fuel Cells* 195, 162–169. doi:10.1016/j.biortech.2015.05.069
- Rimboud, M., Pocaznoi, D., Erable, B., Bergel, A., 2014. Electroanalysis of microbial anodes for bioelectrochemical systems: basics, progress and perspectives. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 16, 16349. doi:10.1039/C4CP01698J
- Ringeisen, B.R., Ray, R., Little, B., 2007. A miniature microbial fuel cell operating with an aerobic anode chamber. *J. Power Sources, IBA – HBC 2006 Selected papers from the INTERNATIONAL BATTERY ASSOCIATION & HAWAII BATTERY CONFERENCE 2006* Waikoloa, Hawaii, USA 9-12 January 2006 165, 591–597. doi:10.1016/j.jpowsour.2006.10.026
- Rodrigo, M.A., Cañizares, P., Lobato, J., Paz, R., Sáez, C., Linares, J.J., 2007. Production of electricity from the treatment of urban waste water using a microbial fuel cell. *J. Power Sources, CONAPPICE 2006 Selected Papers Presented at the 2nd National Congress on Fuel Cells (CONAPPICE 2006)*, Madrid, Spain, 18-20 October 2006. 169, 198–204. doi:10.1016/j.jpowsour.2007.01.054

- Roh, H., Ko, H.-J., Kim, D., Choi, D.G., Park, S., Kim, S., Chang, I.S., Choi, I.-G., 2011. Complete Genome Sequence of a Carbon Monoxide-Utilizing Acetogen, *Eubacterium limosum* KIST612. *J. Bacteriol.* 193, 307–308. doi:10.1128/JB.01217-10
- Rosenbaum, M.A., Franks, A.E., 2013. Microbial catalysis in bioelectrochemical technologies: status quo, challenges and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 509–518. doi:10.1007/s00253-013-5396-6
- Rosenbaum, M., Aulenta, F., Villano, M., Angenent, L.T., 2011. Cathodes as electron donors for microbial metabolism: Which extracellular electron transfer mechanisms are involved? *Bioresour. Technol.* 102, 324–333. doi:10.1016/j.biortech.2010.07.008
- Rousseau, R., 2013. Production de bio-hydrogène par électro-catalyse microbienne.
- Rousseau, R., Dominguez-Benetton, X., Délia, M.-L., Bergel, A., 2013. Microbial bioanodes with high salinity tolerance for microbial fuel cells and microbial electrolysis cells. *Electrochem. Commun.* 33, 1–4. doi:10.1016/j.elecom.2013.04.002
- Rousseau, R., Rimboud, M., Délia, M.-L., Bergel, A., Basséguy, R., 2015. Electrochemical characterization of microbial bioanodes formed on a collector/electrode system in a highly saline electrolyte. *Bioelectrochemistry, Special Issue on “Biological fuel cells”* 106, Part A, 97–104. doi:10.1016/j.bioelechem.2015.06.011
- Rousseau, R., Santaella, C., Achouak, W., Godon, J.-J., Bonnafous, A., Bergel, A., Délia, M.-L., 2014. Correlation of the Electrochemical Kinetics of High-Salinity-Tolerant Bioanodes with the Structure and Microbial Composition of the Biofilm. *ChemElectroChem* 1, 1966–1975. doi:10.1002/celec.201402153
- Rozendal, R.A., Hamelers, H.V.M., Buisman, C.J.N., 2006a. Effects of Membrane Cation Transport on pH and Microbial Fuel Cell Performance†. *Environ. Sci. Technol.* 40, 5206–5211. doi:10.1021/es060387r
- Rozendal, R.A., Hamelers, H.V.M., Euverink, G.J.W., Metz, S.J., Buisman, C.J.N., 2006b. Principle and perspectives of hydrogen production through biocatalyzed electrolysis. *Int. J. Hydrog. Energy* 31, 1632–1640. doi:10.1016/j.ijhydene.2005.12.006
- Rozendal, R.A., Hamelers, H.V.M., Rabaey, K., Keller, J., Buisman, C.J.N., 2008. Towards practical implementation of bioelectrochemical wastewater treatment. *Trends Biotechnol.* 26, 450–459. doi:10.1016/j.tibtech.2008.04.008
- Rozendal, R.A., Jeremiasse, A.W., Hamelers, H.V.M., Buisman, C.J.N., 2008. Hydrogen production with a microbial biocathode. *Environ. Sci. Technol.* 42, 629–634.
- Rozendal, R., Rabaey, K., 2010. Process for the Production of Chemicals. WO/2010/068994.
- Rustrian, E., Delgenes, J.P., Moletta, R., 1997. Phosphate Release and Uptake by Pure Cultures of *Acinetobacter* sp.: Effect of the Volatile Fatty Acids Concentration. *Curr. Microbiol.* 34, 43–48. doi:10.1007/s002849900142
- Saeed, H.M., Hussein, G.A., Yousef, S., Saif, J., Al-Asheh, S., Abu Fara, A., Azzam, S., Khawaga, R., Aidan, A., 2015. Microbial desalination cell technology: A review and a case study. *Desalination* 359, 1–13. doi:10.1016/j.desal.2014.12.024
- Saito, Y., Doi, Y., 1994. Microbial synthesis and properties of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) in *Comamonas acidovorans*. *Int. J. Biol. Macromol.* 16, 99–104.
- Santoro, C., Babanova, S., Atanassov, P., Li, B., Ieropoulos, I., Cristiani, P., 2013. High Power Generation by a Membraneless Single Chamber Microbial Fuel Cell (SCMFC) Using Enzymatic Bilirubin Oxidase (BOx) Air-Breathing Cathode. *J. Electrochem. Soc.* 160, H720–H726. doi:10.1149/2.058310jes
- Schampelaire, L.D., Cabezas, A., Marzorati, M., Friedrich, M.W., Boon, N., Verstraete, W., 2010. Microbial Community Analysis of Anodes from Sediment Microbial Fuel Cells Powered by

- Rhizodeposits of Living Rice Plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 2002–2008. doi:10.1128/AEM.02432-09
- Schiel-Bengelsdorf, B., Dürre, P., 2012. Pathway engineering and synthetic biology using acetogens. *FEBS Lett.* 586, 2191–2198. doi:10.1016/j.febslet.2012.04.043
- Schröder, U., Harnisch, F., Angenent, L.T., 2015. Microbial electrochemistry and technology: terminology and classification. *Energy Env. Sci* 8, 513–519. doi:10.1039/C4EE03359K
- Schrott, G.D., Bonanni, P.S., Robuschi, L., Esteve-Nuñez, A., Busalmen, J.P., 2011. Electrochemical insight into the mechanism of electron transport in biofilms of *Geobacter sulfurreducens*. *Electrochimica Acta, Selected Papers from the 61st ISE Meeting, Nice, France, 2010* 56, 10791–10795. doi:10.1016/j.electacta.2011.07.001
- Schuchmann, K., Müller, V., 2013. Direct and reversible hydrogenation of CO<sub>2</sub> to formate by a bacterial carbon dioxide reductase. *Science* 342, 1382–1385. doi:10.1126/science.1244758
- Sharma, M., Aryal, N., Sarma, P.M., Vanbroekhoven, K., Lal, B., Benetton, X.D., Pant, D., 2013. Bioelectrocatalyzed reduction of acetic and butyric acids via direct electron transfer using a mixed culture of sulfate-reducers drives electrosynthesis of alcohols and acetone. *Chem. Commun.* 49, 6495–6497. doi:10.1039/C3CC42570C
- Sharma, V., Kundu, P.P., 2010. Biocatalysts in microbial fuel cells. *Enzyme Microb. Technol.* 47, 179–188. doi:10.1016/j.enzmictec.2010.07.001
- Sim, J.H., Kamaruddin, A.H., Long, W.S., Najafpour, G., 2007. *Clostridium aceticum*—A potential organism in catalyzing carbon monoxide to acetic acid: Application of response surface methodology. *Enzyme Microb. Technol.* 40, 1234–1243. doi:10.1016/j.enzmictec.2006.09.017
- Sleutels, T.H.J.A., Hamelers, H.V.M., Rozendal, R.A., Buisman, C.J.N., 2009a. Ion transport resistance in Microbial Electrolysis Cells with anion and cation exchange membranes. *Int. J. Hydrog. Energy* 34, 3612–3620. doi:10.1016/j.ijhydene.2009.03.004
- Sleutels, T.H.J.A., Lodder, R., Hamelers, H.V.M., Buisman, C.J.N., 2009b. Improved performance of porous bio-anodes in microbial electrolysis cells by enhancing mass and charge transport. *Int. J. Hydrog. Energy* 34, 9655–9661. doi:10.1016/j.ijhydene.2009.09.089
- Soussan, L., Riess, J., Erable, B., Delia, M.-L., Bergel, A., 2013. Electrochemical reduction of CO<sub>2</sub> catalysed by *Geobacter sulfurreducens* grown on polarized stainless steel cathodes. *Electrochem. Commun.* 28, 27–30. doi:10.1016/j.elecom.2012.11.033
- Speers, A.M., Reguera, G., 2012. Electron Donors Supporting Growth and Electroactivity of *Geobacter sulfurreducens* Anode Biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 437–444. doi:10.1128/AEM.06782-11
- Spirito, C.M., Richter, H., Rabaey, K., Stams, A.J., Angenent, L.T., 2014. Chain elongation in anaerobic reactor microbiomes to recover resources from waste. *Curr. Opin. Biotechnol., Energy biotechnology • Environmental biotechnology* 27, 115–122. doi:10.1016/j.copbio.2014.01.003
- Srikanth, S., Maesen, M., Dominguez-Benetton, X., Vanbroekhoven, K., Pant, D., 2014. Enzymatic electrosynthesis of formate through CO<sub>2</sub> sequestration/reduction in a bioelectrochemical system (BES). *Bioresour. Technol., Special Issue: CESE 2013 & Special Issue: ICABB 2013* 165, 350–354. doi:10.1016/j.biortech.2014.01.129
- Steinbusch, K.J.J., Hamelers, H.V.M., Plugge, C.M., Buisman, C.J.N., 2011. Biological formation of caproate and caprylate from acetate: fuel and chemical production from low grade biomass. *Energy Env. Sci* 4, 216–224. doi:10.1039/C0EE00282H
- Steinbusch, K.J.J., Hamelers, H.V.M., Schaap, J.D., Kampman, C., Buisman, C.J.N., 2010. Bioelectrochemical Ethanol Production through Mediated Acetate Reduction by Mixed Cultures. *Environ. Sci. Technol.* 44, 513–517. doi:10.1021/es902371e
- Stephenson, M., Stickland, L.H., 1932. Hydrogenlyases. *Biochem. J.* 26, 712–724.

- Straub, M., Demler, M., Weuster-Botz, D., Dürre, P., 2014. Selective enhancement of autotrophic acetate production with genetically modified *Acetobacterium woodii*. *J. Biotechnol.* 178, 67–72. doi:10.1016/j.jbiotec.2014.03.005
- Strik, D.P.B.T.B., Hamelers (Bert), H.V.M., Snel, J.F.H., Buisman, C.J.N., 2008. Green electricity production with living plants and bacteria in a fuel cell. *Int. J. Energy Res.* 32, 870–876. doi:10.1002/er.1397
- Strik, D.P.B.T.B., Hamelers, H.V.M., Buisman, C.J.N., 2010. Solar Energy Powered Microbial Fuel Cell with a Reversible Bioelectrode. *Environ. Sci. Technol.* 44, 532–537. doi:10.1021/es902435v
- Su, M., Jiang, Y., Li, D., 2013. Production of acetate from carbon dioxide in bioelectrochemical systems based on autotrophic mixed culture. *J. Microbiol. Biotechnol.* 23, 1140–1146.
- Sydow, A., Krieg, T., Mayer, F., Schrader, J., Holtmann, D., 2014. Electroactive bacteria—molecular mechanisms and genetic tools. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 8481–8495. doi:10.1007/s00253-014-6005-z
- Tamaoka, J., Ha, D.-M., Komagata, K., 1987. Reclassification of *Pseudomonas acidovorans* den Dooren de Jong 1926 and *Pseudomonas testosteroni* Marcus and Talalay 1956 as *Comamonas acidovorans* comb. nov. and *Comamonas testosteroni* comb. nov., with an Emended Description of the Genus *Comamonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37, 52–59. doi:10.1099/00207713-37-1-52
- Tartakovsky, B., Manuel, M.-F., Neburchilov, V., Wang, H., Guiot, S.R., 2008. Biocatalyzed hydrogen production in a continuous flow microbial fuel cell with a gas phase cathode. *J. Power Sources* 182, 291–297. doi:10.1016/j.jpowsour.2008.03.062
- Tenca, A., Cusick, R.D., Schievano, A., Oberti, R., Logan, B.E., 2013. Evaluation of low cost cathode materials for treatment of industrial and food processing wastewater using microbial electrolysis cells. *Int. J. Hydrog. Energy* 38, 1859–1865. doi:10.1016/j.ijhydene.2012.11.103
- Torres, C.I., 2014. On the importance of identifying, characterizing, and predicting fundamental phenomena towards microbial electrochemistry applications. *Curr. Opin. Biotechnol., Energy biotechnology • Environmental biotechnology* 27, 107–114. doi:10.1016/j.copbio.2013.12.008
- Torres, C.I., Kato Marcus, A., Rittmann, B.E., 2008. Proton transport inside the biofilm limits electrical current generation by anode-respiring bacteria. *Biotechnol. Bioeng.* 100, 872–881. doi:10.1002/bit.21821
- Torres, C.I., Krajmalnik-Brown, R., Parameswaran, P., Marcus, A.K., Wanger, G., Gorby, Y.A., Rittmann, B.E., 2009. Selecting Anode-Respiring Bacteria Based on Anode Potential: Phylogenetic, Electrochemical, and Microscopic Characterization. *Environ. Sci. Technol.* 43, 9519–9524. doi:10.1021/es902165y
- Tran, H.-T., Ryu, J.-H., Jia, Y.-H., Oh, S.-J., Choi, J.-Y., Park, D.-H., Ahn, D.-H., 2010. Continuous bioelectricity production and sustainable wastewater treatment in a microbial fuel cell constructed with non-catalyzed granular graphite electrodes and permeable membrane. *Water Sci. Technol.* 61, 1819. doi:10.2166/wst.2010.140
- Tremblay, P.-L., Höglund, D., Koza, A., Bonde, I., Zhang, T., 2015. Adaptation of the autotrophic acetogen *Sporomusa ovata* to methanol accelerates the conversion of CO<sub>2</sub> to organic products. *Sci. Rep.* 5, 16168. doi:10.1038/srep16168
- Tremblay, P.-L., Zhang, T., 2015. Electrifying microbes for the production of chemicals. *Front. Microbiol.* 6, 201. doi:10.3389/fmicb.2015.00201
- Van Eerten-Jansen, M.C.A.A., Heijne, A. Ter, Grootcholten, T.I.M., Steinbusch, K.J.J., Sleutels, T.H.J.A., Hamelers, H.V.M., Buisman, C.J.N., 2013. Bioelectrochemical Production of Caproate and Caprylate from Acetate by Mixed Cultures. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 1, 513–518. doi:10.1021/sc300168z
- Vega, C.A., Fernández, I., 1987. Mediating effect of ferric chelate compounds in microbial fuel cells with *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus lactis*, and *Erwinia dissolvens*. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 17, 217–222. doi:10.1016/0302-4598(87)80026-0



- Venkata Mohan, S., Velvizhi, G., Annie Modestra, J., Srikanth, S., 2014a. Microbial fuel cell: Critical factors regulating bio-catalyzed electrochemical process and recent advancements. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 40, 779–797. doi:10.1016/j.rser.2014.07.109
- Venkata Mohan, S., Velvizhi, G., Vamshi Krishna, K., Lenin Babu, M., 2014b. Microbial catalyzed electrochemical systems: A bio-factory with multi-facet applications. *Bioresour. Technol.*, Special Issue: CESE 2013 & Special Issue: ICABB 2013 165, 355–364. doi:10.1016/j.biortech.2014.03.048
- Villano, M., Aulenta, F., Beccari, M., Majone, M., 2012. Start-up and Performance of an Activated Sludge Bioanode in Microbial Electrolysis Cells. *Chem. Eng. Trans.* 27, 109–114. doi:10.3303/CET1227019
- Wagner, M., Loy, A., Nogueira, R., Purkhold, U., Lee, N., Daims, H., 2002. Microbial community composition and function in wastewater treatment plants. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81, 665–680. doi:10.1023/A:1020586312170
- Wang, H., Luo, H., Fallgren, P.H., Jin, S., Ren, Z.J., 2015a. Bioelectrochemical system platform for sustainable environmental remediation and energy generation. *Biotechnol. Adv.* 33, 317–334. doi:10.1016/j.biotechadv.2015.04.003
- Wang, H., Park, J.-D., Ren, Z.J., 2015b. Practical Energy Harvesting for Microbial Fuel Cells: A Review. *Environ. Sci. Technol.* 49, 3267–3277. doi:10.1021/es5047765
- Wang, H., Ren, Z.J., 2014. Bioelectrochemical metal recovery from wastewater: A review. *Water Res.* 66, 219–232. doi:10.1016/j.watres.2014.08.013
- Wang, H., Ren, Z.J., 2013. A comprehensive review of microbial electrochemical systems as a platform technology. *Biotechnol. Adv.* 31, 1796–1807. doi:10.1016/j.biotechadv.2013.10.001
- Wang, W., Wang, S., Ma, X., Gong, J., 2011. Recent advances in catalytic hydrogenation of carbon dioxide. *Chem. Soc. Rev.* 40, 3703–3727. doi:10.1039/C1CS15008A
- Wei, J., Liang, P., Huang, X., 2011. Recent progress in electrodes for microbial fuel cells. *Bioresour. Technol.* 102, 9335–9344. doi:10.1016/j.biortech.2011.07.019
- Wendt, H., Kreysa, G., 1999. *Electrochemical Engineering: Science and Technology in Chemical and Other Industries*. Springer Science & Business Media.
- Wieringa, K., 1936. Over het verdwijnen van waterstofen koolzuur onder anaerobe voorwaarden; voortzetting van een onderzoek van wijlen Prof. Dr. Ir. N.L. Söhngen. *Antonie Van Leeuwenhoek J Microbiol Serol* 3, 263–273.
- Williams, R., Crandall, R.S., Bloom, A., 1978. Use of carbon dioxide in energy storage. *Appl. Phys. Lett.* 33, 381–383. doi:10.1063/1.90403
- Wood, H.G., 1991. Life with CO or CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub> as a source of carbon and energy. *FASEB J.* 5, 156–163.
- Woods, D.D., 1936. Hydrogenlyases. *Biochem. J.* 30, 515–527.
- Worden, R.M., Grethlein, A.J., Zeikus, J.G., Datta, R., 1989. Butyrate production from carbon monoxide by *Butyrivibrio methylotrophicus*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 20-21, 687–698. doi:10.1007/BF02936517
- Wu, W.-M., Hickey, R.F., Jain, M.K., Zeikus, J.G., 1993. Energetics and regulations of formate and hydrogen metabolism by *Methanobacterium formicicum*. *Arch. Microbiol.* 159, 57–65. doi:10.1007/BF00244265
- Xafenias, N., Anunobi, M.O., Mapelli, V., 2015. Electrochemical startup increases 1,3-propanediol titers in mixed-culture glycerol fermentations. *Process Biochem.* 50, 1499–1508. doi:10.1016/j.procbio.2015.06.020
- Xie, X., Criddle, C., Cui, Y., 2015. Design and fabrication of bioelectrodes for microbial bioelectrochemical systems. *Energy Env. Sci* 8, 3418–3441. doi:10.1039/C5EE01862E
- Xie, X., Hu, L., Pasta, M., Wells, G.F., Kong, D., Criddle, C.S., Cui, Y., 2011. Three-Dimensional Carbon Nanotube-Textile Anode for High-Performance Microbial Fuel Cells. *Nano Lett.* 11, 291–296. doi:10.1021/nl103905t

- Xie, X., Yu, G., Liu, N., Bao, Z., Criddle, C.S., Cui, Y., 2012. Graphene–sponges as high-performance low-cost anodes for microbial fuel cells. *Energy Environ. Sci.* 5, 6862–6866. doi:10.1039/C2EE03583A
- Yang, N., Wang, R., 2015. Sustainable technologies for the reclamation of greenhouse gas CO<sub>2</sub>. *J. Clean. Prod., Carbon Emissions Reduction: Policies, Technologies, Monitoring, Assessment and Modeling* 103, 784–792. doi:10.1016/j.jclepro.2014.10.025
- Yang, Q., Zhao, H., Liang, H., 2015. Denitrification of overlying water by microbial electrochemical snorkel. *Bioresour. Technol.* 197, 512–514. doi:10.1016/j.biortech.2015.08.127
- Yan, X., Guo, H., Yang, D., Qiu, S., Yao, X., 2014. Catalytic Hydrogenation of Carbon Dioxide to Fuels. *Curr. Org. Chem.* 18, 1335–1345.
- Ye, Z., Zhang, B., Liu, Y., Wang, Z., Tian, C., 2015. Continuous electricity generation with piggery wastewater treatment using an anaerobic baffled stacking microbial fuel cell. *Desalination Water Treat.* 55, 2079–2087. doi:10.1080/19443994.2014.930702
- Yong, Y.-C., Yu, Y.-Y., Zhang, X., Song, H., 2014. Highly Active Bidirectional Electron Transfer by a Self-Assembled Electroactive Reduced-Graphene-Oxide-Hybridized Biofilm. *Angew. Chem. Int. Ed.* 53, 4480–4483. doi:10.1002/anie.201400463
- Younesi, H., Najafpour, G., Ku Ismail, K.S., Mohamed, A.R., Kamaruddin, A.H., 2008. Biohydrogen production in a continuous stirred tank bioreactor from synthesis gas by anaerobic photosynthetic bacterium: *Rhodospirillum rubrum*. *Bioresour. Technol.* 99, 2612–2619. doi:10.1016/j.biortech.2007.04.059
- Younesi, H., Najafpour, G., Mohamed, A.R., 2005. Ethanol and acetate production from synthesis gas via fermentation processes using anaerobic bacterium, *Clostridium ljungdahlii*. *Biochem. Eng. J.* 27, 110–119. doi:10.1016/j.bej.2005.08.015
- Zaybak, Z., Pisciotta, J.M., Tokash, J.C., Logan, B.E., 2013. Enhanced start-up of anaerobic facultatively autotrophic biocathodes in bioelectrochemical systems. *J. Biotechnol.* 168, 478–485. doi:10.1016/j.jbiotec.2013.10.001
- Zhang, F., Ding, J., Zhang, Y., Chen, M., Ding, Z.-W., van Loosdrecht, M.C.M., Zeng, R.J., 2013. Fatty acids production from hydrogen and carbon dioxide by mixed culture in the membrane biofilm reactor. *Water Res.* 47, 6122–6129. doi:10.1016/j.watres.2013.07.033
- Zhang, T., Nie, H., Bain, T.S., Lu, H., Cui, M., Snoeyenbos-West, O.L., Franks, A.E., Nevin, K.P., Russell, T.P., Lovley, D.R., 2013. Improved cathode materials for microbial electrosynthesis. *Energy Env. Sci.* 6, 217–224. doi:10.1039/C2EE23350A
- Zhang, Y., Angelidaki, I., 2014. Microbial electrolysis cells turning to be versatile technology: Recent advances and future challenges. *Water Res.* 56, 11–25. doi:10.1016/j.watres.2014.02.031
- Zhi, W., Ge, Z., He, Z., Zhang, H., 2014. Methods for understanding microbial community structures and functions in microbial fuel cells: A review. *Bioresour. Technol.* 171, 461–468. doi:10.1016/j.biortech.2014.08.096
- Zhou, M., Chi, M., Luo, J., He, H., Jin, T., 2011. An overview of electrode materials in microbial fuel cells. *J. Power Sources* 196, 4427–4435. doi:10.1016/j.jpowsour.2011.01.012
- Zhou, M., Wang, H., Hassett, D.J., Gu, T., 2013. Recent advances in microbial fuel cells (MFCs) and microbial electrolysis cells (MECs) for wastewater treatment, bioenergy and bioproducts. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 88, 508–518. doi:10.1002/jctb.4004
- Zhu, X.-G., Long, S.P., Ort, D.R., 2008. What is the maximum efficiency with which photosynthesis can convert solar energy into biomass? *Curr. Opin. Biotechnol., Food biotechnology / Plant biotechnology* 19, 153–159. doi:10.1016/j.copbio.2008.02.004
- Zhu, X., Yates, M.D., Hatzell, M.C., Ananda Rao, H., Saikaly, P.E., Logan, B.E., 2013. Microbial Community Composition Is Unaffected by Anode Potential. *Environ. Sci. Technol.* doi:10.1021/es404690q

Zhu, X., Yates, M.D., Logan, B.E., 2012. Set potential regulation reveals additional oxidation peaks of *Geobacter sulfurreducens* anodic biofilms. *Electrochem. Commun.* 22, 116–119. doi:10.1016/j.elecom.2012.06.013

# Annexes



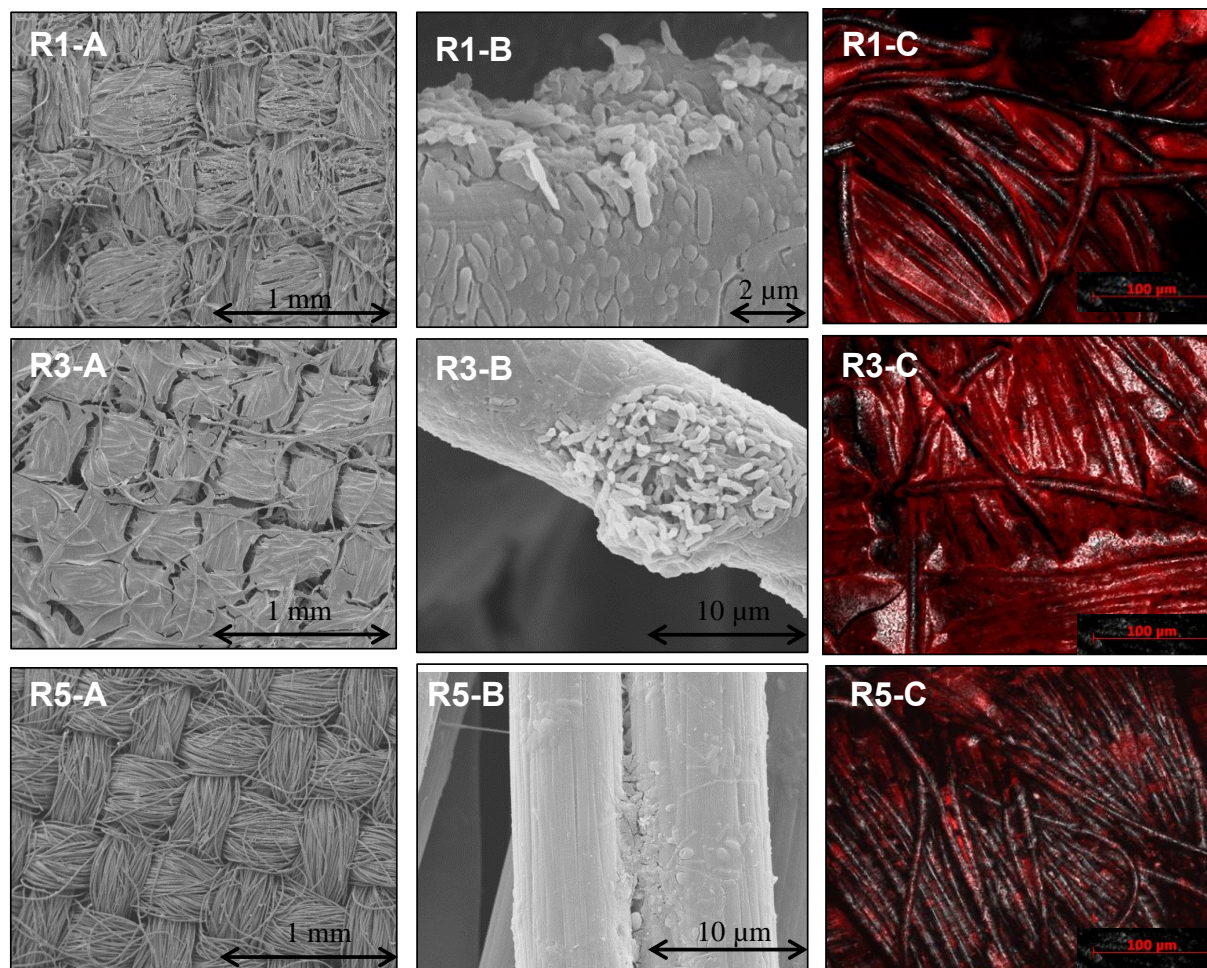
**Liste des annexes :**

Annexe 1 : Supplementary data de la publication 1

Annexe 2 : Manuscrit de la publication 3 (Protons accumulation during anodic phase turned to advantage for oxygen reduction during cathodic phase in reversible bioelectrodes)

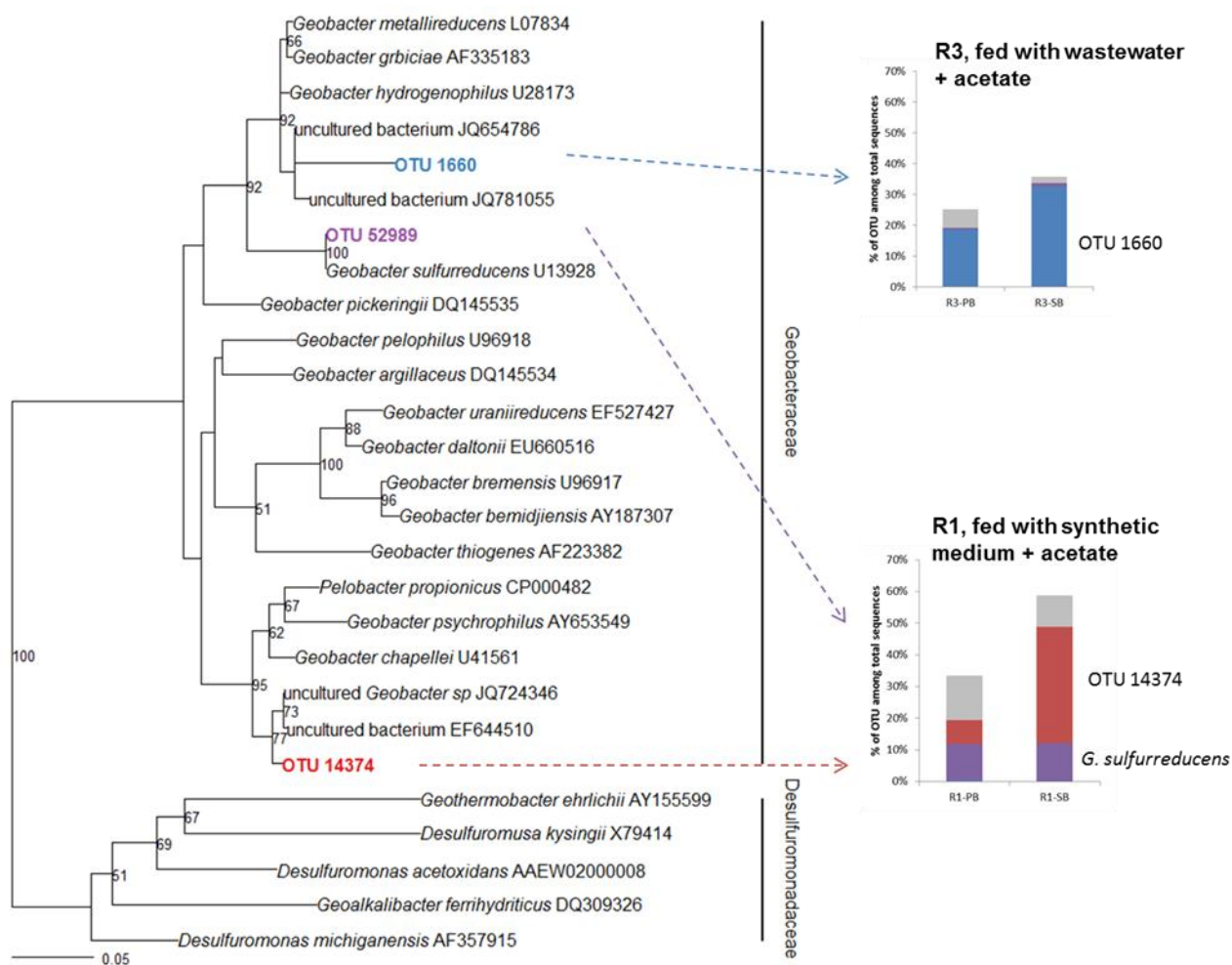
**Annexe 1 : Supplementary data de la publication 1**

**Figure S1:** Scanning electron micrographs of secondary bioanode formed in synthetic medium inoculated with activated sludge, magnification 100-fold (R1-A), magnification 20 000-fold (R1-B); secondary biofilm formed in wastewater inoculated with activated sludge, magnification 100-fold (R3-A), magnification 10 000-fold (R3-B); secondary biofilm formed in wastewater, magnification 100-fold (R5-A), magnification 10 000-fold (R5-B). Epifluorescence images with acridine orange staining (R1-C ; R3-C ; R5-C).



**Annexe 1 : Supplementary data de la publication 1**

**Figure S2:** Maximum likelihood phylogeny of bacterial 16S rRNA sequences. The scale bar represents the average number of substitutions per site, and numbers at nodes indicate statistical support calculated by non-parametric bootstrapping.





**Annexe 1 : Supplementary data de la publication 1****Table S1:** Diversity indexes for primary (PB) and secondary bioanodes (SB) and corresponding primary (PSn) and secondary supernatants (SSn).

Sample	OTU Numbers	chao1	Shannon	Simpson
PB1	5866	9740	6.76	0.94
PSn1	10918	16263	9.34	0.99
PB3	5821	9402	6.99	0.92
PSn3	7779	12326	9.29	0.99
PB5	11090	17346	8.36	0.98
PSn5	6869	11359	7.49	0.96
SB1	2586	4750	4.89	0.85
SSn1	5002	9226	5.52	0.87
SB3	3142	5586	5.73	0.88
SSn3	5930	9751	7.22	0.96
SB5	9334	14972	6.67	0.84
SSn5	6454	10053	7.48	0.94

## **Annexe 2 : Manuscrit de la publication 3**

### **Protons accumulation during anodic phase turned to advantage for oxygen reduction during cathodic phase in reversible bioelectrodes**

Elise Blanchet, Sophie Pécastaings, Benjamin Erable, Christine Roques and Alain Bergel

*Received 28 July 2014, Received in revised form 15 September 2014, Accepted 16 September 2014*

*Bioresource Technology 173 (2014) 224-230*

#### **Abstract.**

Reversible bioelectrodes were designed by alternating acetate and oxygen supply. It was demonstrated that the protons produced and accumulated inside the biofilm during the anodic phase greatly favoured the oxygen reduction reaction when the electrode was switched to become the biocathode. Protons accumulation, which hindered the bioanode operation, thus became an advantage for the biocathode. The bioanodes, formed from garden compost leachate under constant polarization at -0.2 V vs. SCE, were able to support long exposure to forced aeration, with only a slight alteration of their anodic efficiency. They produced a current density of  $16 \pm 1.7$  A/m<sup>2</sup> for acetate oxidation and up to -0.4 A/m<sup>2</sup> for oxygen reduction. Analysis of the microbial communities by 16S rRNA pyrosequencing revealed strong selection of Chloroflexi ( $49 \pm 1$  %), which was not observed for conventional bioanodes not exposed to oxygen. Chloroflexi were found as the dominant phylum of electroactive biofilms for the first time.

**Keywords:** Microbial fuel cell, Biocathode, Reversible electrode, Oxygen reduction, Chloroflexi.

#### **1. Introduction**

Microbial fuel cells (MFCs) are seen as a promising technology for producing electricity directly from the oxidation of various organic compounds that can be obtained at low cost and in sustainable way. The most widely studied MFC architectures are composed of a microbial anode associated with an abiotic oxygen-reduction cathode. Unfortunately, abiotic air-cathodes still give a rather low rate of oxygen reduction at the neutral pH values that are required for the microbial anodes. This problem remains an essential stumbling block in the development of large MFCs. Up to now, the power density provided by MFCs equipped with abiotic oxygen-reducing air cathodes has levelled off around 7 W/m<sup>2</sup> (Fan et al., 2008; Borole et al., 2011; Pocaznoi et al., 2012b) for small-sized cells and decreases drastically as soon as the system size increases (Santoro et al., 2013).

An appealing alternative solution would be to implement oxygen-reduction microbial cathodes (Erable et al., 2012), which have already proved their remarkable efficiency (Carbajosa et al., 2010). However, a major drawback of associating a microbial anode with a microbial cathode is that a pH gradient is

established between the anode and cathode compartments. The pH gradient is the result of the production of protons at the anode as, for instance, in the widely used oxidation of acetate:



coupled with the production of hydroxide ions by oxygen reduction at the cathode:



Ideally, electro-neutrality should be maintained by proton migration to the cathode compartment and hydroxide ion migration to the anode compartment, but the diffusion of these ions is too slow with respect to the other ions contained in the electrolytes (sodium, potassium, chloride, acetate, phosphate and carbonate ionic species, etc.) and proton migration plays only a minor role in charge-balancing. The pH gradient has been identified as a major source of losses in the performance of microbial electrochemical systems (Harnisch and Schröder, 2009). Membrane-less cells may provide part of the solution by decreasing the hindrance to ionic transport but, in return, they reduce electron recovery because of the direct aerobic conversion of the organic fuel due to oxygen diffusion from the cathode side (René A. Rozendal et al., 2008). The use of a chemical buffer can compensate for the deficiency of proton transport (Torres et al., 2008), but it would be costly on a large scale. Freguia et al. (2008) addressed the problem by proposing a loop configuration: the effluent from the anode compartment was directed to the cathode compartment. This operating mode largely solved the problem of the pH gradient and it also improved the cathode performance compared with an abiotic oxygen cathode. However, such a system requires careful operation to avoid excessive chemical oxygen demand (COD) entering the cathode, which would cause the growth of aerobic heterotrophs and eventually restrict oxygen supply to the cathode biofilm.

Cheng et al. (2010) proposed the use of a reversible bioelectrode to avoid the problem of pH gradient and to improve the oxygen reduction catalysis. They showed that it was possible for a biofilm formed from activated sludge to catalyze both the anodic substrate oxidation and the cathodic oxygen reduction. The proposed MFC was operated in sequential phases by supplying acetate and oxygen to the electrode alternately. This system offers the advantage of avoiding growth of aerobic heterotrophic bacteria by separating acetate and oxygen supplies. Moreover, the protons accumulated during the anodic reaction do not need to be transported out of the biofilm: they stimulate the subsequent cathodic reaction. The concept of a reversible electrode has also been proposed by Strik et al. (2010), who used a reversible electrode inoculated with sludge to design a solar energy powered MFC. More recently, Li et al. (2014) have described a dual bioelectrode MFC with periodic reversal of polarity which results in a 36% increase in power density compared to that produced by the MFC without polarity reversal.

Reversible microbial anodes may be a very good solution to overcome the problem of pH gradient. The proton accumulation that occurs during the anodic phase (reaction 1) prepares favorable conditions for oxygen reduction during the cathodic phase (reaction 2). Despite their obvious advantages, studies of such reversible microbial electrodes remain rare and, in particular, little is known about the microbial composition of such intriguing biofilms, which are able to ensure an anaerobic anode respiring process

and catalysis of oxygen reduction alternately. No comprehensive description of the microbial population of reversible electroactive biofilms has been published so far.

The purpose of the present work was to assess the capability of garden compost to form such reversible microbial electrodes. This inoculum source has already led to very efficient microbial anodes (Ketep et al., 2014) and has also been shown to contain bacterial strains (members of *Enterobacter* and *Pseudomonas* genera) with the ability to catalyze the electrochemical reduction of oxygen (Parot et al., 2009). Consequently, this inoculum was a priori an excellent candidate to form reversible microbial electrodes and the results presented here confirm this hypothesis. The reversible microbial electrodes formed here were then used for the in-depth analysis of the microbial communities. From a practical point of view, reversible bioelectrodes made from a soil inoculum may also open up interesting possibilities for designing plant-MFCs (Strik et al., 2008).

All experiments were performed in a 3-electrode set-up so as to accurately characterize the electrode behaviour. Actually, in whole MFC set-ups, the potential of the working electrode vary considerably, which adds a source of deviation between one experimental device and another. Since the reversible bioelectrode concept was still in its infancy, it was chosen to work in well-controlled analytical conditions here, in order to focus on the electrode behaviour, rather than repeating a proof of concept with a whole MFC set-up, as already reported (Freguia et al., 2008; Li et al., 2014). Following this line of thought, electrodes with small surface areas were implemented in large volumes of electrolyte to ensure experimental conditions that favoured electrode performance (Rimboud et al., 2014). The bioelectrodes were formed under constant polarization at  $-0.2$  V vs. SCE. Their electrochemical properties were characterized by cyclic voltammetry and their microbial communities were analysed by 16S rRNA pyrosequencing.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1. Medium and inoculum : garden compost leachate**

Commercial garden compost was used as a source of electroactive microorganisms. 1.5 L of an aqueous solution containing 60 mM KCl was mixed with 1 L of garden compost and stirred for 24 hours at room temperature. The mixture was then percolated through a felt cloth to eliminate non-soluble macroparticules. The final leachate was used as the electrolyte in the electrochemical reactors after supplementation with 20 mM acetate. The initial pH was 7.8 and the experiments were performed at 40°C as already optimized by Cercado-Quezada et al. (2010).

### **2.2. Electrochemical set-up**

Experiments were performed in single compartment electrochemical reactors equipped with a 3-electrode system composed of an 8 cm<sup>2</sup> carbon cloth working electrode (PaxiTech, Grenoble) connected with a platinum wire, a saturated calomel reference electrode (SCE, Radiometer Analytical, +0.241 V vs. SHE) and an 8 cm<sup>2</sup> Pt grid as auxiliary electrode. The working electrode was located far (around 10 cm) from the auxiliary electrode but as close as possible (around 0.5 cm) to the reference electrode. Each reactor contained 600 mL of compost leachate. The working electrodes were polarized at  $-0.20$  V vs. SCE using a multi-channel VSP potentiostat (Bio-Logic SA, software EC-Lab) and the current was recorded

every 10 minutes. Chronoamperometry was sometimes interrupted to perform cyclic voltammetry at low scan rate (1 mV/s) in the range -0.6 to +0.3 V vs. SCE.

Coulombic efficiencies (CE) were calculated as the ratio of the experimental electric charge passing through the system, obtained by integrating the current over time, and the theoretical charge calculated by assuming that 1 mole of acetate produces 8 moles of electrons according to the oxidation reaction (1).

### **2.3. Development of the reversible bioelectrode**

Two experiments were systematically carried out in parallel (duplicates) to validate the reproducibility of the results. In the running of the electrochemical reactors, periods of acetate supply alternate with periods of oxygen supply. Acetate was added as a pulse of 3 mL of 4 M sodium acetate solution. Oxygen was supplied by forced aeration of the solution.

Step 1 (anode, day 1 to day 10) intended to form the microbial anode with two successive pulses of 20 mM acetate; the second pulse was added when the current had returned to zero because of acetate depletion. The acetate concentration was monitored by an enzymatic kit (K-ACETAK, Megazyme).

Step 2 (cathode, day 10 to day 24) corresponded to the intermittent introduction of air. To confirm the oxygen dependence of the cathodic current recorded on the microbial electrode, air was not introduced continuously during this phase.

Step 3 (anode, day 24 to day 34) started with the addition of the third 20 mM pulse of acetate.

Step 4 (cathode, day 34 to day 44) began after the acetate from step 3 was totally depleted. Air was then introduced continuously from day 34 to day 38. Aeration was turned off from day 38 to day 42 and the reactor was left open to the air. Finally, a new period of forced aeration was tested from day 42 to the end (day 44).

### **2.4. Bacterial community analyses**

The sample of garden compost leachate used to fill the reactors was referred as T0-inoc. At the end of the experiments (day 44), samples of 2 mL were collected from both reactors and referred as Bulk 1 and Bulk 2. At the end of the experiments, the biofilms were also collected from the electrodes by sonication in 2 mL of distilled water (3 minutes at a power level of 80W), and referred as Biofilm 1 and 2. Cells were concentrated by centrifugation and re-suspended in 500  $\mu$ L of water. The DNA was extracted from 250  $\mu$ L of each sample using the MOBIO PowerSoil<sup>®</sup> DNA Isolation kit according to the manufacturer's instructions.

DNA extractions were also performed with the PowerBiofilm<sup>®</sup> DNA Isolation Kit (MOBIO) and pyrosequencing results confirmed the consistency of the DNA extractions achieved with the 2 kits. Both kits are able to extract good quality DNA in a reproducible manner.

DNA concentrations and purity were checked by reading the absorbance at 260 and 280 nm. Samples were sent to Research and Testing Laboratory (RTLab - Texas, USA) where 454 pyro-sequencing (Roche)

was performed with primers 28F (5'- GAG TTT GAT YMT GGC TC -3') and 519R (5'- GWA TTA CCG CGG CKG CTG -3').

Microbial diversity screening and data processing were carried out at Research and Testing Laboratory (Lubbock TX) using methods described previously (Dowd et al., 2008). Raw data were screened and trimmed based on quality scores. Sequences shorter than 250 bp were removed. Reads were classified into clusters using USEARCH (Edgar, 2010). After sequencing, individual collections of sequences were depleted of chimeras using UCHIME (Edgar et al., 2011).

Tentative identification of bacterial species was performed using BLASTN in comparison with a curated high-quality 16S rRNA gene database from the National Center for Biotechnology Information (NCBI). The compiled data were used to determine the relative percentages of bacteria for each individual sample. Sequences >97% identity to known or well-characterized 16S rRNA sequences (<3% divergence) were resolved at the species level, between 95% and 97% at the genus level, between 90% and 95% at the family level, and between 80% and 90% at the order level.

To assess the diversity of the microbial population in the bulks and biofilms of the study, Simpson's reciprocal indexes were calculated from the number of operational taxonomic units (OTUs) assigned at the species level, according to the equation

$$\text{Simpson} = 1 - \frac{\sum_{i=1}^S ni*(ni-1)}{N*(N-1)} \quad (3)$$

where  $n_i$  is the number of sequences belonging to the  $i$ th OTU (>97% identity) and  $N$  is the total number of sequences that remain for the sample after quality control.  $S$  is the number of OTUs.

### 3. Results and discussion

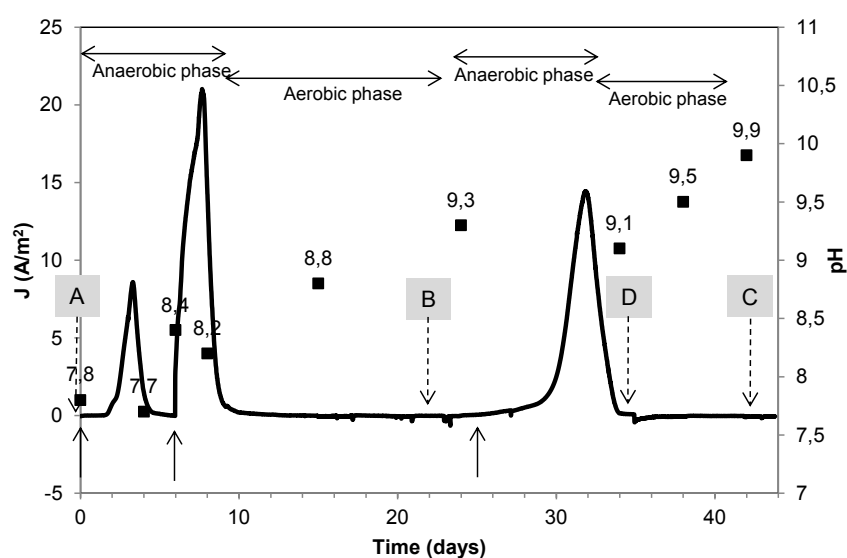
#### 3.1. Bioanode formation and consequences of aerobic phase on the bioanode performance

Electrochemically active biofilms were initially formed in the presence of acetate on the surface of carbon cloth electrodes immersed in garden compost leachate and polarized at -0.20 V vs. SCE. After 3 days of polarization, current densities started to increase and reached a maximum of  $7.6 \pm 0.7 \text{ A/m}^2$  and then fell down again to zero because of acetate depletion (Figure 1). On the 6<sup>th</sup> day, a second acetate injection (20 mM) caused the current to increase to  $19.3 \pm 1.4 \text{ A/m}^2$  in less than 2 days. To obtain a mature bioanode, i.e. an anode giving fairly stable maximum current densities, it is considered that 4 successive acetate additions are necessary (Pocaznoi et al., 2012a). Only two acetate pulses were applied here as the choice had been made not to allow the biofilm to reach full maturity, in order to have the highest chance of adapting a young biofilm to aerobic conditions. Forced aeration was started in the reactor on the 10<sup>th</sup> day when the oxidative current was close to zero. The first cathodic phase lasted for 14 days.

From day 24, aeration was stopped and acetate 20 mM was added to the reactor. Oxidation current started to increase after  $3 \pm 1$  days of latency. The lag-phase for this third pulse was longer than the previous one, because some time was necessary for the microorganisms to re-adapt from aerobic conditions to the anode-respiring function. Then, current density reached a maximum of  $16 \pm 1.7 \text{ A/m}^2$ .

After air exposure, the current density was lower than could have been expected considering the current density obtained with the second pulse (average of  $19.3 \text{ A/m}^2$ ). It has been previously reported that the current density increased with a third pulse of acetate, due to the biofilm growth (Cercado et al., 2013).

The aerobic phase affected the bioanode performance slightly by increasing the lag-time before current generation and by decreasing the maximum current density a little. It may be speculated that the microbial community was impacted by the death of the strictly anaerobic bacteria. Nevertheless, the two-week aerobic phase did not compromise the capacity of the biofilm to achieve efficient acetate oxidation through anode respiration. To our knowledge, this is the first time that such a reversible bioelectrode has been designed using an inoculum coming from soil, and it provided good robust performance. Current density of  $16 \text{ A/m}^2$  was reached for acetate oxidation, even after a considerable aerobic period.



**Figure 1: Chronoamperometry and pH values in reactor 1. Current density recorded on carbon cloth electrode polarized at -0.20 V vs. SCE in a compost leachate supplemented with 20 mM of acetate. Letters A, B, C and D with dotted arrows correspond to the voltammograms of Figure 3 and 5. Plain arrows indicate 20 mM acetate pulse.**

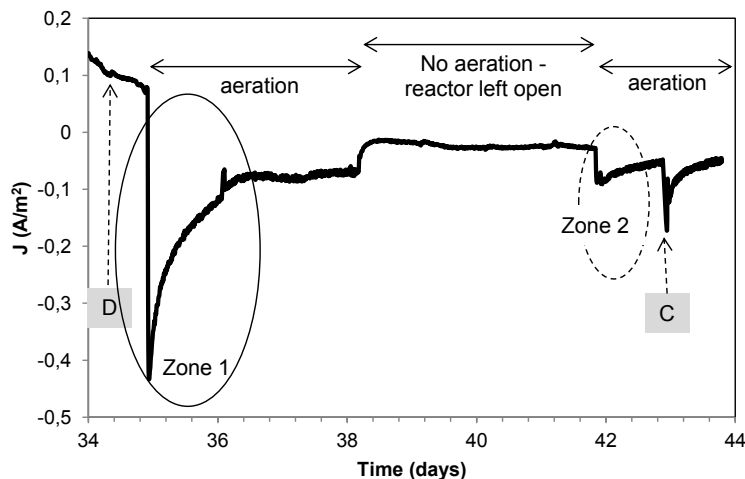
On figure 1 is also displayed measured pH in the solution. General trend is alcalinization throughout the experiment (from 7.8 to 9.9). According to (Pocaznoi et al., 2012c), this alcalinization is not linked to the electrochemical reactions but was due to the spontaneous evolution of the non-buffered compost leachate. Momentary acidification of the solution can be observed when acetate is consumed.

Coulombic efficiency (CE) increased from  $7.5 \pm 1.5\%$  to  $32.5 \pm 1.5\%$  for the first and the second pulses, respectively. It reached  $35 \pm 3\%$  for the third acetate pulse. These values resulted from the balance between the anode-respiring processes and the consumption of acetate by metabolic pathways that did not use the anode. Values lower than 50% indicated that much of the acetate was oxidized by using alternative electron acceptors instead of the electrode. As already discussed elsewhere (Cercado et al., 2013), a rich medium such as garden compost contains alternative dissolved electron acceptors (nitrate, sulfate, etc.), which are detrimental to CE. The dissolved oxygen was another alternative electron

acceptor, as no particular care was taken to restore strict anaerobic conditions in the reactors after the forced aerobic period. Finally, the working electrode surface area ( $8 \text{ cm}^2$ ) was small relative to the total volume of solution in the system (600 mL). Such a design was chosen to favour the production of high currents, and it succeeded in this objective, but it is known to be detrimental to Coulombic efficiencies (Ketep et al., 2013 ; (Ketep et al., 2013; Rimboud et al., 2014).

### 3.2. Catalysis of oxygen reduction

After the third pulse of acetate at day 24, the electrodes were again subjected to forced aeration on day 35. Figure 2 presents the evolution of the current density in reactor 1 during this second aerobic phase. It corresponds to a zoom-in of the Figure 1 between day 34 and 44. When oxygen was provided, the electrodes immediately acted as biocathodes, with reduction currents up to  $-400 \text{ mA/m}^2$  (Figure 2 – zone 1), which are among the highest reported so far for oxygen reduction in a medium fed with air at neutral pH (Erable et al., 2012). The reduction current then decreased over time (24h) to reach a stable value around  $71 \text{ mA/m}^2$ . This stable value at an applied potential of  $-0.20 \text{ V vs. SCE}$  was slightly smaller than values reported previously for oxygen-reducing biocathodes formed in seawater : around  $100 \text{ mA/m}^2$  at  $0.0 \text{ V vs. Ag/AgCl}$  (Dumas et al., 2008), and  $250 \text{ mA/m}^2$  at  $-0.10 \text{ V vs. SCE}$  (Bergel et al., 2005). The biocathodes formed here produced fair, but not exceptional, stable current densities ( $71 \text{ mA/m}^2$ ) but they exhibited great transient performance ( $400 \text{ mA/m}^2$ ) just after having been switched from anode to cathode operation. Alternating anode and cathode phases drastically-improved the efficiency of the biocathode.



**Figure 2 (zoom in on Figure 1): Chronoamperometry of the second cathodic phase (from day 34 to day 44) in reactor 1. A continuous forced aeration was implemented from day 34 to day 38 (Zone 1), aeration was turned off between days 38 and 42 and the reactor was left open to the air and aeration was resumed on day 42 to the end (Zone 2). There was no acetate feeding (and consequently no anodic phase) prior to Zone 2. Letters C and D with dotted arrows correspond to the cyclic voltammeteries represented in Figure 5.**

The high transient performance and its subsequent disappearance could be explained by changes in the local pH in the biofilm. During the anodic phase, the oxidation of acetate produced a considerable amount of protons (Reaction 1), which accumulated inside the biofilm (Torres et al., 2008). The biofilm thus had a local pH significantly lower than that of the solution bulk when the electrode started to be



exposed to aeration. According to the diffusion model of Torres et al., (2008), considering the current density of  $16 \text{ A/m}^2$  and the measured pH in the solution of 9.1 just before the exposition to oxygen (day 34), and considering a biofilm of  $50 \text{ }\mu\text{m}$  in thickness, the biofilm internal pH would be 3.1. As indicated in the article (Torres et al., 2008), this is only a rough evaluation of the possible minimal pH inside the biofilm. Such a low pH would severely hinder bacterial growth, but the internal pH of the biofilm is surely damped by the buffer capacity of the medium. This theoretical very minimal value has only a qualitative meaning by indicating the possible drastic acidification of the biofilm during the anodic phase.

The low pH that was reached at the end of the anodic phase favoured the thermodynamics of oxygen reduction (Reaction 2), which explained the high current density obtained at the beginning of the biocathode phase. Then, the production of hydroxide ions due to oxygen reduction slowly balanced out the protons accumulated inside the biofilm and, finally, resulted in an excess of hydroxide ions that have to diffuse out of the biofilm when the biocathode reached its final steady state. The slow decrease of the reduction current observed during day 35 would correspond to the slow pH increase inside the biofilm from a status of proton excess (favourable to oxygen reduction) to a status of hydroxide ions excess (detrimental to oxygen reduction). This transient state lasted 24h (Figure 2 - zone 1) before the current reached a stable value of  $0.071 \text{ A/m}^2$ (day 36).

From day 38 to day 42, aeration was switched off and the reactors were left open to the air. The measured dissolved oxygen concentration corresponded to around 100% air saturation ( $6.5 \text{ mg/L}$  at  $40^\circ\text{C}$ ) during the first phase of forced aeration, but it fell to  $42 \pm 1\%$  when the forced aeration was stopped and the reactors were simply open to the air. The stable current density decreased to  $27 \text{ mA/m}^2$  (Figure 2), i.e. in a proportion (38%) similar to that of the oxygen concentration. It was thus confirmed that the current density was directly linked to the dissolved oxygen concentration.

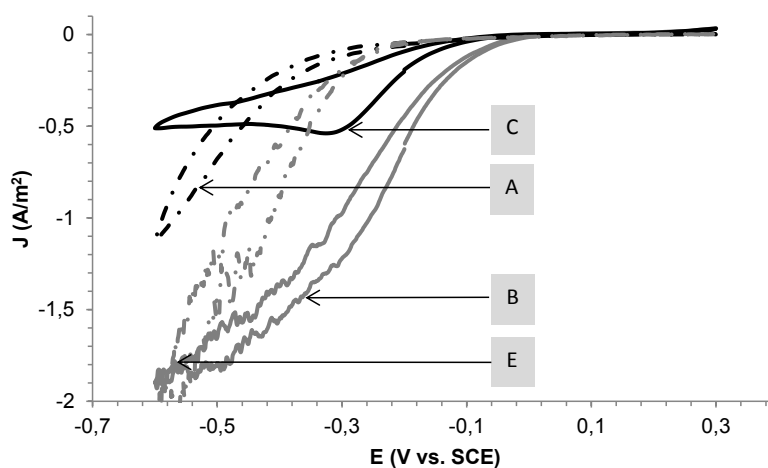
Finally, when the forced aeration was turned on again on day 42 (Figure 2 – zone 2), the current density stabilized directly to the previous steady state value ( $71 \text{ mA/m}^2$ ). No transient high current was observed as had been the case on day 35 when the forced aeration was established just after the bioanode phase. When there was no preceding anode phase, and consequently no proton accumulation before the forced aeration was established, no high transient current was observed. This last event confirmed the beneficial effect of anode-cathode sequencing and it supports the theory that proton accumulation is the source of cathodic current enhancement.

The electrocatalytic properties of the biocathodes were characterized by cyclic voltammeteries (Figure 3). The voltammograms performed initially (A) with the clean electrode at the initial pH of the medium (pH 7.8) showed a reproducible reduction wave starting at around  $-0.30 \text{ V vs. SCE}$ . Under forced aeration, the general shape of the reduction wave was not modified (E), the starting potential was approximately identical, but current densities were increased. These current-potential curves corresponded to the abiotic electrochemical reduction of dissolved oxygen on the clean carbon cloth electrode.

After 43 days of biofilm formation, the biocathode produced an oxygen reduction wave starting around  $-0.15 \text{ V vs. SCE}$ , and with a diffusion-limited current plateau of  $530 \text{ mA/m}^2$  from  $-0.30 \text{ V vs. SCE}$ . With the forced aeration, the limiting-current disappeared and current densities reached values as high as  $1260$

$\text{mA/m}^2$  at  $-0.30 \text{ V vs. SCE}$ . The current was consequently limited by the concentration of dissolved oxygen and/or mass transfer of oxygen to the electrode surface (Figure 3).

The voltammograms of the biocathode presented in Figure 3 were recorded when the medium had pH values higher than 9, while the initial abiotic controls were performed with the initial pH value of 7.8. From a thermodynamic point of view, the pH value was detrimental to the biocathodes in comparison to the abiotic controls. Nevertheless, despite the possible detrimental effect of pH, the biocathodes produced more effective oxygen-reduction kinetics than the clean electrodes: reduction waves started at higher potential and current densities were significantly higher. Moreover, voltammograms were recorded at days 23 and 43, which means several days after being switched to cathodic phase. The biocathodes were consequently in a stationary state and did not benefit from the enhancing effect of biofilm acidification during the anodic phase. These voltammograms represented the stationary characteristics of the biocathodes apart for the biofilm acidification impact. It can be concluded that acidification during the anodic phase clearly enhanced the biocathode properties, but was far from being the sole cause of the entire catalytic effect. The biocathodes catalyze oxygen reduction and the biofilm acidification due to the anodic phase had a boost effect.



**Figure 3 :** Voltammograms (scan rate  $1 \text{ mV/s}$ ) of the electrode in reactor 1 formed on carbon cloth at  $-0.20 \text{ V vs. SCE}$  during cathodic phase. (A) initial CV on the clean electrode (abiotic) without forced aeration (pH7.8), (E) initial CV on the clean electrode (abiotic) with forced aeration (pH7.8) (B) CV (day 23, pH of the medium 9.3) with forced aeration, (C) CV (day 43, pH of the medium 9.9) without forced aeration.

To evaluate the sole effect of pH on cathodic current, abiotic cyclic voltammetries were run with clean carbon cloth electrodes in the same medium at different pH: 5.3 ; 7.8 and 9.9 without (Figure 4a) and with forced aeration (Figure 4b). The pH of 5.3 was chosen to be reasonably representative of the internal biofilm acidification, without inducing to important damages to the microbial community. Previous experiments showed that the bioanodes lost drastically their performance when the pH of the medium was decreased below 5. At the potential of  $-0.20 \text{ V vs. SCE}$ , cathodic current increased from  $13 \text{ mA/m}^2$  to  $66 \text{ mA/m}^2$  when pH decreases from 9.9 to 5.3. Forced aeration into the reactor did not significantly modify the current-potential characteristics. In these conditions and in this potential range, oxygen reduction was controlled by the electron transfer kinetics and not by oxygen transfer.

These abiotic controls confirmed that the effect of pH on abiotic reduction of oxygen was limited. At -0.20 V vs. SCE the abiotic reduction of oxygen on carbon cloth immersed in compost leachate was too slow and fully controlled by the electron transfer kinetics to be highly sensitive to the thermodynamic conditions. The impact of acidification during the anodic phase had a so important effect (enhancing current density from 70 to 400 mA/m<sup>2</sup>) because of the biotic character of the cathode.

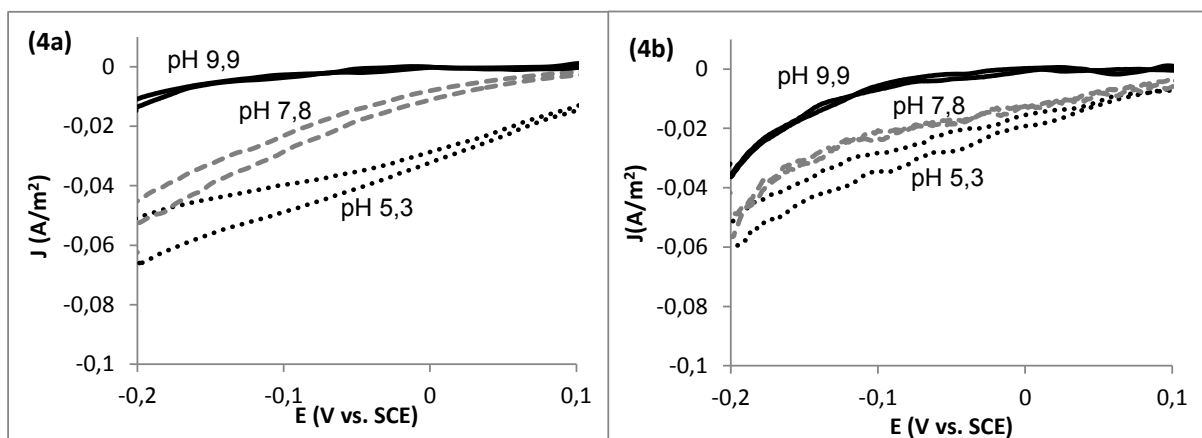


Figure 4 : Zoom-in on voltammograms (scan rate 1 mV/s) of abiotic control on carbon cloth at 3 different pH : 5.3 ; 7.8 and 9.9 without forced aeration (4a) and with forced aeration (4b)

The capability of the same biofilm to catalyse both acetate oxidation and oxygen reduction is illustrated in Figure 5 by overlaying a CV at the end of the anodic phase (D) on a CV at the end of a cathodic phase (C). In the range of potential values from -0.1 to -0.5 V vs. SCE, depending on whether the electrode was provided with acetate or oxygen, the bioelectrode was able to achieve either the oxidation of acetate or the reduction of oxygen. At the end of the anodic phase, the CV was characteristic of a very efficient bioanode with a highly dominant redox couple centred at -0.44 V vs. ECS, which is in the same range of potential as the redox couples determined with different bioanodes made from *Geobacter sulfurreducens* pure culture, for instance (Fricke et al., 2008; Zhu et al., 2012). In return, at the end of the reduction phase, the electrode took on the conventional characteristics of an oxygen-reducing cathode.

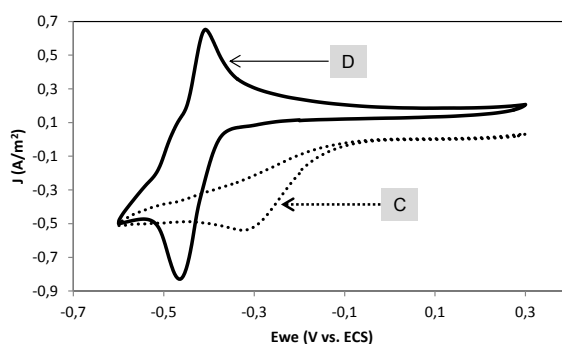


Figure 5 : Voltammograms (scan rate 1 mV/s) of the bioelectrode in reactor 1 formed on carbon cloth at -0.20 V vs. SCE. (C) CV after 43 days at the end of a cathodic phase, and (D) Non-turnover CV on day 34 at the end of an anodic phase when acetate was depleted.

### 3.3. Microbial community analyses

After trimming, sorting, and quality control, a total of 45569 sequences with an average read length of 487 nucleotides were used in downstream analysis. 25% of these sequences represented hits from the blast results that fell below 77% identity, which is not sufficient to have confidence in the determination of an organism. 34066 sequences remained and were clustered into 623 operational taxonomic units (OTUs) at 3% distance threshold. They were used in the calculations of the diversity index for each sample.

The number of organizational taxonomic units (OTUs) (Table 1) showed that the microbial communities composing the biofilms were less rich than the communities of the initial medium and the bulks at the end of the experiments (43 days chronoamperometry). The Simpson Indexes confirmed the lower diversity of the biofilm microbial communities, where the average value was 0.85 compared with 0.91 for the bulks and 0.94 for the initial garden compost leachate. These results indicated a selection of some microbial groups on the electrodes by the applied potential and/or by the cultivation conditions.

**Table 1 : Diversity indexes for the initial garden compost leachate, the bulks and biofilms.**

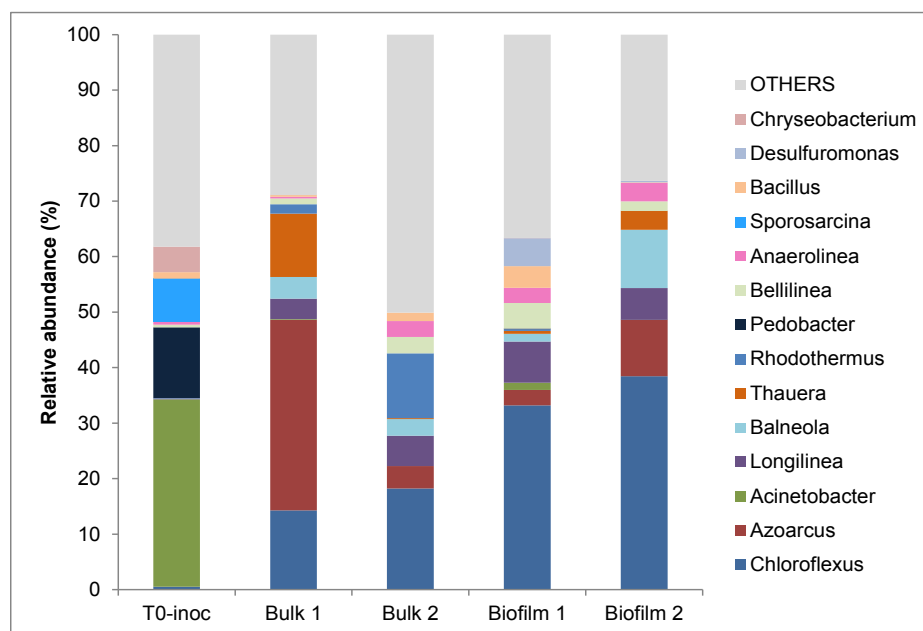
Sample	OTUs Number	Simpson
T0-inoc	263	0.94
Bulk 1	370	0.88
Bulk 2	274	0.95
Biofilm 1	242	0.88
Biofilm 2	195	0.83

Table 2 gives the microbial communities (distribution in percentage of total sequences) at the phylum and class levels for the bulks and the biofilms of the two reactors (duplicates) at the end of experiments. In the initial garden compost leachate (T0-inoc), the dominant phyla were Proteobacteria (55%, including a majority of Gammaproteobacteria), Bacteroidetes (24%) and Firmicutes (13%). The microbial communities of the electrode biofilms were both drastically dominated by Chloroflexi (49 ± 1 %) whereas enrichment in Chloroflexi was visible to a lesser extent in the bulks and may have been due to detachment of the cells from the biofilm into the solution.

**Table 2 : Microbial community (distribution in percentage of total sequences) at the class level. T0-inoc is the initial medium. 1 and 2 indicate two reactors run in parallel during 43 days of polarization at -0.20 V vs. SCE.**

Phylum	Chloroflexi %		Proteobacteria %				Firmicutes %	Bacteroidetes %	others
	Chloroflexi (Class)	Anaerolineae	α	β	γ	δ			
T0-inoc	1	1	11	5	38	1	13	24	5
bulk 1	14	5	11	49	1	4	4	4	7
bulk 2	18	12	11	5	4	4	13	10	23
biofilm 1	33	15	8	8	3	3	10	12	7
biofilm 2	39	11	8	16	1	11	1	5	8

At the genus level (Figure 6) the inoculum was dominated by *Acinetobacter sp.* (34%) from the class of Gammaproteobacteria and *Pedobacter sp.* (13%) belonging to the class of Bacteroidetes. At the end of the experiments, microbial communities had radically changed and these genera represented less than 1% in biofilms and bulks. The biofilm communities were dominated by *Chloroflexus sp.* (33% and 38% for Biofilm1 and Biofilm2 respectively). *Longilinea sp.*, *Bellilinea sp.* and *Anaerolinea sp.*, all belonging to the phylum Chloroflexi, together made up 14.7% of the population for Biofilm 1 and 10.8% for Biofilm 2.



**Figure 6 : Relative abundance of dominant microbial genera for the initial garden compost leachate (T0-inoc), for the bulks and biofilms 1 and 2 (duplicates). Groups that were observed at less than 2% average abundance are grouped as Others.**

*Azoarcus sp.* (34%) from the class of Betaproteobacteria dominated the microbial community of the bulk 1, while bulk 2 presented a more diverse microbial community, as indicated by the relatively high Simpson index (Table 1).

Bioanodes that were formed under identical conditions (garden compost leachate as inoculum, acetate as substrate, polarization at -0.2 V vs. SCE), but in anaerobic conditions (no aeration phase) led to microbial communities dominated by Proteobacteria with 73%  $\pm$  2% at the electrode and 51%  $\pm$  1% in the bulks. Among Proteobacteria, an enrichment of the biofilms in Deltaproteobacteria was noticeable. Microbial 16S rRNA pyrosequencing gave a relative abundance of 27%  $\pm$  4% of Deltaproteobacteria at the anode whereas it was only 1.5%  $\pm$  0.5 % in the bulks. Chloroflexi composed less than 0.3% of these populations (data to be published). This kind of microbial composition was fully consistent with the analysis commonly reported for bioanodes, with dominance of Proteobacteria (Logan and Regan, 2006).

It can be concluded that the reversible anode-cathode phases led to the selection of a specific microbial community dominated by Chloroflexi. This phylum has not been frequently found in bioelectrochemical systems. Chloroflexi has previously been identified on the anode of an MFC powered by rhizodeposits of living rice plants, but it represented only 6% of all clones (Schampelaire et al., 2010). Chloroflexi have

also been found enriched on the anode of a cellulose-fed MFC (Ishii et al., 2008). The high percentages found here in both duplicates indicate that Chloroflexi may be a characteristic of reversible bioanodes.

Chloroflexi are known as green non-sulfur bacteria. They are generally photoheterotrophs and can use various sugars and organic acids as electron donors. This metabolism would give them the possibility to develop during anodic phases when acetate is available, using the electrode as electron acceptor. Moreover, Chloroflexi are facultative aerobic, which means that they can develop during the biocathode phase and they have the enzymatic equipment to reduce oxygen. Such a flexible metabolism is a selective advantage for Chloroflexi over other microbial strains, and certainly explains their dominance at the electrodes.

*Chloroflexus sp.* is a filamentous organism abundant in wastewater treatment plant (Björnsson et al., 2002). It can be speculated that, given its filamentous aspect, *Chloroflexus species* might play a role in electron transport. A similar phenomenon has been described by Pfeffer et al. (2012) for members of the Desulfobulbaceae family. This study showed that long-distance electron transport from sulfide to oxygen was possible in sediment, mediated by the micro-cables that form the long filamentous bacteria. Nevertheless, to the best of our knowledge there is no proof of the possible electroactivity of Chloroflexi in the literature so far. One of the main conclusions of the present work is that the possible electroactivity of Chloroflexi should now be considered as a major scientific question, because they may represent an essential pillar in the design of very efficient reversible bioelectrodes.

#### 4. Conclusion

Reversible bioelectrodes are an appealing approach boosting the performance of MFCs by using the accumulation of protons, which limits the bioanode operation, as an advantage to favour the biocathode operation. The success of this strategy was demonstrated here with bioanodes formed from garden compost. The microbial community that composed the reversible bioelectrodes was dominated by Chloroflexi, a class of bacteria known as filamentous green non-sulfur bacteria, facultative aerobic, which now deserves further fundamental investigation as a possible candidate for the design of reversible bioelectrodes with pure culture.

#### Acknowledgments

This work was part of the “BIORARE” project (ANR-10-BTBR-02), partly funded by the French Agence Nationale de la Recherche (ANR) and the Comité des Investissements d’Avenir. We thank Luc Etcheverry and Mickaël Rimboud (Toulouse, France) for their kind contributions.

#### References

- [1] Bergel, A., Féron, D., Mollica, A., 2005. Catalysis of oxygen reduction in PEM fuel cell by seawater biofilm. *Electrochem. Commun.* 7, 900–904.
- [2] Björnsson, L., Hugenholtz, P., Tyson, G.W., Blackall, L.L., 2002. Filamentous Chloroflexi (green non-sulfur bacteria) are abundant in wastewater treatment processes with biological nutrient removal. *Microbiol. Read. Engl.* 148, 2309–2318.
- [3] Borole, A.P., Reguera, G., Ringeisen, B., Wang, Z.-W., Feng, Y., Kim, B.H., 2011. Electroactive biofilms: Current status and future research needs. *Energy Environ. Sci.* 4, 4813–4834.

- [4] Carbajosa, S., Malki, M., Caillard, R., Lopez, M.F., Palomares, F.J., Martín-Gago, J.A., Rodríguez, N., Amils, R., Fernández, V.M., De Lacey, A.L., 2010. Electrochemical growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans* on a graphite electrode for obtaining a biocathode for direct electrocatalytic reduction of oxygen. *Biosens. Bioelectron.* 26, 877–880.
- [5] Cercado, B., Byrne, N., Bertrand, M., Pocaznoi, D., Rimboud, M., Achouak, W., Bergel, A., 2013. Garden compost inoculum leads to microbial bioanodes with potential-independent characteristics. *Bioresour. Technol.* 134, 276–284.
- [6] Cercado-Quezada, B., Delia, M.-L., Bergel, A., 2010. Treatment of dairy wastes with a microbial anode formed from garden compost. *J. Appl. Electrochem.* 40, 225–232.
- [7] Cheng, K.Y., Ho, G., Cord-Ruwisch, R., 2010. Anodophilic Biofilm Catalyzes Cathodic Oxygen Reduction. *Environ. Sci. Technol.* 44, 518–525.
- [8] Dowd, S.E., Callaway, T.R., Wolcott, R.D., Sun, Y., McKeehan, T., Hagevoort, R.G., Edrington, T.S., 2008. Evaluation of the bacterial diversity in the feces of cattle using 16S rDNA bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP). *BMC Microbiol.* 8, 125.
- [9] Dumas, C., Mollica, A., Féron, D., Basseguy, R., Etcheverry, L., Bergel, A., 2008. Checking graphite and stainless anodes with an experimental model of marine microbial fuel cell. *Bioresour. Technol.* 99, 8887–8894.
- [10] Edgar, R.C., 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26, 2460–2461.
- [11] Edgar, R.C., Haas, B.J., Clemente, J.C., Quince, C., Knight, R., 2011. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 27, 2194–2200.
- [12] Erable, B., Féron, D., Bergel, A., 2012. Microbial catalysis of the oxygen reduction reaction for microbial fuel cells: a review. *ChemSusChem* 5, 975–987.
- [13] Fan, Y., Sharbrough, E., Liu, H., 2008. Quantification of the Internal Resistance Distribution of Microbial Fuel Cells. *Environ. Sci. Technol.* 42, 8101–8107.
- [14] Freguia, S., Rabaey, K., Yuan, Z., Keller, J., 2008. Sequential anode–cathode configuration improves cathodic oxygen reduction and effluent quality of microbial fuel cells. *Water Res.* 42, 1387–1396.
- [15] Fricke, K., Harnisch, F., Schröder, U., 2008. On the use of cyclic voltammetry for the study of anodic electron transfer in microbial fuel cells. *Energy Environ. Sci.* 1, 144.
- [16] Harnisch, F., Schröder, U., 2009. Selectivity versus mobility: separation of anode and cathode in microbial bioelectrochemical systems. *ChemSusChem* 2, 921–926.
- [17] Ishii, S., Shimoyama, T., Hotta, Y., Watanabe, K., 2008. Characterization of a filamentous biofilm community established in a cellulose-fed microbial fuel cell. *BMC Microbiol.* 8, 6.
- [18] Ketep, S.F., Bergel, A., Calmet, A., Erable, B., 2014. Stainless steel foam increases the current produced by microbial bioanodes in bioelectrochemical systems. *Energy Environ. Sci.* 7, 1633.
- [19] Ketep, S.F., Fourest, E., Bergel, A., 2013. Experimental and theoretical characterization of microbial bioanodes formed in pulp and paper mill effluent in electrochemically controlled conditions. *Bioresour. Technol.* 149, 117–125.
- [20] Li, W., Sun, J., Hu, Y., Zhang, Y., Deng, F., Chen, J., 2014. Simultaneous pH self-neutralization and bioelectricity generation in a dual bioelectrode microbial fuel cell under periodic reversion of polarity. *J. Power Sources.*
- [21] Logan, B.E., Regan, J.M., 2006. Electricity-producing bacterial communities in microbial fuel cells. *Trends Microbiol.* 14, 512–518.
- [22] Parot, S., Necessian, O., Delia, M.-L., Achouak, W., Bergel, A., 2009. Electrochemical checking of aerobic isolates from electrochemically active biofilms formed in compost. *J. Appl. Microbiol.* 106, 1350–1359.
- [23] Pfeffer, C., Larsen, S., Song, J., Dong, M., Besenbacher, F., Meyer, R.L., Kjeldsen, K.U., Schreiber, L., Gorby, Y.A., El-Naggar, M.Y., Leung, K.M., Schramm, A., Risgaard-Petersen, N., Nielsen, L.P., 2012. Filamentous bacteria transport electrons over centimetre distances. *Nature* 491, 218–221.
- [24] Pocaznoi, D., Calmet, A., Etcheverry, L., Erable, B., Bergel, A., 2012a. Stainless steel is a promising electrode material for anodes of microbial fuel cells. *Energy Environ. Sci.* 5, 9645–9652.
- [25] Pocaznoi, D., Erable, B., Etcheverry, L., Delia, M.-L., Bergel, A., 2012b. Towards an engineering-oriented strategy for building microbial anodes for microbial fuel cells. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 14, 13332–13343.
- [26] Rimboud, M., Pocaznoi, D., Erable, B., Bergel, A., 2014. Electroanalysis of microbial anodes for bioelectrochemical systems: basics, progress and perspectives. *Phys. Chem. Chem. Phys.*
- [27] Rozendal, R.A., Hamelers, H.V.M., Rabaey, K., Keller, J., Buisman, C.J.N., 2008. Towards practical implementation of bioelectrochemical wastewater treatment. *Trends Biotechnol.* 26, 450–459.

- [28] Santoro, C., Babanova, S., Atanassov, P., Li, B., Ieropoulos, I., Cristiani, P., 2013. High Power Generation by a Membraneless Single Chamber Microbial Fuel Cell (SCMFC) Using Enzymatic Bilirubin Oxidase (BOx) Air-Breathing Cathode. *J. Electrochem. Soc.* 160, H720–H726.
- [29] Schampelaire, L.D., Cabezas, A., Marzorati, M., Friedrich, M.W., Boon, N., Verstraete, W., 2010. Microbial Community Analysis of Anodes from Sediment Microbial Fuel Cells Powered by Rhizodeposits of Living Rice Plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 2002–2008.
- [30] Strik, D.P.B.T.B., Hamelers (Bert), H.V.M., Snel, J.F.H., Buisman, C.J.N., 2008. Green electricity production with living plants and bacteria in a fuel cell. *Int. J. Energy Res.* 32, 870–876.
- [31] Strik, D.P.B.T.B., Hamelers, H.V.M., Buisman, C.J.N., 2010. Solar Energy Powered Microbial Fuel Cell with a Reversible Bioelectrode. *Environ. Sci. Technol.* 44, 532–537.
- [32] Torres, C.I., Kato Marcus, A., Rittmann, B.E., 2008. Proton transport inside the biofilm limits electrical current generation by anode-respiring bacteria. *Biotechnol. Bioeng.* 100, 872–881.
- [33] Zhu, X., Yates, M.D., Logan, B.E., 2012. Set potential regulation reveals additional oxidation peaks of *Geobacter sulfurreducens* anodic biofilms. *Electrochem. Commun.* 22, 116–119.