

# THESE

présentée

pour obtenir

**LE TITRE DE DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE  
TOULOUSE**

École doctorale : Mécanique Energétique Génie Civil Procédés

Spécialité : Génie des Procédés et de l'Environnement

Par M. Leonardo De Silva Muñoz

Titre de la thèse: **Des aspects positifs issus des recherches en biocorrosion :  
de la production d'hydrogène aux biopiles à combustible.**

Soutenue le 05/12/2007 devant le jury composé de :

Mme Régine BASSEGUY	Directeur de thèse
MM. François LAPICQUE	Rapporteur
Bernard TRIBOLLET	Rapporteur
Damien FÉRON	Membre
Théodore TZEDAKIS	Membre
Alain BERGEL	Membre



## **Remerciements**

La réalisation de ce travail a été possible grâce au soutien financier du CONACYT, du Laboratoire de Génie Chimique et du CEA-Saclay.

Pour le soutien moral, technique et scientifique je tiens à remercier :

Manakel, mon guide et ses collègues, pour leurs inestimables et constants aide et conseil, mon épouse Sofía; ma vie en France a été beaucoup enrichie grâce à elle, ma famille et celle de Sofia; sans eux, je n'aurais pas pu arriver ici.

Régine Basséguy, pour son aide, sa patience, son temps et sa confiance en moi

Alain Bergel pour son irremplaçable humour et ses remarques pertinentes sur mon travail,

Damien Féron pour l'intérêt montré et ses bonnes idées apportées à ce travail.

Jean Pierre Monna et Luc Etcheverry pour leur précieuse aide technique,

toute l'équipe Bio et les doctorants du LGC pour la bonne ambiance qu'ils génèrent,

Vous, Toulouse, la France, le Mexique, la Terre, et Dieu pour m'avoir permis de vivre cette grande expérience.



## Sommaire

<b>Introduction et positionnement de l'étude.</b>	1
<b>Chapitre I. Les acides faibles et la biocorrosion anaérobie des aciers.</b>	9
I.1 Réversibilité de la réduction des atomes d'hydrogène et implication dans la biocorrosion des aciers.	11
I.2. Réduction des acides faibles et implication dans la corrosion.	14
I.3. Le travail réalisé.	16
I.4. Article: "Role of the reversible electrochemical deprotonation of phosphate species in anaerobic biocorrosion of steels."	19
I.5. Article: " Weak acids as catalysts of the cathodic reaction in anaerobic biocorrosion of steel"	39
I.6. Résultats complémentaires sur la réversibilité de la réduction des atomes d'hydrogène des acides faibles sur acier inoxydable.	53
I.6.1. Matériel et méthodes.	53
I.6.2. Résultats.	54
<b>Chapitre II. Production d'hydrogène par électrolyse.</b>	57
II.1. Le travail expérimental réalisé.	60
II.2. Article: "Hydrogen production by electrolysis of a phosphate solution on a stainless steel cathode."	63
II.3. Considérations sur l'utilisation des gradients de pH dans un électrolyseur.	85
II.4. Considérations sur la nature d'un acide faible et son effet catalytique sur la réduction de l'eau.	87
<b>Chapitre III. Les enzymes comme catalyseurs dans des piles à combustible.</b>	91
III.1. Aperçu bibliographique.	93
III.2. Travail expérimental.	102
III.2.1 Catalyse des réactions par des enzymes et l'hémine.	102
III.2.1.1. Matériel et méthodes.	106
III.2.1.2. Résultats.	109
III.2.1.2.1. Systèmes conçus pour tester la catalyse de la réduction de l'oxygène.	109
III.2.1.2.2. Systèmes conçus pour tester la catalyse de l'oxydation du glucose et de l'hydrogène.	119

III.2.2. Comportement des cathodes en acier en présence de GOD dans une pile à combustible aqueuse.	124
III.2.2.1 Matériel et méthodes.	127
III.2.2.2 Résultats.	128
III.3. Conclusion	137
<b>Conclusion générale et perspectives.</b>	139
<b>Références</b>	143

## **Introduction et positionnement de l'étude.**



La corrosion induite par des microorganismes ou biocorrosion est un problème qui génère de lourdes pertes économiques mondiales (plusieurs milliards d'euros par an). Malgré de nombreux progrès dans la compréhension des mécanismes, la complexité du phénomène a empêché de trouver des solutions définitives au problème et inspire encore beaucoup de travaux de recherche. Une des conclusions des études sur la biocorrosion est que les microorganismes n'interviennent, dans la plupart des cas, que de façon indirecte sur la biodétérioration des matériaux. En effet, l'activité microbienne peut provoquer une modification des conditions au niveau de l'interface matériau/solution en produisant des substances corrosives ou des catalyseurs qui accélèrent les réactions liées à la corrosion, ou peut induire des modifications de l'état de surface des matériaux en les rendant plus réactifs et sensibles à la corrosion. La compréhension des mécanismes de catalyse de certaines réactions présentes dans le phénomène de la biocorrosion, telle que la catalyse de la réduction de l'oxygène ou de l'eau, est nécessaire pour proposer des moyens de lutte contre ce type de corrosion mais également elle peut apporter de nouvelles pistes pour développer de nouvelles applications dans des domaines comme la production d'énergie dans des piles à combustible ou le stockage d'énergie via l'hydrogène.

La participation dans le phénomène de biocorrosion de mécanismes catalytiques induits par les acides faibles a été étudiée dans ce travail. Un autre objectif de la thèse a été d'exploiter les phénomènes catalytiques mis en évidence dans les recherches en biocorrosion pour réaliser d'autres applications: production d'énergie dans des biopiles à combustible ou production d'hydrogène par voie électrochimique dans des conditions douces.

### **L'origine de la corrosion**

La corrosion des métaux est un processus électrochimique caractérisé par la dissolution d'un métal de valence zéro ( $M^0$ ). La réaction électrochimique impliquée est une réaction d'oxydation où le métal perd des électrons et passe de son état de valence zéro à une forme ionique  $M^{n+}$  :



Pour que cette réaction puisse se produire sur le matériau, il faut qu'une réaction de réduction se déroule simultanément: les électrons issus de l'oxydation sont utilisés pour transformer des espèces présentes dans le milieu (fig. 1).

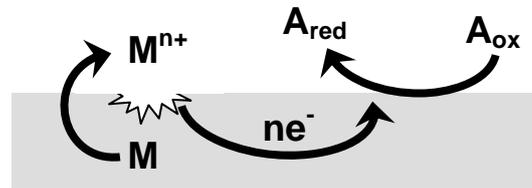
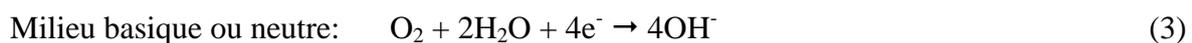
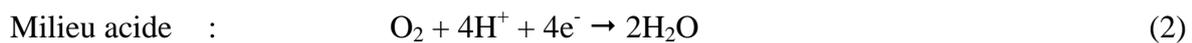
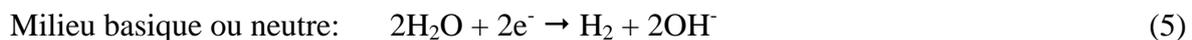
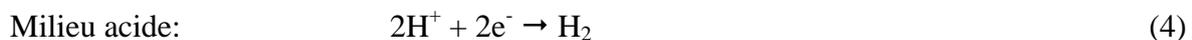


Figure 1. Schéma du processus de corrosion. Le métal M s'oxyde en perdant des électrons pour former des ions M<sup>n+</sup>. Les électrons sont utilisés pour réduire l'espèce A<sub>ox</sub> qui se trouve dans le milieu qui est en contact avec le métal.

En milieu aérobie, l'accepteur d'électrons A<sub>ox</sub> est normalement l'oxygène dissous dans la solution.



En absence d'oxygène, A<sub>ox</sub> peut être des protons en solution ou de l'eau.



### Implications économiques de la corrosion

La corrosion des métaux a un impact significatif dans l'économie du monde. Des études, faites aux Etats-Unis et au Royaume-Uni, ont montré que les pertes économiques dues à la corrosion représentait au moins 4% du produit national brut (PNB) (Kruger 2001). Dans un rapport, réalisé par CC Technologies et la NACE (National Association of Corrosion Engineers) (Koch, Brongers et al. 2001), les coûts directs de la corrosion, c'est-à-dire les coûts générés par le contrôle de la corrosion (le remplacement de tuyaux, l'utilisation d'inhibiteurs, etc.) et les services occasionnés (maintenance des installations), ont été déterminés pour 26 secteurs industriels où des problèmes de corrosion sont présents. Le chiffre total s'élève à 137,9 milliard de dollars US par an. Le secteur le plus touché est celui des services publics qui représente 34,7 % de ces coûts (Tableau 1).

Secteur économique	Branche	Pourcentage des coûts
Service public	Conduites d'eau potable et des eaux usées	75 %
	Réseau électrique	14%
	Réseau de gaz naturel	10 %
	Total	34,7 %
Transport	Véhicules motorisés	79 %
	Bateaux	9%
	Avions	7%
	Trains	2%
	Transport de matières dangereuses	3%
	Total	21,5 %
Infrastructure	Ponts des autoroutes	37 %
	Stockage des matières dangereuses	31 %
	Pipelines pour les liquides et les gaz	31 %
	Canaux et ports	1 %
	Total	16,4 %
Gouvernement	Défense	99,5 %
	Stockage de déchets nucléaires	0,5 %
	Total	14,6 %
Production et manufacture	Pâte à papier et papier	34 %
	Raffinage du pétrole	21 %
	Traitement alimentaire	12 %
	Chimie, pétrochimie, pharmacie	10 %
	Electroménager	9 %
	Exploration et production du pétrole et du gaz	8 %
	Agriculture	6 %
	Total	12,8 %

Tableau 1. Pourcentage des coûts de corrosion (137,9 milliards de dollars US par an) pour les différents secteurs économiques analysés.

Cette analyse comprend seulement une partie de l'activité économique des Etats-Unis, une extrapolation nationale donne comme résultat 276 milliards de dollars US par an. Ce chiffre équivaut à 3,1% du PNB du pays (données de 2001).

Les coûts indirects de la corrosion, comme les pertes occasionnées par l'arrêt des installations ou le temps d'attente dans un bouchon lors de la réparation d'un pont, sont plus difficiles à déterminer, mais avec une estimation optimiste, ils peuvent être considérés égaux aux coûts directs. Cela veut dire que les coûts totaux de la corrosion pourraient atteindre les 6% du PNB des Etats-Unis.

Les conséquences de la corrosion ne se limitent pas à des coûts économiques, mais elles concernent également la santé (problèmes des implants métalliques dans le corps), la sécurité

(pannes de véhicules, rupture de structures), l'environnement (pollution des ports) et la technologie (barrière technique pour de nouvelles technologies).

### **L'origine de la biocorrosion.**

Quand un métal est immergé dans un milieu non-stérile, des microorganismes peuvent adhérer à la surface du métal et former un biofilm. Les biofilms sont en général des structures complexes, avec une épaisseur non uniforme, constituées par les cellules des microorganismes morts ou vivants, par des substances polymériques extracellulaires (SPE), et des produits organiques et inorganiques issus de leur activité biologique.

L'activité des microorganismes dans le biofilm peut favoriser la corrosion du métal. La corrosion induite par l'activité des microorganismes est appelée biocorrosion. En réalité, les processus derrière la biocorrosion sont les mêmes que dans la corrosion classique, mais la nature hétérogène du biofilm avec la production de substances agressives et la consommation des ions métalliques ou de l'oxygène du milieu, changent les conditions physico-chimiques à la surface du matériau et peut favoriser les réactions de corrosion.

Certains auteurs estiment que les pertes économiques liées à la biocorrosion représente 10 % des coûts totaux de la corrosion (Iverson 1987). En fait, il est quasiment impossible de les déterminer car il y a des problèmes pour évaluer correctement l'impact de la biocorrosion comme l'ignorance des processus de biocorrosion, la difficulté à distinguer entre la corrosion abiotique et la biocorrosion, l'application inadéquate ou tardive de mesures contre la corrosion qui augmentent les dégâts, la rétention d'informations dans les conflits d'assurances, etc. Néanmoins, d'après certaines études, les pertes mondiales peuvent s'estimer en milliards d'euros par an (Heitz, Flemming et al. 1996).

### **Formation du biofilm.**

Toute structure organique ou inorganique exposée à des conditions non-stériles peut être colonisée par des microorganismes qui peuvent former un biofilm. La formation du biofilm suit différentes étapes (figure 2) :

1. Conditionnement : des molécules organiques adhèrent à la surface propre du substrat modifiant ses caractéristiques initiales.

2. Adhésion : des microorganismes adhèrent à la surface conditionnée.
3. Adaptation : les microorganismes produisent des polymères extracellulaires pour attraper des nutriments dans la solution. Ces exopolymères fortifient l'adhésion des cellules au substrat.
4. Maturation: le biofilm commence à devenir plus épais grâce à la reproduction des microorganismes et à l'adhésion des autres cellules en suspension qui se joignent à la colonie.
5. Rupture: le biofilm atteint son épaisseur maximale pour laquelle des forces hydrodynamiques arrachent des morceaux de biofilm.

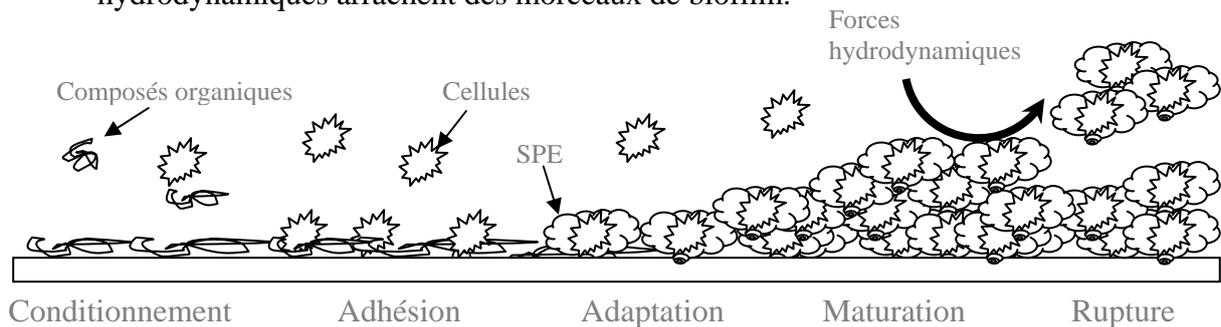


Figure 2. Etapes de formation du biofilm

Le biofilm offre des avantages aux microbes qui le forment. Il offre une protection contre les substances toxiques dans le milieu et contre la déshydratation, il peut stocker des nutriments et facilite l'interaction symbiotique entre différentes espèces de microorganismes.

Le biofilm peut accumuler les substances issues de l'activité microbienne dans son sein. Parmi ces substances, il peut y avoir des acides aminés, des acides organiques, des enzymes, des sucres, des alcools, etc. Certaines de ces substances peuvent être à l'origine des problèmes de corrosion (Heitz, Flemming et al. 1996).

### **Des aspects positifs issus des recherches en biocorrosion.**

L'étude de la biocorrosion a montré que beaucoup des mécanismes impliqués sont liés à la catalyse des réactions d'oxydoréduction, soit à cause des modifications des états de surface des matériaux, soit à cause de la présence de catalyseurs dans le milieu comme les enzymes. La compréhension des mécanismes de catalyse impliqués dans la biocorrosion, qui devrait permettre de limiter cette corrosion, pourrait mener à des applications industrielles ou scientifiques où la catalyse de ces réactions serait exploitée. La réduction de l'eau et de

l'oxygène sont deux exemples de réactions intéressantes et présentes dans presque tous les types de corrosion:

- La réduction de l'eau, un des moteurs principaux de la corrosion anaérobie, est utilisée dans la production d'hydrogène par électrolyse des solutions basiques. L'hydrogène est un vecteur d'énergie qui peut être utilisé dans des piles à combustible pour produire de l'électricité.
- Dans pratiquement toutes les piles à combustible, l'oxygène est utilisé comme accepteur d'électrons. Donc, la catalyse de sa réduction électrochimique, moteur principal de la corrosion aérobie, est un phénomène qui présente un intérêt dans le domaine de la production d'énergie.

Le chapitre I traite de l'influence des acides faibles sur la corrosion des aciers. Les informations obtenues au cours de cette étude ont été exploitées dans le chapitre II qui présente l'électrolyse de solutions d'acides faibles pour produire de l'hydrogène dans des conditions de pH plus douces que celles de l'électrolyse conventionnelle. Le chapitre III présente une étude sur la catalyse enzymatique de la réduction de l'oxygène sur différents matériaux dans le but de tester des métaux industriels tels que l'acier inoxydable et le titane couplés avec des enzymes pour les utiliser comme cathodes dans des piles à combustible. La catalyse enzymatique de l'oxydation du glucose et de l'hydrogène a aussi été étudiée. Dans ce dernier chapitre, des essais en pile aqueuse ont été également réalisés pour étudier l'influence d'une catalyse enzymatique (système glucose + glucose oxydase) sur les performances d'une cathode en acier inoxydable. Finalement, les conclusions et les perspectives sont présentées.

Chapitre I  
**Les acides faibles et la biocorrosion anaérobie des aciers.**



## I. Les acides faibles et la biocorrosion anaérobie des aciers.

Les acides faibles sont des composés très répandus dans la nature. En effet, des acides organiques et inorganiques peuvent être produits par des microorganismes ou excrétés par des organismes macroscopiques. Par ailleurs, dans les laboratoires, les acides faibles sont très utilisés comme tampons de pH en particulier dans les expériences mettant en jeu des catalyseurs biologiques comme les enzymes car les enzymes présentent généralement un pH optimal pour lequel leur activité est maximale. Dans les biofilms développés sur des surfaces métalliques, les acides faibles jouent un rôle important sur la dégradation par corrosion du matériau. Ils sont les composés qui contrôlent le pH et donc ils influent sur la thermodynamique et la cinétique des réactions électrochimiques qui se déroulent à la surface des métaux colonisés par un biofilm. Bien comprendre le rôle des acides faibles dans la corrosion est très important pour lutter plus efficacement contre ce phénomène.

Ce chapitre présente, dans les sections I.1 et I.2, le contexte bibliographique sur l'influence des acides faibles sur la biocorrosion anaérobie des aciers. Dans la section I.3, les objectifs du travail expérimental réalisé et les résultats obtenus sont résumés. Une partie du travail expérimental et ses résultats sont présentés dans les sections I.4 et I.5 sous la forme de deux articles qui ont été soumis pour être publiés dans des journaux scientifiques. Finalement, la section I.6 décrit les résultats des expériences complémentaires réalisées qui n'ont pas été inclus dans les articles.

### **I.1. Réversibilité de la réduction des atomes d'hydrogène et implication dans la biocorrosion des aciers.**

Des études sur la biocorrosion anaérobie des aciers ont mis en évidence que les bactéries sulfato-réductrices (BSR) jouent un rôle majeur dans ce processus (Pankhania, 1988; Brennenstuhl, Gendron et al., 1993; Chen and Clayton, 1998; Fonseca, Feio et al., 1998; Leod, Dawood et al., 1998; Angell and Urbanic, 2000; Rao, Sairam et al., 2000; Hernandez Gayosso, Zavala Olivares et al., 2004; Santana Rodriguez, Santana Hernandez et al., 2006).

Les mécanismes proposés pour expliquer le phénomène incluent :

- la précipitation du sulfure de fer, lequel est un catalyseur de la réduction des protons et, en étant un bon conducteur, agit comme une cathode dans un couplage galvanique avec du fer métallique (King and Miller, 1971; King and Miller, 1973; Rajagopal and LeGall, 1989);

- la catalyse de la réaction cathodique par l'enzyme hydrogénase produite par les BSR (Da Silva, Basseguy et al., 2004);
- la dépolarisation anodique résultant d'une acidification locale au niveau des sites anodiques (Hamilton and Lee, 1995);
- la génération de piles de concentration ionique due à la formation de chélates constitués par des ions métalliques et des substances polymériques extracellulaires (SPE) (Beech, 1995);
- le couplage galvanique entre le métal et les SPE (Chan, Xu et al., 2002).

Un des premiers mécanismes proposés pour expliquer la corrosion des aciers par les BSR, était la dépolarisation cathodique où il était supposé que la consommation d'hydrogène moléculaire (issu de la réduction de l'eau ou des protons) par les BSR était l'étape limitante (Kühr and Vlugt, 1934). Cette théorie est largement obsolète et incorrecte si l'on considère que le dégagement d'hydrogène provient de la réduction de l'eau (ou des protons en solution) qui a été montrée comme une réaction irréversible sur acier inoxydable (Videla, 1988; Crolet, 1990; Crolet and Magot, 1996). Néanmoins, des preuves expérimentales de l'augmentation de la corrosion par la consommation de l'hydrogène moléculaire ont été reportées (Rajagopal and LeGall, 1989; Belay and Daniels, 1990). Dans ces expériences, des coupons en acier au carbone étaient immergés dans une solution de phosphate contenue dans une bouteille connectée via la phase gazeuse à une autre bouteille contenant des BSR (fig. I.1). La corrosion a augmenté bien que les BSR n'étaient pas en contact direct avec les coupons. Le même phénomène a été observé dans une expérience similaire mais avec de l'hydrogénase (enzyme utilisée au sein des BSR pour métaboliser l'hydrogène) au lieu des BSR dans la deuxième bouteille (Bryant and Laishley, 1993). En plus, dans ces travaux, il a été démontré qu'il y avait effectivement une consommation de l'hydrogène dans la bouteille contenant l'hydrogénase et que l'augmentation de la corrosion ne se manifestait que lorsqu'il y avait des ions phosphate dans la bouteille contenant les coupons d'acier.

Iverson avait déjà trouvé une implication des phosphates dans la biocorrosion anaérobie des aciers et suggérait que certaines BSR pouvaient réduire les phosphates pour former, en présence du fer, un composé soluble, volatile et corrosive comme le phosphure de fer ( $\text{Fe}_2\text{P}$ ,  $\text{Fe}_3\text{P}$ ) (Iverson, 1968).

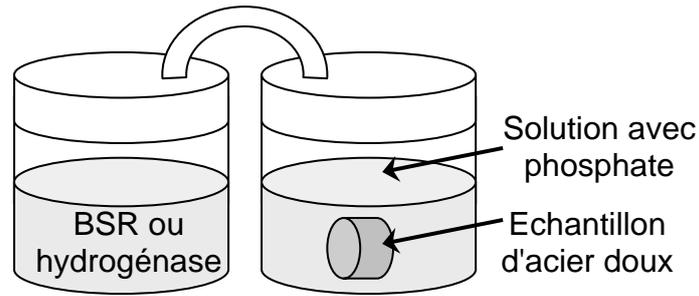


Figure I.1. Schéma de l'expérience réalisée par Rajagopal et Le Grall (1989), Belay et Daniels (1990) et Bryant et Laishley (1990) où il a été démontré que la consommation d'hydrogène avait une influence sur la corrosion de l'acier doux.

Au sein du laboratoire de Génie Chimique, il a été démontré que les atomes d'hydrogène liés aux ions phosphate pouvaient être réduits électrochimiquement sur des électrodes en acier inoxydable selon le mécanisme suivant (Da Silva, Basseguy et al., 2004):

Une réduction électrochimique en deux étapes :



couplée avec l'équilibre acido-basique :



La modélisation mathématique de ce mécanisme a montré que la réaction globale pourrait parfaitement être considérée comme réversible. La réversibilité de cette réaction pouvait alors expliquer l'influence de la consommation de l'hydrogène sur l'augmentation de la corrosion mentionnée précédemment dans les expériences des deux bouteilles. Le fait qu'une réaction soit réversible permet que l'équilibre de la réaction soit déplacé à cause d'une modification des concentrations des produits. Dans le cas de la réaction 7, la consommation d'hydrogène diminue sa concentration près de la surface du métal. Grâce à la réversibilité de la réaction, la diminution de la concentration d'hydrogène, déplace l'équilibre de la réaction dans la direction de la production d'hydrogène. Cela provoque, à son tour, une demande d'électrons plus grande au substrat métallique, ces électrons étant fournis par l'oxydation du métal en ion ; il en résulte donc une augmentation de la corrosion.

## I.2. Réduction des acides faibles et implication dans la corrosion.

Dans la corrosion anaérobie, les accepteurs d'électrons peuvent être des protons en solution, ou des molécules d'eau. Mais, en présence des acides faibles, les atomes d'hydrogène liés à leur base conjuguée pourraient aussi accepter des électrons pour être réduits et participer au processus de corrosion.

Le mécanisme de réduction des acides faibles le plus accepté comprend une étape de dissociation, suivi par la réduction électrochimique du proton libéré (Heyrovsky and Kuta, 1966; Albery, 1975; Daniele, Baldo et al., 1996):



L'étape de dissociation est considérée très rapide car normalement il n'y a pas de limitations chimiques. Mais certaines études ont montré que les atomes d'hydrogène des acides faibles peuvent être réduits directement sans l'étape de dissociation (Stojek, Ciszowska et al., 1994; Marinovic and Despic, 1997; Marinovic and Despic, 1999; Da Silva, Basseguy et al., 2004) :



La formation des ions  $\text{B}^-$  entraîne un déplacement de l'équilibre acido-basique qui est rétabli par la solution :



La réaction de réduction plus l'équilibre acido-basique donnent la réduction de l'eau comme réaction résultante :



Des travaux menés pour étudier la réduction des acides faibles en solution, ont montré que les atomes d'hydrogène qui interviennent dans des réactions d'équilibre acido-basique peuvent être réduits à la cathode avec moins d'énergie que celle nécessaire pour réduire l'eau (Stojek,

## I. Les acides faibles et la biocorrosion anaérobie des aciers.

Ciszkowska et al., 1994; Daniele, Baldo et al., 1996; Marinovic and Despic, 1997; Marinovic and Despic, 1999; Da Silva, Basseguy et al., 2004). Cela est dû à la force des liaisons entre les atomes d'hydrogène et les bases conjuguées des acides faibles. Un acide plus fort aura des liaisons plus faibles avec ses atomes d'hydrogène et par conséquent, ces dernières seront plus faciles à réduire.

Cette propriété est illustrée par les courbes Intensité-Potentiel tracées dans des solutions d'acides faibles (figure I.2). Les caractéristiques typiques de ces courbes sont :

- Un acide plus fort présente une courbe cathodique placée dans une zone de potentiel aux valeurs moins négatives (cas de HA).
- Des acides avec plusieurs constantes de dissociation peuvent présenter des vagues de réduction (cas de H<sub>2</sub>B).
- L'intensité des vagues de réduction est proportionnelle à la concentration de l'acide.

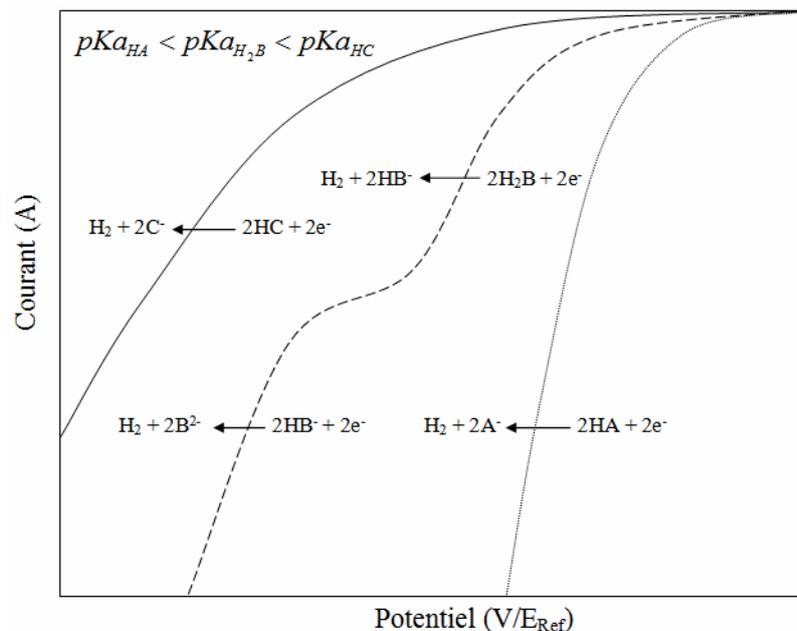


Figure I.2. Représentation schématique de l'influence de la valeur du pKa sur les courbes Intensité-Potentiel liées à la réduction des acides faibles.

Les acides faibles, étant plus faciles à réduire que l'eau, leur présence dans une zone anaérobie d'un biofilm développé sur une surface métallique, peut engendrer une diminution de l'énergie nécessaire pour le déroulement des réactions de réduction du processus de corrosion. Ainsi, la corrosion du métal peut être accélérée.

### **I.3. Le travail réalisé**

Le travail effectué dans ce chapitre est présenté sous forme d'articles qui ont été soumis pour être publiés dans des journaux scientifiques (Corrosion Science et Journal of Electroanalytical Chemistry). Après les articles, une section additionnelle est présentée avec des résultats complémentaires.

L'objectif de ce travail était de mieux comprendre les effets des acides faibles sur la corrosion anaérobie des aciers. Les hypothèses que l'on a essayé de démontrer étaient :

1. Les hydrogènes liés aux acides faibles peuvent être réduits sur des électrodes d'acier avec moins d'énergie que celle nécessaire pour réduire l'eau sur la même électrode. Cette propriété des acides faibles en fait des catalyseurs homogènes de la réduction de l'eau et modifie ainsi la branche cathodique dans la corrosion anaérobie des aciers.
2. La réduction des atomes d'hydrogène liés aux acides faibles sur l'acier est une réaction réversible qui peut accélérer la corrosion anaérobie de l'acier si l'hydrogène moléculaire produit est enlevé du milieu.

Pour démontrer ces hypothèses, différentes études ont été réalisées :

1. Des études électrochimiques de l'influence des acides faibles sur les réactions de réduction sur des électrodes en acier inoxydable et en platine. Les acides faibles utilisés ont été : phosphate, acide gluconique, acide lactique, leucine et lysine.
2. Des études de l'influence du phosphate en présence d'hydrogène moléculaire sur la corrosion de l'acier doux.
3. Des études de l'influence du phosphate et de la leucine en présence d'hydrogène moléculaire sur le potentiel de corrosion de l'acier inoxydable.

Les résultats obtenus ont montré :

1. Les acides faibles utilisés, et très probablement tous les acides faibles existants, ont une réponse électrochimique dans le domaine cathodique sur l'acier inoxydable qui correspond aux résultats obtenus par d'autres chercheurs avec le platine, l'or et l'argent. Ces résultats montrent qu'effectivement, les atomes d'hydrogène liés aux acides faibles peuvent être réduits sur des électrodes d'acier avec moins d'énergie que celle nécessaire pour réduire l'eau.

## I. Les acides faibles et la biocorrosion anaérobie des aciers.

2. Le phosphate augmente considérablement la corrosion de l'acier doux dans un milieu anaérobie.
3. La réaction de réduction des atomes d'hydrogène liés au phosphate est une réaction réversible car la concentration d'hydrogène moléculaire a une influence non négligeable sur la corrosion de l'acier doux dans un milieu phosphate.
4. Les résultats suggèrent que la réduction sur acier inoxydable des atomes d'hydrogène liés à d'autres acides faibles que les phosphates pourrait être aussi une réaction réversible. Il pourrait également être suggéré que, suite à des modifications de surface de l'acier, la réduction directe (non catalysée) de l'eau puisse être réversible.

En conclusion, les acides faibles, substances qui peuvent être présentes dans les biofilms, peuvent catalyser la branche cathodique du processus de corrosion anaérobie des aciers grâce à une cinétique de réaction plus rapide que celle de la réduction de l'eau. En plus, pour certains acides faibles, leur réaction de réduction est réversible et par conséquent peut encore accélérer le processus de corrosion quand il y a un enlèvement de l'hydrogène moléculaire dans le milieu. Cette consommation peut être effectuée par la "respiration" des BSR.



**I.4. Article**

**"Role of the reversible electrochemical  
deprotonation of phosphate species in anaerobic  
biocorrosion of steels."**

Corrosion Science 49 (2007) 3988-4004

<http://dx.doi.org/10.1016/j.corsci.2007.04.003>



## Role of the reversible electrochemical deprotonation of phosphate species in anaerobic biocorrosion of steels

Leonardo De Silva Muñoz, Alain Bergel, Régine Basséguy \*

*Laboratoire de Génie Chimique, CNRS-INPT, 5 rue Paulin Talabot, 31106 Toulouse, France*

Received 16 February 2007; accepted 26 April 2007

### Abstract

Sulphate reducing bacteria are known to play a major role in anaerobic microbiological influenced corrosion of steels, but mechanisms behind their influence are still source of debates as certain phenomena remain unexplained. Some experiments have shown that hydrogen consumption by SRB or hydrogenase increased the corrosion rate of mild steel. This was observed only in the presence of phosphate species. Here the cathodic behaviour of phosphate species on steel was studied to elucidate the role of phosphate in anaerobic corrosion of steel. Results showed: a linear correlation between reduction waves in linear voltammetry and phosphate concentration at a constant pH value; that phosphate ions induced considerable anaerobic corrosion of mild steel, which was sensitive to hydrogen concentration in the solution; and that the corrosion potential of stainless steel in presence of phosphate was shifted to more negative values as molecular hydrogen was added to the atmosphere in the reaction vessel. Phosphate species, and possibly other weak acids present in biofilms, are suggested to play an important role in the anaerobic corrosion of steels via a reversible mechanism of electrochemical deprotonation that may be accelerated by hydrogen removal.

*Keywords:* A. Stainless steel; A. Mild steel; C. Acid corrosion; C. Microbiological corrosion

\* Corresponding author. Tel.: +33 5 34 61 52 51; fax: +33 5 34 61 52 53.  
*E-mail address:* Regine.Basseguy@ensiacet.fr (R. Basséguy).

## 1. Introduction

### 1.1. Phosphates, SRB and hydrogenase in anaerobic biocorrosion

It has been widely demonstrated that sulphate reducing bacteria (SRB) play a major role in the anaerobic microbially influenced corrosion (MIC) of carbon steels [1–6] and stainless steels [7–9]. The mechanisms proposed to explain anaerobic MIC by SRB include: precipitation of iron sulphide, which next catalyzes proton reduction into molecular hydrogen and acts as a cathode in a galvanic couple with metallic iron [10–12]; catalysis of the reduction reaction by a hydrogenase enzyme coming from the bacteria [13]; anodic depolarization resulting from the local acidification at the anode [14]; metal ion chelating by extra cellular polymer substances (EPS) [15] and galvanic coupling with EPS [16]. Some authors have proposed oxygen as the terminal electron acceptor in a more complete model considering various effects of SRB metabolism on steel surfaces in a mixed aerobic/anaerobic system [17–21]. The old mechanism, known as cathodic depolarization, where it was assumed that the consumption of molecular hydrogen (issued from the proton or water reduction) by SRB was the rate-limiting step [22], is now considered to be wrong because hydrogen evolution on steel is an irreversible reaction [23–25]. However, experimental evidence has been provided of hydrogen removal increasing corrosion [12,26]. In these experiments, steel coupons were immersed in a phosphate solution contained in a bottle connected by the gas phase to another bottle that contained SRB. The corrosion rate increased although there was no contact between the SRB and the steel coupons, the only connection between the bottles being through the gas phase. In a similar experiment using the enzyme hydrogenase instead of SRB in the second bottle, Bryant and Laishley [27] also observed an increase in the corrosion rate of carbon steel. By using Methyl Viologen as an electron acceptor, the blue colour observed in the bottle containing hydrogenase confirmed that there was a consumption of hydrogen through the enzyme (reaction (1)).



The authors also found that the increase in corrosion rate induced by hydrogenase was possible only when the steel coupons were immersed in a solution containing phosphate ions. They proposed the following chemical reaction between steel and phosphate ions:



Iverson has also given evidence for the implication of phosphates in anaerobic biotic corrosion [28]. He suggests that phosphate, present in the bacterial culture medium, is reduced by some SRB strains in the presence of iron into a water soluble, volatile, corrosive, phosphorus-containing compound, may be iron phosphide ( $\text{Fe}_2\text{P}$ ).

In a previous work [29] it was proved that the hydrogen atoms of the phosphate species were electrochemically reduced on stainless steel electrodes, according to the following reaction mechanism:

A two step electrochemical reduction:



coupled with the acid–base equilibrium:



This type of reaction system is normally known as an EC' or catalytic electrochemical–chemical mechanism [30]. It should be noted that coupling reactions (3) and (4) with the acid base equilibrium of phosphoric acid (6) leads to water reduction as the global reaction:



The experimental data and the theoretical model proposed showed that a significant quantity of molecular hydrogen was produced by this mechanism, and the model suggested that the global reaction could be considered as reversible [29]. This reversibility may explain the influence of hydrogen removal on corrosion rate observed in the two-bottle experiments previously cited [12,26,27]. Reversible hydrogen production implies the existence of a reaction equilibrium that can be shifted if hydrogen concentration near the cathode is modified. In the case of steel corrosion in the presence of hydrogenase or SRB in solutions containing phosphate ions, the consumption of H<sub>2</sub> formed during the metal corrosion would increase the corrosion rate.

If phosphate species can have such an influence in the MIC of steel, other weak acids may play a similar role. Weak and strong acids are usually found in the microbial colonies or biofilms that develop on inorganic surfaces. In the case of MIC, organic acids are given an acidifying and/or chelating role [31], but there might also influence anaerobic corrosion through the reversible reduction of their hydrogen atoms similar to the mechanism proposed for phosphate.

### 1.2. Weak acid reduction mechanisms

The electrochemical reduction of phosphates and other weak acids on various electrodes has been the subject of several investigations [29,34–45]. The most widely accepted mechanism for the reduction of weak acids is of the CE (chemical–electrochemical) type, where the dissociation of the acid takes place before the electrochemical reduction of free protons [32–34]:



The dissociation step for most weak acids is considered to be very rapid because, in most cases, no chemical limitation is found. Daniele et al. [34] propose that the limiting current obtained on platinum microelectrodes for a weak monoprotic acid depends on the concentration of both undissociated acid and free proton ([HA] and [H<sup>+</sup>]), and on their respective diffusion coefficients ( $D_{\text{HA}}$  and  $D_{\text{H}^+}$ ):

$$I_L = 4Fr(D_{\text{H}^+}[\text{H}^+] + D_{\text{HA}}[\text{HA}]) \quad (10)$$

where  $I_L$  is the steady state limiting current,  $r$  is the electrode radius and  $F$  is the Faraday constant. By considering the dissociation equilibrium of the acid, Canhoto et al. [35] gives Eq. (10) the form:

$$I_L = -4Fr \left( D_{H^+} [H^+] + D_{HA} \frac{[H^+]}{K_a + [H^+]} C_{HA} \right) \quad (11)$$

with  $K_a$  as the dissociation constant and  $C_{HA}$  as the analytical concentration of the weak acid. This model permitted the development of electrochemical techniques for the measurement of total acid and free proton concentration in solutions of strong and weak acids [35–37]. An alternative mechanism has been proposed by other authors who claim that the hydrogen atoms of undissociated weak acids (HA) could be directly reduced without a dissociation step [29,38–40]. Stojek et al. [38] studied the influence of supporting electrolyte in the reduction of polyprotic acids on platinum electrodes. They proposed that, after the electrochemical reduction of the undissociated acid in the presence of a supporting electrolyte, the conjugate base of the acid ( $A^-$ ) reacted with water or with protons ( $H^+$ ) in order to re-establish the acid–base equilibrium in the solution. Marinovic et al. [39,40], using silver electrodes with citric acid and pyrophosphoric acid, have shown that weak acids could lose their hydrogen atoms via the classical CE mechanism (Eqs. (8) and (9)) or via their direct electrochemical reduction (as Eqs. (3) and (4)) and proposed some diagnostic criteria for discriminating between the two mechanisms using curves of current vs. pH at a constant potential or of potential vs. pH at a constant current. O’Neil et al. [41] and Takehara et al. [42] showed that hydrogenated phosphate species may undergo an electrochemical deprotonation on platinum electrodes. As mentioned above, we previously demonstrated the occurrence of this electrochemical deprotonation of phosphate on stainless steel and proposed a reversible reaction mechanism [29].

In order to test experimentally the reversibility of the electrochemical deprotonation of phosphate and the effect that phosphate species could have in the corrosion of carbon and stainless steels, three different types of experiments were carried out here. First, a voltammetric study was performed using stainless steel and platinum rotating disc electrodes to observe the reduction phenomena in phosphate solutions at different concentrations and pH. Then the influence of phosphate species and molecular hydrogen on the anaerobic corrosion of mild steel was observed by measuring the concentration of iron released into the solution under different  $H_2$  partial pressures. Finally, the corrosion potential of stainless steel was measured in order to monitor its sensitivity to both hydrogen concentration and presence of phosphate species.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals

The chemical substances used in the experiments were: dihydrogen potassium phosphate ( $KH_2PO_4$ ; Prolabo), potassium chloride (KCl; Sigma Aldrich), hydrochloric acid (HCl; Acros Organics), potassium hydroxide (KOH, Prolabo), deionised water (ELGA PURELAB Option-R, 10–15  $M\Omega$  cm).

### 2.2. Voltammetric study

The experiments were performed in a three-electrode cell (Metrohm) using a Solartron 1286 potentiostat. The working electrode was a rotating disk made of platinum

(2 mm diameter) or AISI 316L<sup>1</sup> stainless steel (5 mm diameter) embedded in Teflon<sup>®</sup>. Both rotating electrodes were purchased from Radiometer. The rotation speed was controlled by a Radiometer CTV101 speed control unit. The counter-electrode was a grid made of a platinum–iridium alloy (10% iridium) and a saturated calomel electrode was used as the reference electrode (Radiometer Analytical). Experiments were carried out in solutions containing potassium chloride as the supporting electrolyte (100 mM) and different phosphate concentrations at various pH.

Before each voltammetric experiment, the working electrode was polished with a 1 µm grade abrasive sheet (3M 262x Imperial) and then ultrasonically cleaned in deionised water for 5 min. Before introducing the electrode into the cell, the solution was deoxygenated with a nitrogen gas flux for 15 min. The nitrogen flux was maintained above the solution throughout the experiment. Then, with a rotation speed of 1000 rpm, the linear voltammetry curves were drawn from  $-0.1$  V/SCE for the platinum electrode and from  $-0.5$  V/SCE for the stainless steel electrode to  $-1.1$ ,  $-1.3$  or  $-1.5$  V/SCE at 20 mV/s.

### 2.3. Corrosion study

XC48<sup>2</sup> carbon steel coupons were embedded in a resin (Epofix from Struers) with only one flat face left exposed (surface area between 6 and 7 cm<sup>2</sup>). The exposed surface was polished with abrasive paper from grade P400 to grade P4000 (LAM PLAN). The coupons were then immersed in 25 mL deoxygenated deionised water or phosphate solution. The pH of the phosphate solutions was adjusted with KOH to the pH value of the deionised water ( $5.7 \pm 0.1$ ). Before the immersion of the coupons, the dissolved oxygen was removed using pure nitrogen or hydrogen gas flux bubbling for 15 minutes. After at least 3 h of immersion, the concentration of the iron released in the solution was measured by ICP spectroscopy (JY-Ultima) and the coupons were examined visually.

### 2.4. Potentiometric study

The experiments were performed in a 50 mL closed plexiglass reactor using a Solartron 1286 potentiostat. A 316L stainless steel electrode was embedded in a resin (Combisub T 150 from Chryсор) with only one flat face left exposed (3.14 cm<sup>2</sup>). The exposed surface was polished with abrasive paper from grade P400 to grade P4000 (LAM PLAN) and ultrasonically cleaned in deionised water for 5 min. The counter-electrode was a grid of platinum–iridium alloy (10% iridium) and a saturated calomel electrode was used as the reference electrode (Radiometer Analytical). The electrodes were immersed in 25 mL deoxygenated 100 mM KCl solution with or without 1 mM phosphate at pH = 8.0. The dissolved oxygen was removed by nitrogen bubbling in the solution for 15 min then the gas flux was left on above the solution. Potentiostatic electrolysis was performed at  $-0.6$  V/SCE for 5 min. Then corrosion potential was plotted vs. time by measuring the open circuit potential (OCP). After each hour of measurement, the composition of the gas that flowed over the solution was modified by mixing N<sub>2</sub> and H<sub>2</sub> at atmospheric pressure using flowmeters (Sho-Rate from Brooks) to control the composition of the mixture.

<sup>1</sup> AISI 316L composition in percentage: C 0.03; Cr 17; Fe 65; Mn 2; Mo 2.5; Ni 12; S 0.03; P 0.045; Si 1.

<sup>2</sup> XC48 composition in percentage: C 0.45–0.51; S  $\leq$  0.035; P  $\leq$  0.035; Si 0.10–0.40; Mn 0.50–0.80.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Voltammetric study

Linear voltammetry was performed with platinum (Fig. 1a) and stainless steel (Fig. 1b) rotating disk electrodes in 25 mL of deoxygenated solution with different phosphate concentrations (10, 50, 150, 500 mM) at pH = 8.0 and with KCl 100 mM as supporting electrolyte.

A reduction wave was observed, starting at approximately  $-0.7$  V/SCE for the platinum (Fig. 1a) and  $-0.9$  V/SCE for the stainless steel (Fig. 1b). For both electrodes the current density values of the waves were of the same order of magnitude with the same concentration of phosphate. The reduction current density depended strongly on phosphate concentration (Fig. 2). In Fig. 2a, the points report the current density value at  $-0.85$  and

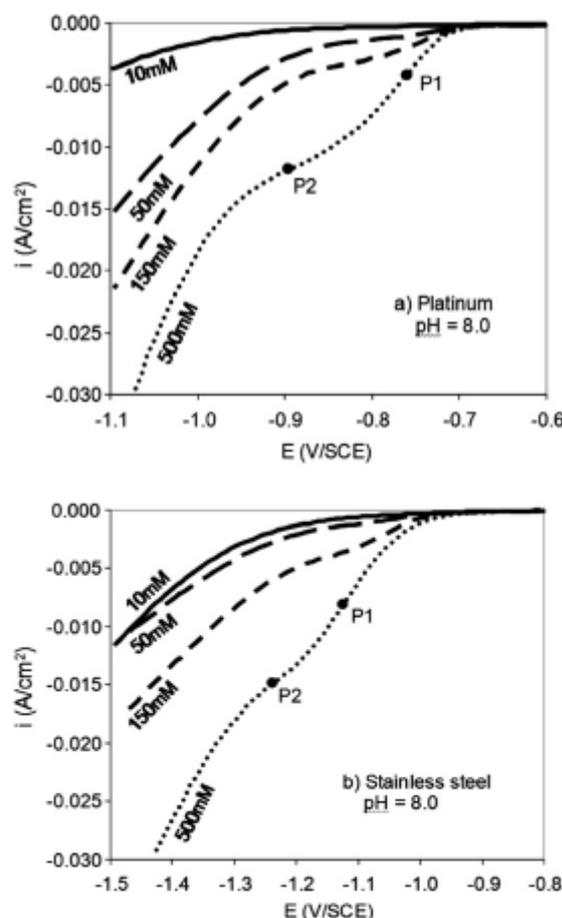


Fig. 1. Voltammetry curves (scan rate = 20 mV/s) obtained with platinum (a) and stainless steel (b) rotating disk electrodes (1000 rpm) in solutions containing different phosphate concentrations (10, 50, 150 and 500 mM) and 100 mM KCl as supporting electrolyte, pH = 8.0. The inflection points on the curves with 500 mM are marked as P1 and P2.

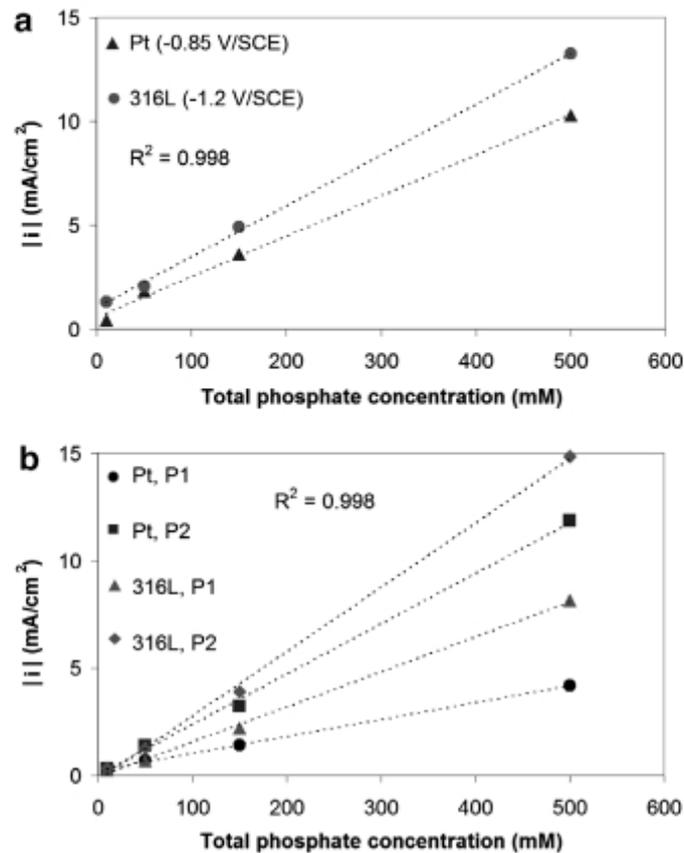


Fig. 2. (a) Current density vs. phosphate concentration at  $-0.85$  V/SCE for platinum from Fig. 1a and at  $-1.20$  V/SCE for 316L stainless steel from Fig. 1b. (b) Current density vs. phosphate concentration at the first (P1) and second (P2) inflection points of the waves from Fig. 1a and b for platinum and 316L stainless steel.

$-1.20$  V/SCE for the platinum and stainless steel electrodes respectively. In Fig. 2b, the points correspond to the current density value at the inflection points of the wave, like P1 and P2 shown in Fig. 1. The first inflection point (P1) corresponds to the initial exponential increase of the wave, and the second one (P2) is the point corresponding to the stabilisation of the wave and the starting point of the next process due to water reduction. Both approaches showed a linear relationship between current density and phosphate concentration. This linear dependency has already been observed by other authors in the steady state limiting reduction current with other weak acids such as acetic, ascorbic, monochloroacetic, lactic and  $\text{HSO}_4^-$  [43–45]. Nevertheless, the dependency between current density and weak acid concentration has not always been found to be linear [34,35] because higher acid concentration induced a higher free proton concentration (reaction (8)) and, following Eq. (11), a higher proton contribution to the reduction current [35]. However, in this work, controlling the pH of the solution avoided the occurrence of this phenomenon, and only a linear behaviour was observed in our results.

The results clearly show that the cathodic wave corresponded to the reduction of a species whose concentration was directly proportional to the phosphate content in the

solution as Daniele et al. suggested with Eq. (10) [34]. At constant pH, the increase in the cathodic current with total phosphate concentration cannot be attributed to an increase in proton concentration, which remained the same in each experiment. Furthermore at pH 8.0 the proton concentration was too small to explain the high current signal. At this pH, the predominant phosphate species involved in the reduction reaction were  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  and  $\text{HPO}_4^{2-}$  (14% and 86% of total phosphate respectively<sup>3</sup>). The electrochemical reaction, which consumed hydrogen atoms of the phosphate species, perturbed the acid-base equilibrium, which was then re-established by the dissociation of water molecules, resulting in the EC' mechanism proposed by Da Silva (reactions (3), (4) and (6)) giving:

For  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$



and for  $\text{HPO}_4^{2-}$



A chemical–electrochemical (CE) mechanism may occur in the absence of supporting electrolyte where the excess negative charge at the cathode can attract protons and repel the negatively charged phosphate ions [38]. In our case however, the supporting electrolyte eliminated the charge influences on the diffusion of protons and phosphate species.

The waves observed in Fig. 1 may be attributed to diffusion controlled limitations in the reduction reaction [34], but complex reaction kinetics cannot be fully discarded. Reduction waves of this kind were also obtained in a study carried out in a thin spectro-electrochemical cell with a cell thickness from 0.24 to 0.39 mm [29]. In such a cell, diffusion limitation cannot be the cause of such behaviour. The limitation was believed to come from electrochemical kinetics of the direct reduction of the phosphate species that involved adsorption and desorption steps. Another study, using platinum microelectrodes, has indicated that the obtained limiting currents for  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  reduction were not predictable by Eq. (10) [34] and it has been hypothesized that the dissociation step might be the limiting phenomenon.

Linear voltammetry curves were recorded with a stainless steel electrode in 150 mM phosphate solution at different pH values (Fig. 3). In general, lower pH values gave higher cathodic current intensities. At 1.0 V/SCE, the current density values were  $-0.7$  and  $-38 \text{ mA/cm}^2$  at pH 8.0 and pH 1.5, respectively. Nevertheless the curves plotted at pH 4.0 and 6.0 were very close to each other. At these two pH values, the most abundant form of phosphoric acid was  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  with almost the same concentration (99% of the total phosphate concentration at pH 4.0, and 94% at pH 6.0). The current obtained at pH 1.5 was much higher because, on one hand, the proton concentration was higher and could contribute significantly to the reduction current and, on the other hand, the predominant phosphate species was no longer  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  but  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (82% of the total phosphate concentration).  $\text{H}_3\text{PO}_4$  has a higher dissociation constant than  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  ( $10^{-2.16}$  for  $\text{H}_3\text{PO}_4$  and  $10^{-7.21}$  for  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  [46]). The dissociation constant of an acid is related to the bond

<sup>3</sup> Calculations in Appendix.

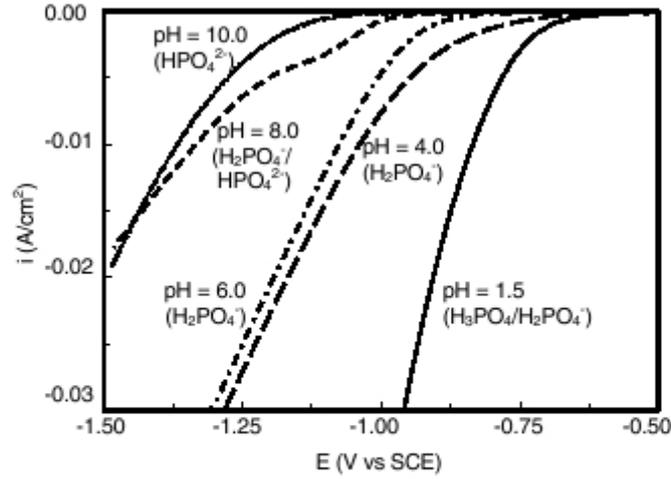


Fig. 3. Voltammetry curves (scan rate = 20 mV/s) obtained with stainless steel rotating disk electrode (1000 rpm) in solutions at different pH with 150 mM phosphate and 100 mM KCl as supporting electrolyte. Predominant phosphate species are indicated for each curve.

strength between its hydrogen atoms and the rest of the molecule. Higher dissociation constants mean weaker bond strength. This is why Daniele et al. [34] found that the reduction curves of weak acids appeared at less negative potentials as the dissociation constant of the acid increased. To illustrate the relation between the bond strength and the dissociation constant of an acid, the relationship between the Gibbs energy and the equilibrium constant of the acid base equilibrium ( $K_a$ ) can be used:



where  $\Delta G_r^0$  is the Gibbs energy of the reaction,  $R$  is the gas constant and  $T$  is the temperature.  $\Delta G_r^0$  would be the energy necessary to break the bond between  $\text{H}^+$  and  $\text{A}^-$ , i.e. to dissociate HA. Comparing  $\Delta G_r^0$  values for the different phosphate species (Table 1), confirms that  $\Delta G_r^0$  is the lowest for  $\text{H}_3\text{PO}_4$  and the highest for water. Thus, it is natural to observe lower reduction potentials with more protonated species.

Results from the voltammetric study show that the reduction of water is possible on stainless steel electrodes at a lower potential in presence of hydrogenated phosphate species. This means that phosphate and probably other weak acids can lower the

Table 1  
Dissociation constants and calculated Gibbs energy for the dissociation of phosphate species and water at 25 °C and 1 atm [46]

Species	$K_a$	$\Delta G_r^0$ (kJ/mol) (for $T = 25$ °C)
$\text{H}_3\text{PO}_4$	$10^{-2.16}$	12.33
$\text{H}_2\text{PO}_4^-$	$10^{-7.21}$	41.15
$\text{HPO}_4^{2-}$	$10^{-12.32}$	70.32
$\text{H}_2\text{O}$	$10^{-13.99}$	79.85

overpotential of the cathodic branch in the anaerobic corrosion of steel at near-neutral pH values and in this way enhance the corrosion process.

### 3.2. Corrosion study

Corrosion experiments were performed using mild steel coupons (XC48) submerged in phosphate solutions in different anaerobic conditions (Table 2): Constant nitrogen or hydrogen bubbling with the gas bubbles passing over the steel surface (conditions a–d); hermetically closed vessel with nitrogen or hydrogen at different pressures (conditions e–f). After at least 3 h of immersion, the iron released to the solution was measured by ICP spectroscopy.

With constant nitrogen bubbling, a carbon steel coupon was immersed in a deoxygenated 150 mM phosphate solution at  $\text{pH } 5.7 \pm 0.1$ . A thick, non-conductive deposit covered the entire steel surface after 3 h of immersion (Fig. 4). This deposit may result from the precipitation of compounds made of phosphate ions and dissolved iron like vivianite ( $\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ ) or iron phosphate ( $\text{FePO}_4$ ). These compounds are known to form a corrosion inhibiting layer on steel surfaces [47,48].

The experiment was repeated in deionised water ( $\text{pH } 5.7 \pm 0.1$ ). After 7 h of immersion, the iron contents in the solution of the three performed tests were 0.15, 0.17 and 0.20 mg/l (Fig. 5, condition b). In contrast, in a 0.5 mM phosphate solution, the dissolved iron concentration attained 5.62, 5.66 mg/l and a high disparate value of 10.88 mg/l (Fig. 5, condition c). When hydrogen was used instead of nitrogen, the iron concentration values were 6.18, 5.44 and 0.002 mg/l (Fig. 5, condition d). It may be concluded that, except the aberrant points of 10.88 and 0.002 mg/l, no significant difference between the use of hydrogen or nitrogen was found.

Table 2  
Experimental conditions of the performed corrosion experiments

Condition name	Condition description	Medium	Immersion time (h)
a	Constant nitrogen flux in the solution over the exposed steel surface	Phosphate 150 mM, pH = 5.6	3
b	Constant nitrogen flux in the solution over the exposed steel surface	H <sub>2</sub> O pH = 5.6	7
c	Constant nitrogen flux in the solution over the exposed steel surface	Phosphate 0.5 mM, pH = 5.8	7
d	Constant hydrogen flux in the solution over the exposed steel surface	Phosphate 0.5 mM, pH = 5.8	7
e	Closed after deoxygenating with N <sub>2</sub>	Phosphate 0.5 mM, pH = 5.8	7
f	Pressurized at 200 kPa with H <sub>2</sub> after deoxygenating with H <sub>2</sub>	Phosphate 1 mM, pH = 5.7	3
g	Pressurized at 300 kPa with H <sub>2</sub> after deoxygenating with H <sub>2</sub>	Phosphate 1 mM, pH = 5.7	3
h	Pressurized at 400 kPa with H <sub>2</sub> after deoxygenating with H <sub>2</sub>	Phosphate 1 mM, pH = 5.7	3
i	Pressurized at 500 kPa with H <sub>2</sub> after deoxygenating with H <sub>2</sub>	Phosphate 1 mM, pH = 5.7	3

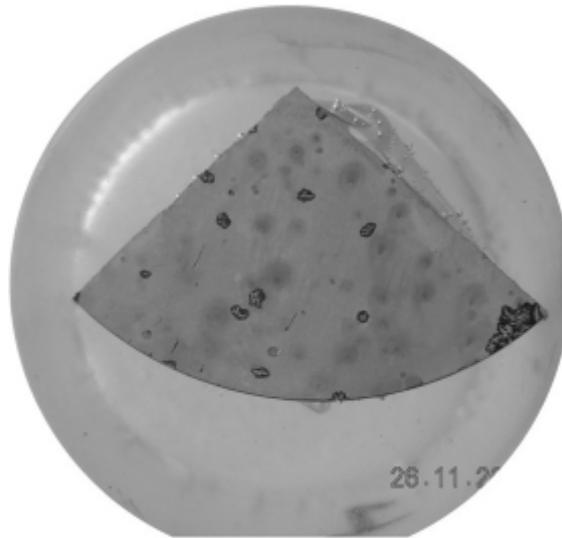


Fig. 4. Photograph of a mild steel coupon after 3 h of immersion in a deoxygenated 150 mM phosphate solution at pH = 5.6 (condition a from Table 2).

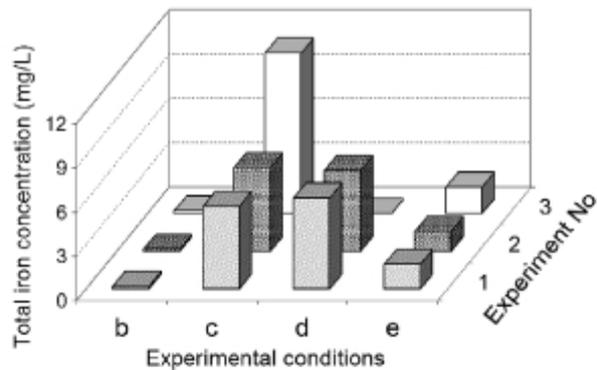


Fig. 5. Experimental values of the total iron concentration in the solution after 7 h of immersion of a mild steel coupon in four different conditions: b-e, from Table 2.

Another type of experiment was performed with the 0.5 mM phosphate solution where the vessel was kept hermetically closed after deoxygenating with  $N_2$ . The total iron concentration in the solution was considerably lower than in the case with continuous gas bubbling, attaining only 1.67, 1.34 and 1.78 mg/l (Fig. 5, condition e). An explanation for the difference of iron concentration between the conditions c and d (where constant gas bubbling was present) and condition e (where the vessel was hermetically closed) could be that bubbling removed the iron ions produced by the corrosion process from the vicinity of the steel surface and thus limited the precipitation of the protective layer (vivianite and/or iron phosphate). In this way the iron dissolution process could go on.

All the steel coupons immersed in the presence of phosphate were corroded and showed a blue-grey deposit on the steel surface, probably made of iron phosphate salts as mentioned above (Fig. 6c-e). No significant visual difference was observed between the three

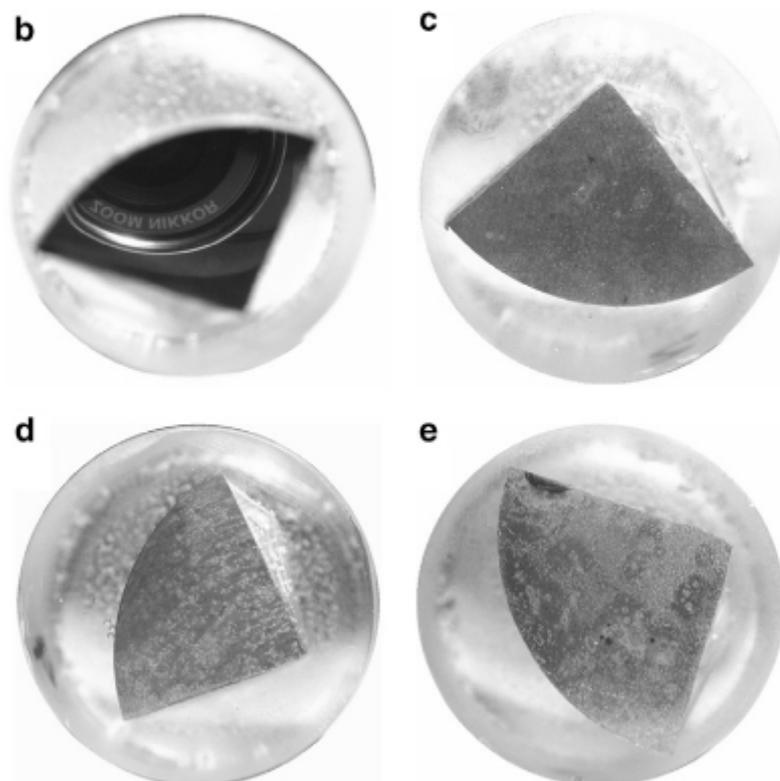


Fig. 6. Photographs of mild steel coupons after 7 h of immersion under conditions: b–e from Table 2.

corroded surfaces. In contrast, the steel coupon surface used in the absence of phosphate showed no sign of corrosion or deterioration (Fig. 6b).

Supplementary experiments were carried out in phosphate solution using pressures of hydrogen from 200 to 500 kPa (Table 2). The total iron concentration was measured after 3 h of immersion. Each condition was carried out four times (series S1, S2, S3 and S4). A higher hydrogen pressure meant a higher hydrogen content in the solution following Henry's law:  $P = kC$  where  $P$  is the partial pressure (atm) of the solute above the solution,  $k$  is Henry's constant ( $7.8 \times 10^{-4}$  l atm/mol) and  $C$  is the concentration of the solute in the solution (M). For pressures from 200 to 400 kPa, i.e. for  $H_2$  contents from  $1.5$  to  $3.1 \times 10^{-3}$  M, the average values of the total iron concentration decreased from 1.2 to 0.5 mg/l (Fig. 7). Higher hydrogen content produced smaller corrosion rates. A higher proportion of hydrogen in the solution could shift the equilibrium (12) and (13) in the sense of the  $H_2$  oxidation, decreasing the cathodic electron transfer rate and consequently decreasing the corrosion rate of the metal. This general behaviour was observed for each series. Nevertheless, the iron concentration obtained in the experiments carried out at 500 kPa did not follow this pattern. This may be due to an increase in the corrosion rate caused by hydrogen as has been found in some studies where hydrogen increased the corrosion rate and decreased the pitting resistance of iron and some steel alloys [49–52].

The results reported in Fig. 7 present a large dispersion in the measured iron concentration for each pressure. Actually, the iron concentration in the solution was the result

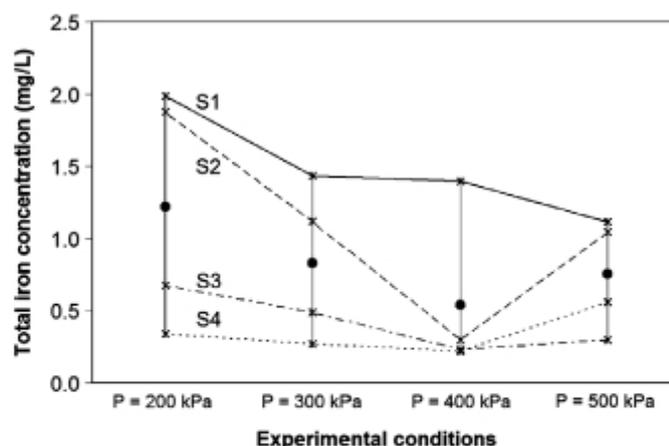


Fig. 7. Experimental (\*) and average (●) values of the total iron concentration released after a 3 h immersion of a mild steel coupon in a 1 mM phosphate solution with hydrogen gas under different pressures: 200, 300, 400 and 500 kPa (absolute) which correspond approximately to the dissolved hydrogen concentrations of 1.5, 2.3, 3.1, 3.8 mM respectively. Four identical series of experiments were performed (S1, S2, S3 and S4).

from to two opposing phenomena: iron dissolution produced from the corrosion process and iron phosphate salt precipitation that can inhibit corrosion of the steel surface. This complex chemical system made it difficult to obtain good reproducibility among experiments. Nevertheless it should be remarked that each experiment series separately revealed exactly the same general evolution of the measured iron concentrations with the increase of hydrogen pressure.

The iron content in the solution, being an indirect measurement of the corrosion rate of the steel coupon, confirmed that the presence of phosphate, even at low concentrations and near neutral pH values, can significantly increase the corrosion rate of mild steel in anaerobic conditions and showed that this influence is sensitive to the presence of hydrogen. If the hydrogen content in the solution shifts the equilibrium of the cathodic part of the corrosion process, then the presence of hydrogen should modify the corrosion potential.

### 3.3. Potentiometric study

The corrosion potential of 316L stainless steel electrodes immersed in 100 mM KCl solution, with or without 1 mM phosphate, was measured under different atmospheres composed of an H<sub>2</sub> and N<sub>2</sub> mixture (Table 3). The gas mixture flowed over the solution inside the closed vessel. Starting with pure nitrogen, the composition of the mixture was changed every hour by adding hydrogen to the gas flux.

When the solution contained only KCl, the corrosion potential increased and it was not influenced by the presence of hydrogen. On the contrary, with 1 mM phosphate, the potential increased when pure N<sub>2</sub> was used and decreased when hydrogen was added to the gas mixture that flowed inside the cell (Fig. 8). These results show that hydrogen has an influence on the corrosion potential of stainless steel, making it less vulnerable to the corrosion process. This was possible only when phosphate species were present in the solution.

Table 3

Corrosion potential measurement experiments carried out with a 316L stainless steel electrode.  $F_{H_2}$  and  $F_{N_2}$  are the volumetric flows of hydrogen and nitrogen respectively

Condition name	Medium	$F_{H_2}/(F_{N_2} + F_{H_2}) * 100$ (1 h for each mixture)
'KCl'	KCl 100 mM pH = 8.0	0
		33
		66
		100
'Phos-A'	Phosphate 1 mM KCl 100 mM pH = 8.0	0
		33
		66
		100
'Phos-B'	Phosphate 1 mM KCl 100 mM pH = 8.0	0
		25
		50
		75

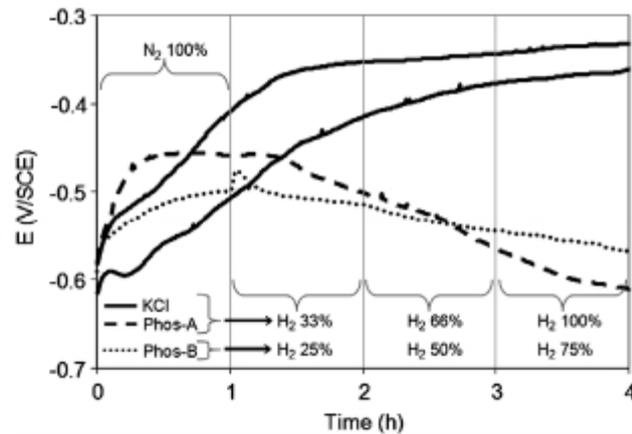


Fig. 8. Variation of the corrosion potential of stainless steel (316L) in 100 mM KCl solution ('KCl', —) and 1 mM phosphate, 100 mM KCl solution (Phos-A, - - - and 'Phos-B', ..... ) at pH 8.0 with different  $H_2/N_2$  atmosphere mixtures (Table 3).

The decrease of the corrosion potential of stainless steel with the increase of hydrogen partial pressure is in accordance with Nernst's law applied to Eq. (12):

$$E = E^0 + \frac{RT}{2F} \ln \left( \frac{[H_2PO_4^-]^2}{P_{H_2}[HPO_4^{2-}]^2} \right) \quad (15)$$

The equilibrium potential of the reduction reaction should decrease as hydrogen concentration increases. Such an influence of hydrogen on the corrosion potential is possible only if the reduction reactions (12) and (13) are reversible. So removing hydrogen from the surface of the steel by any process (consumption via SRB respiration or hydrogenase-catalyzed oxidation, physical removal, etc.) can shift the equilibrium, in

the sense of hydrogen production, so increase the electron transfer and lead to a higher corrosion rate.

#### 4. Conclusion

In the present work, the influence of phosphate species on the corrosion of mild steel and stainless steel was studied using linear voltammetry, open circuit potential and dissolved iron measurements. The results show that: there is a linear correlation between reduction waves and phosphate concentration at pH 8.0 observed on platinum and stainless steel electrodes; these waves correspond to the reduction of one hydrogen atom of protonated phosphate species, and the potential necessary for this reduction to occur is lower for more protonated species; phosphate ions induce considerable anaerobic corrosion of mild steel, which is sensitive to hydrogen concentration in the solution; the corrosion potential of stainless steel in presence of phosphate is shifted to more negative values as molecular hydrogen is added to the atmosphere in the reaction vessel.

All these results show that hydrogenated phosphate species play an important role in anaerobic corrosion of steels by its lower-than-water reduction overpotential and its reversible reduction mechanism. The reversibility of the cathode reaction may now clearly explain the results obtained already, particularly with the so-called two-bottle experiments [12,26,27]. These experiments have demonstrated that corrosion of steel is enhanced by the consumption of hydrogen from the gas phase by SRB or free hydrogenases contained in a second bottle. Production of hydrogen by the reversible electrochemical deprotonation of phosphate species on the steel surface is the sole hypothesis that may now fully explain these observations. The electrochemical deprotonation of phosphate introduces a new reversible cathodic reaction that sustains the hypothesis of corrosion enhancement by the consumption of molecular hydrogen. Moreover, most of the biocorrosion studies using SRB or hydrogenases have been carried out with phosphate buffer, which may significantly wander the laboratory studies from the natural conditions. These studies should now deserve revisiting. The possible similar role of weak acids that may be present in natural biofilms should also be assessed. Work is in progress in this direction.

#### Acknowledgements

This work has been possible thanks to the financial support of CONACYT (Mexico) and CEA-Saclay (France). Authors of this work are thankful to Dr. Damien FERON (CEA-Saclay) for his contribution to fruitful discussions.

#### Appendix

The abundance of the different phosphate species as a function of pH (Fig. A.1) was calculated using the phosphoric acid dissociation constants [42]:

$$K_{a1} = 10^{-2.16}$$

$$K_{a2} = 10^{-7.21}$$

$$K_{a3} = 10^{-12.32}$$

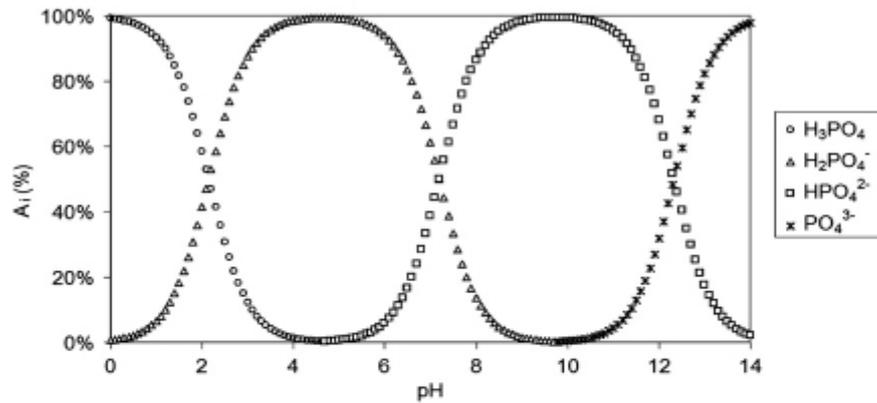


Fig. A.1. Abundance of the species  $i$  as a percentage of the total phosphate concentration vs. pH ( $i = \text{H}_3\text{PO}_4, \text{H}_2\text{PO}_4^-, \text{HPO}_4^{2-}, \text{PO}_4^{3-}$ ).

and the equations below:

$$A_{\text{PO}_4^{3-}} = \frac{1}{\frac{[\text{H}^+]^3}{K_{a1}K_{a2}K_{a3}} + \frac{[\text{H}^+]^2}{K_{a2}K_{a3}} + \frac{[\text{H}^+]}{K_{a3}} + 1} * 100$$

$$A_{\text{H}_3\text{PO}_4} = \frac{[\text{H}^+]^3}{K_{a1}K_{a2}K_{a3}} * A_{\text{PO}_4^{3-}}$$

$$A_{\text{H}_2\text{PO}_4^-} = \frac{[\text{H}^+]^2}{K_{a2}K_{a3}} * A_{\text{PO}_4^{3-}}$$

$$A_{\text{HPO}_4^{2-}} = \frac{[\text{H}^+]}{K_{a3}} * A_{\text{PO}_4^{3-}}$$

where  $[\text{H}^+]$  is the proton concentration and  $A_i$  is the abundance of the species  $i$  as a percentage of the total phosphate concentration.

## References

- [1] I.P. Pankhania, *Biofouling* 1 (1988) 27.
- [2] I.T.E. Fonseca, M.J. Feio, A.R. Lino, M.A. Reis, V.L. Rainha, *Electrochimica Acta* 43 (1998) 213.
- [3] E.S. McLeod, Z. Dawood, R. MacDonald, M.C. Oosthuizen, J. Graf, P.L. Steyn, V.S. Brozel, *Systematic and Applied Microbiology* 21 (1998) 297.
- [4] G. Chen, C.R. Clayton, *Journal of Electrochemical Society* 145 (1998) 1914.
- [5] T.S. Rao, T.N. Sairam, B. Viswanathan, K.V.K. Nair, *Corrosion Science* 42 (2000) 1417.
- [6] M.J. Hernández Gayosso, G. Zavala Olivares, N. Ruiz Ordaz, C. Juárez Ramirez, R. García Esquivel, A. Padilla Viveros, *Electrochimica Acta* 49 (2004) 4295.
- [7] A.M. Brennenstuhl, T.S. Gendron, R. Cleland, *Corrosion Science* 35 (1993) 699.
- [8] P. Angell, K. Urbanic, *Corrosion Science* 42 (2000) 897.
- [9] J.J. Santana Rodríguez, F.J. Santana Hernández, J.E. González González, *Corrosion Science* 48 (2006) 1265.
- [10] R.A. King, J.D.A. Miller, *Nature* 233 (1971) 491.
- [11] R.A. King, J.D.A. Miller, *British Corrosion* 8 (1973) 137.
- [12] B.S. Rajagopal, J. Le Gall, *Applied Microbiology and Biotechnology* 31 (1989) 406.
- [13] S. Da Silva, R. Basseguy, A. Bergel, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 561 (2004) 93.
- [14] W.A. Hamilton, W. Lee, *Biocorrosion*, in: L.L. Barton (Ed.), *Sulfate Reducing Bacteria*, Plenum Press, New York, 1995, pp. 243–264.

- [15] I.B. Beech, *International Biodeterioration and Biodegradation* 35 (1995) 59.
- [16] K.Y. Chan, L.C. Xu, H.H.P. Fang, *Environmental Science & Technology* 36 (2002) 1720.
- [17] P.H. Nielsen, W. Lee, Z. Lewandowski, M. Morrison, W.G. Characklis, *Biofouling* 7 (1993) 267.
- [18] W. Lee, Z. Lewandowski, S. Okabe, W.G. Characklis, R. Avci, *Biofouling* 7 (1993) 197.
- [19] W. Lee, Z. Lewandowski, M. Morrison, W.G. Characklis, R. Avci, P.H. Nielsen, *Biofouling* 7 (1993) 217.
- [20] W. Lee, Z. Lewandowski, P.H. Nielsen, W.A. Hamilton, *Biofouling* 8 (1995) 165.
- [21] W.A. Hamilton, *Biofouling* 19 (1) (2003) 65.
- [22] C.A.H. Von Wolzogen Kühr, S. Van Der Vlugt, *Water* 18 (1934) 147.
- [23] H.A. Videla, *Corrosion Science* 9 (1988) 585.
- [24] J.L. Crolet, *Matériaux et Techniques, Spécial Biocorrosion* (1990) 9.
- [25] J.L. Crolet, M. Magot, *Materials Performance* 35 (3) (1996) 60.
- [26] N. Belay, L. Daniels, *Antonie van Leeuwenhoek* 57 (1990) 1.
- [27] R.D. Bryant, L. Laishley, *Applied Microbiology and Biotechnology* 38 (1993) 824.
- [28] W.P. Iverson, *Nature* 217 (1968) 1265.
- [29] S. Da Silva, R. Basséguy, A. Bergel, *Electrochimica Acta* 49 (2004) 4553.
- [30] A. Molina, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 583 (2005) 193.
- [31] W. Sand, *International Biodeterioration & Biodegradation* 40 (1997) 183.
- [32] J. Heyrovsky, J. Kuta, *Principles of Polarography*, Academic Press, New York, 1966.
- [33] W.J. Albery, *Electrode Kinetics*, Clarendon Press, Oxford, 1975.
- [34] S. Daniele, I. Lavagnini, M.A. Baldo, F. Magno, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 404 (1996) 105.
- [35] C. Canhoto, M. Matos, A. Rodrigues, M.D. Geraldo, M.F. Bento, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 570 (2004) 63.
- [36] S. Daniele, C. Bragato, M.A. Baldo, G. Mori, M. Giannetto, *Analytica Chimica Acta* 432 (2001) 27.
- [37] S. Daniele, C. Bragato, M.A. Baldo, *Electrochimica Acta* 52 (2006) 54.
- [38] Z. Stojek, M. Ciszowska, J.G. Osteryoung, *Analytical Chemistry* 66 (1994) 1507.
- [39] V. Marinović, A.R. Despić, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 431 (1997) 127.
- [40] V. Marinović, A.R. Despić, *Electrochimica Acta* 44 (1999) 4073.
- [41] P. O'Neil, F. Busi, V. Concialini, O. Tubertini, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 284 (1990) 59.
- [42] K. Takehara, Y. Ide, T. Nakatazato, N. Yora, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 293 (1990) 285.
- [43] M. Ciszowska, Z. Stojek, S.E. Morris, J.G. Osteryoung, *Analytical Chemistry* 64 (1992) 2372.
- [44] S. Daniele, M.A. Baldo, F. Simonetto, *Analytica Chimica Acta* 331 (1996) 117.
- [45] S. Daniele, I. Lavagnini, M.A. Baldo, F. Magno, *Analytical Chemistry* 70 (1998) 285.
- [46] *Dissociation Constants of Inorganic Species*, in: David R. Lide (Ed.), *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 87th ed., Taylor and Francis, Boca Raton, FL, Internet Version, 2007.
- [47] Hauke Harms et al., *Corrosion Science* 45 (2003) 1717.
- [48] S. Da Silva, R. Basséguy, A. Bergel, *Electrochimica Acta* 49 (2004) 2097.
- [49] H. Yashiro, B. Pound, N. Kumagai, K. Tanno, *Corrosion Science* 40 (1998) 781.
- [50] Q. Yang, J.L. Luo, *Thin Solid Films* 371 (2000) 132.
- [51] J.G. Yu, J.L. Luo, P.R. Norton, *Electrochimica Acta* 47 (2002) 1527.
- [52] J.G. Yu, J.L. Luo, P.R. Norton, *Electrochimica Acta* 47 (2002) 401.



**I.5. Article**

**"Weak acids as catalysts of the cathodic reaction in anaerobic biocorrosion of steel"**

Article à soumettre.



**Weak acids as catalysts of the cathodic reaction in anaerobic biocorrosion of steel**

DE SILVA MUÑOZ Leonardo, BASSEGUY Régine, BERGEL Alain

Laboratoire de Génie Chimique (CNRS-INPT), 5 rue Paulin Talabot, 31106 Toulouse France

Leonardo.DeSilvaMunoz@ensiacet.fr, Regine.Basseguy@ensiacet.fr,

Alain.Bergel@ensiacet.fr

*Abstract*

Voltammetric studies on 316L stainless steel were performed in phosphate, lactic acid, gluconic acid, and for the first time, in amino acid solutions (leucine and lysine). Results show that the studied weak acids can undergo an electrochemical deprotonation (ED) that strips their weakly bonded hydrogen atoms, which are more easily reduced than those linked to the water molecule. This results in higher cathodic currents that depend on the concentration of the weak acids and their dissociation constants. This phenomenon may play an important role in anaerobic corrosion of metals covered by biofilms where large numbers and varieties of acidic groups and compounds are normally present.

*Introduction*

Weak acids produced by the microbial activity in biofilms have been known to enhance corrosion of metals. Their influence in corrosion has been attributed to the acidification of the media at the vicinity of the metal and to the ability of some of them to form chelates with the metal ions produced during the corrosion process causing ion concentration cells [1]. Some weak acids can also act as corrosion inhibitors by forming a protective layer on the metals surface that can be mineral or organic. An example of mineral layer is vivianite ( $\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8(\text{H}_2\text{O})$ ) which can be formed on iron surfaces exposed to phosphate solutions [2]. Organic protective layers are formed in the presence of some amino acids which can develop complex 3D structures constituted of corrosion products and inhibitor [3].

In the practice of iron phosphating, which is the deliberate exposure of iron or steel to phosphoric acid solutions in order to produce a protective layer on the metal, it is known that the clean iron surface is first attacked by phosphoric acid and then the protective layer is formed thanks to the combination of phosphate with the released iron ions [4]. The attack of phosphate on mild steel in anaerobic conditions has been confirmed recently [5] and was

explained as catalytic process where the phosphate species suffered an electrochemical deprotonation according to (1,2):



The production of  $\text{HPO}_4^{2-}$  and  $\text{PO}_4^{3-}$ , was compensated by the dissociation of water molecules:



The overall process resulted in a catalytic Electrochemical-Chemical mechanism (EC') [6], proposed by Da Silva et al. [7], with the water reduction as the resulting reaction:



Voltammetric studies made with weak acids using platinum, gold and silver electrodes have shown that the reduction of the hydrogen atoms linked to the conjugate base of the acids needs less energy than the water reduction [5, 8-12]. Steady state voltammetries showed that the limiting current was proportional to the analytical concentration of the weak acid and that the half wave potentials depended on the strength of the acid [8, 12]: The stronger the acid, the lower the cathodic half wave potential.

If the reduction of weak acids needs less energy than the water reduction, then the presence of such compounds at the vicinity of steel in anaerobic conditions could enhance the corrosion of the metal by accelerating the cathodic branch of the process. In order to test if some weak acids that could be found inside biofilms can undergo an electrochemical deprotonation on stainless steel, voltammetric studies were performed using phosphate, lactic acid, gluconic acid and the amino acids leucine and lysine. Leucine and lysine are simple amino acids that are largely found in nature with relative abundance in proteins of 9.1 % and 5.9 % [13].

*Materials and methods.*

The chemical substances L-Leucine ( $C_6H_{13}NO_2$ ) and L-Lysine ( $C_6H_{14}N_2O_2 \cdot H_2O$ ) were purchased from Panreac, potassium chloride (KCl), potassium dihydrogenphosphate ( $KH_2PO_4$ ) and potassium hydroxide (KOH) from Prolabo and hydrochloric acid (HCl) from Acros Organics. Gluconic acid ( $C_6H_{12}O_7$ ) and lactic acid ( $C_3H_6O_3$ ) were purchased from Sigma. Water was deionised with an ELGA PURELAB Option-R purifier (10-15  $M\Omega \cdot cm$ ).

The experiments were performed in a three-electrode cell (Metrohm) using a potentiostat (VSP, BioLogic). The working electrode was a rotating disk made of AISI 316L<sup>1</sup> stainless steel (5 mm diameter) embedded in Teflon<sup>®</sup> (Radiometer Analytical). The rotation speed was controlled by a Radiometer CTV101 speed control unit. The counter-electrode was a grid of platinum-iridium alloy (10 % iridium from Platecxis, France) and a saturated calomel electrode was used as reference (Radiometer Analytical). Experiments were carried out in solutions containing 100 mM potassium chloride as the supporting electrolyte and different weak acid concentrations at various pH. The pH was adjusted using concentrated HCl or KOH solutions. Before each voltammetric experiment, the working electrode was polished with a P4000 grade abrasive sheet (LAM PLAN) and then ultrasonically cleaned in deionised water for 5 minutes. Before introducing the electrode into the cell, the solution was deoxygenated with a nitrogen gas flux for 15 minutes. The nitrogen flux was maintained above the solution throughout the experiment. With a rotation speed of 1000 rpm, linear voltammetry curves were recorded at 20 mV/s from + 0.01 V vs. open circuit potential to – 0.8, –1.2, –1.3 or –1.5 V/SCE. Tests were also made by using different rotation speeds of the working electrode: 1000, 1500, 2000, 2500, 3000 rpm.

*Results and discussion.*

Linear voltammetry was performed with a stainless steel rotating disk electrode in 20 mL deoxygenated 100 mM KCl that contained 100 mM Leucine at different pH values: 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0 (figure 1).

---

<sup>1</sup> AISI 316L composition in percentage. C 0.03; Cr 17; Fe 65; Mn 2; Mo 2.5; Ni 12; S 0.03; P 0.045; Si 1.

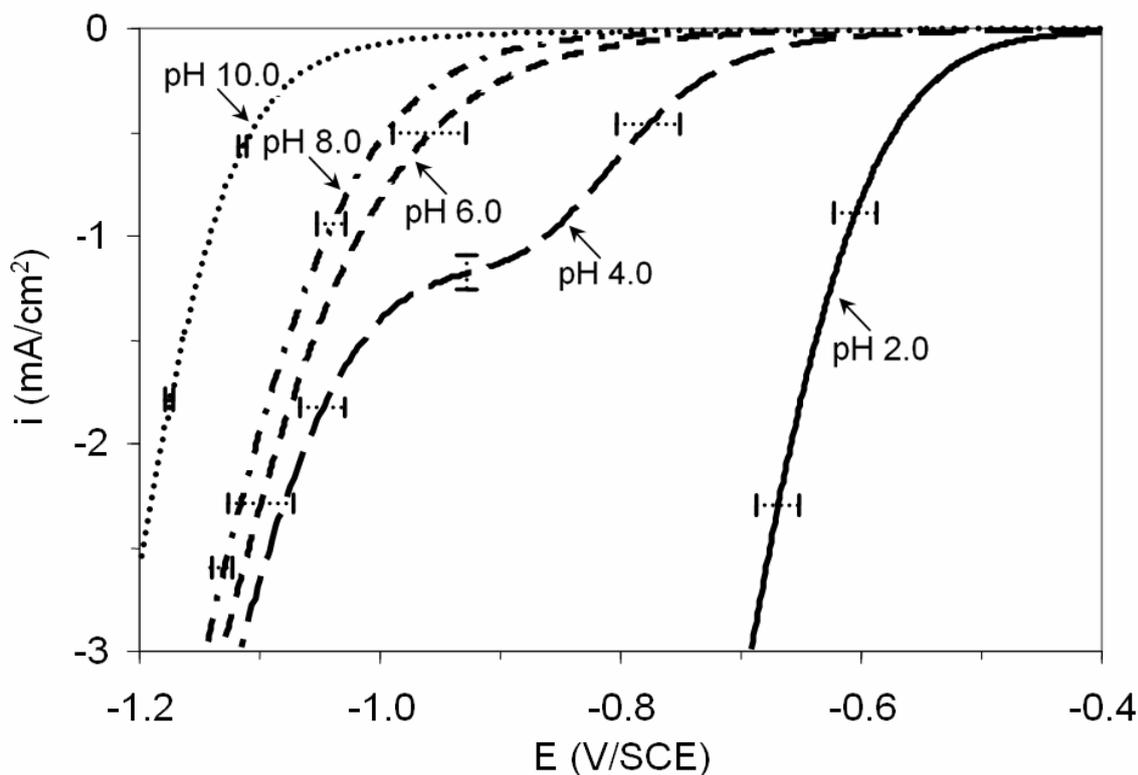


Figure 1. Linear voltammetry (scan rate = 20 mV/s) with a stainless steel (316L) rotating disk electrode (1000 rpm) in 100 mM KCl solutions containing 100 mM leucine at pH 10.0, 8.0, 6.0, 4.0, and 2.0. Error bars represent the standard deviation from 3 to 6 measurements per condition.

As a general trend, lower pH values gave higher cathodic current intensities. Nevertheless the curves plotted at pH 6.0 and 8.0 were very close to each other all along the potential scan, with a potential shift only about 30 mV. At pH 4.0, a reduction wave was observed starting at approximately -0.65 V/SCE. After the wave, the pH 4.0 curve approached those obtained at pH 6.0 and 8.0. These results show that although there was always a shift to more negative potential values as the pH increased, the major contribution to the current densities from pH 8.0 to 4.0, was the reduction of a species other than the free protons in the solution because  $H^+$  concentration from  $10^{-8}$  to  $10^{-4}$  was too low to ensure such currents. At these pH values the predominant form of leucine, HLeu (97.95 % of the total leucine concentration at pH 4.0, 99.95% at pH 6.0, and 97.44 at pH 8.0 (table I)), was certainly the species involved in the reaction. At pH 4.0, 2.04% of the total leucine concentration was in the form  $H_2Leu^+$ . It was assumed that  $H_2Leu^+$  was the species responsible for the wave since  $H_2Leu^+$  is a stronger acid than HLeu ( $pK_{a_{H_2Leu^+}} = 2.32 < pK_{a_{HLeu}} = 9.58$  [14]) and consequently, its hydrogen atoms

would be more easily reduced. The curve plotted at pH 2.0 appeared at much more positive potential values than the other curves because of the higher free proton concentration (10 mM) and the higher concentration of  $\text{H}_2\text{Leu}^+$  (67.63 mM = 67.63% of total leucine concentration). Both species may significantly contribute to the reduction current. The curve at pH 10.0 gave the lowest current densities, far from those obtained at pH 8.0, 6.0 and 4.0, because the predominant species was  $\text{Leu}^-$  (72.45% of total leucine concentration) which had no hydrogen atoms left to be reduced.

pH	$[\text{Leu}^-]/C_{\text{tot}} \cdot 100$	$[\text{HLeu}]/C_{\text{tot}} \cdot 100$	$[\text{H}_2\text{Leu}^+]/C_{\text{tot}} \cdot 100$
2.0	0.00	32.37	67.63
4.0	0.00	97.95	2.05
6.0	0.03	99.95	0.02
8.0	2.56	97.44	0.00
10.0	72.45	27.55	0.00

Table I. Abundance of the different forms of leucine at various pH values ( $C_{\text{tot}}$  = total leucine concentration = 100 mM )

Figure 2 presents linear voltammetry curves performed in leucine solutions at pH = 4.0 with different concentrations (0, 10, 50, 75 and 100 mM) with 100 mM KCl as supporting electrolyte. A wave is present in all curves including the one performed in the leucine free solution. The presence of the wave on the curve without leucine can be attributed to the reduction of free protons in the solution ( $[\text{H}^+] = 0.1 \text{ mM}$ ). By considering the curve obtained in the leucine free solution as a residual current and subtracting it from the other curves, corrected current densities at -0.9 V/SCE were calculated and plotted versus leucine concentration. The graph showed a linear dependency on leucine concentration (inset on figure 2). This linear dependency has already been observed by other authors in the steady state limiting reduction current with weak acids such as acetic, ascorbic, monochloroacetic, lactic and  $\text{HSO}_4^-$  on gold and platinum electrodes [11, 15, 16]. Nevertheless, the dependency between current density and weak acid concentration has not always been found to be linear because, in non controlled pH solutions, higher acid concentration induced a higher free proton concentration [8, 12]. However, in this work, controlling the pH of the solution avoided the occurrence of this phenomenon, and only a linear behaviour was observed here.

The current density values at -0.9 V/SCE extracted from linear voltammetry curves performed at different electrode rotation speeds showed a linear dependence with the square root of the

rotating speed of the electrode (figure 3). This linear dependency is characteristic of reactions under mass transfer control according to Levich equation [17].

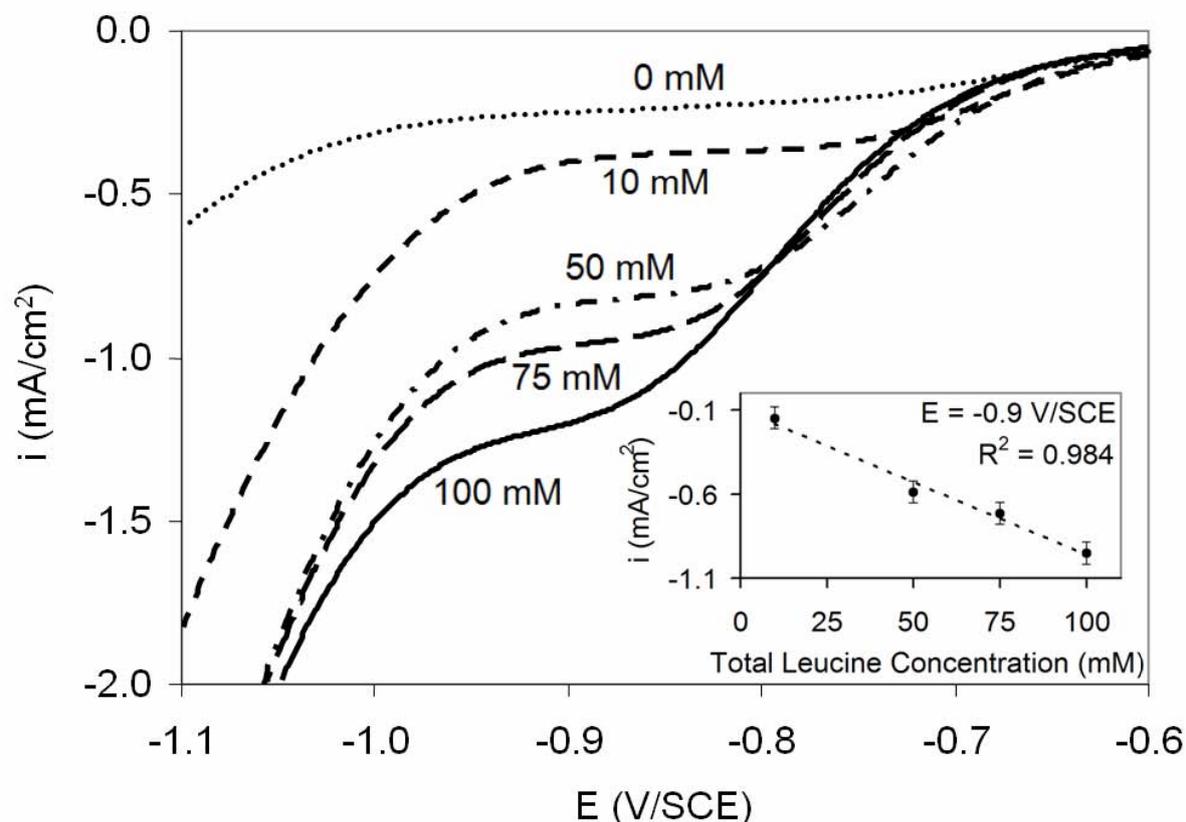


Figure 2. Linear voltammetry (scan rate = 20 mV/s) with a 316L stainless steel rotating disk electrode (1000 rpm) in 100 mM KCl solutions containing 0 mM, 10 mM, 50 mM, 75 mM, 100 mM leucine at pH = 4.0. Inset: current density minus the residual current at 0 mM leucine versus total leucine concentration at -0.9 V/SCE.

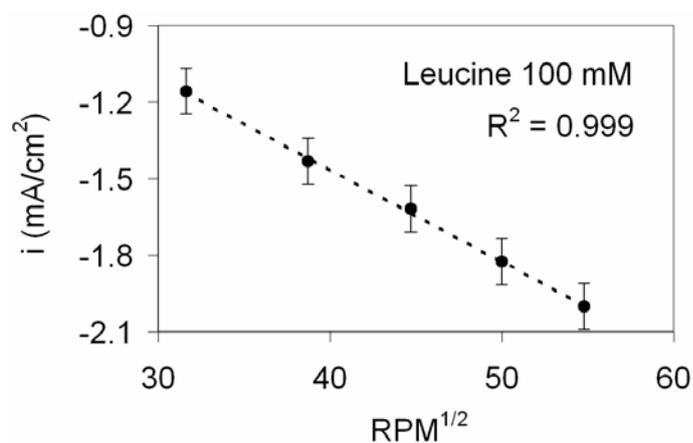
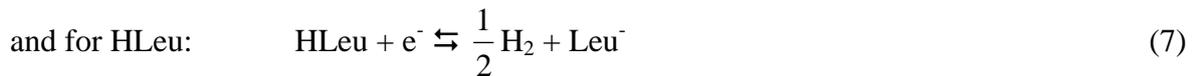
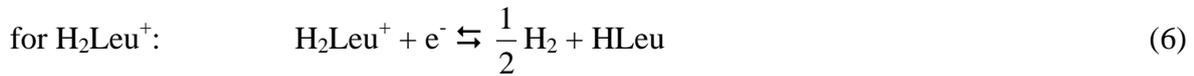


Figure 3. Current density at -0.9 V/SCE versus the square root of the electrode rotation speed. Values obtained from the linear voltammetry measurements at 20mV/s with a 316L stainless steel rotating disk electrode in 100 mM KCl solutions containing 100 mM leucine at pH = 4.0.

Although Levich equation has been derived assuming steady state conditions, here the Levich plot was only used to confirm that the wave was mass transfer controlled. Using it to calculate any of its parameters without considering time based variations would certainly give inaccurate results.

A mass transfer controlled reaction that depends linearly on leucine concentration supports the assumption that the electrochemical deprotonation of  $\text{H}_2\text{Leu}^+$ , was responsible for the wave found in the curves made at pH 4.0. The reaction mechanism could resemble to the catalytic electrochemical–chemical (EC') mechanism proposed by Da Silva et al. for phosphate species [7], where an electrochemical deprotonation (ED) takes place.



followed by the restitution of the lost hydrogen atoms via the acid base equilibrium of the solution:



and



In figure 4 linear voltammetry curves performed with stainless steel in different weak acid solutions at pH 8.0, are shown and compared with the curve made in an acid free KCl solution. All the curves drawn in the presence of a weak acid showed an enhancement of the current density. All the curves were quite reproducible giving an average standard deviation of less than  $0.02 \text{ mA/cm}^2$  (2.4 % of the mean) after performing each voltammetry at least three times with a repolished electrode.

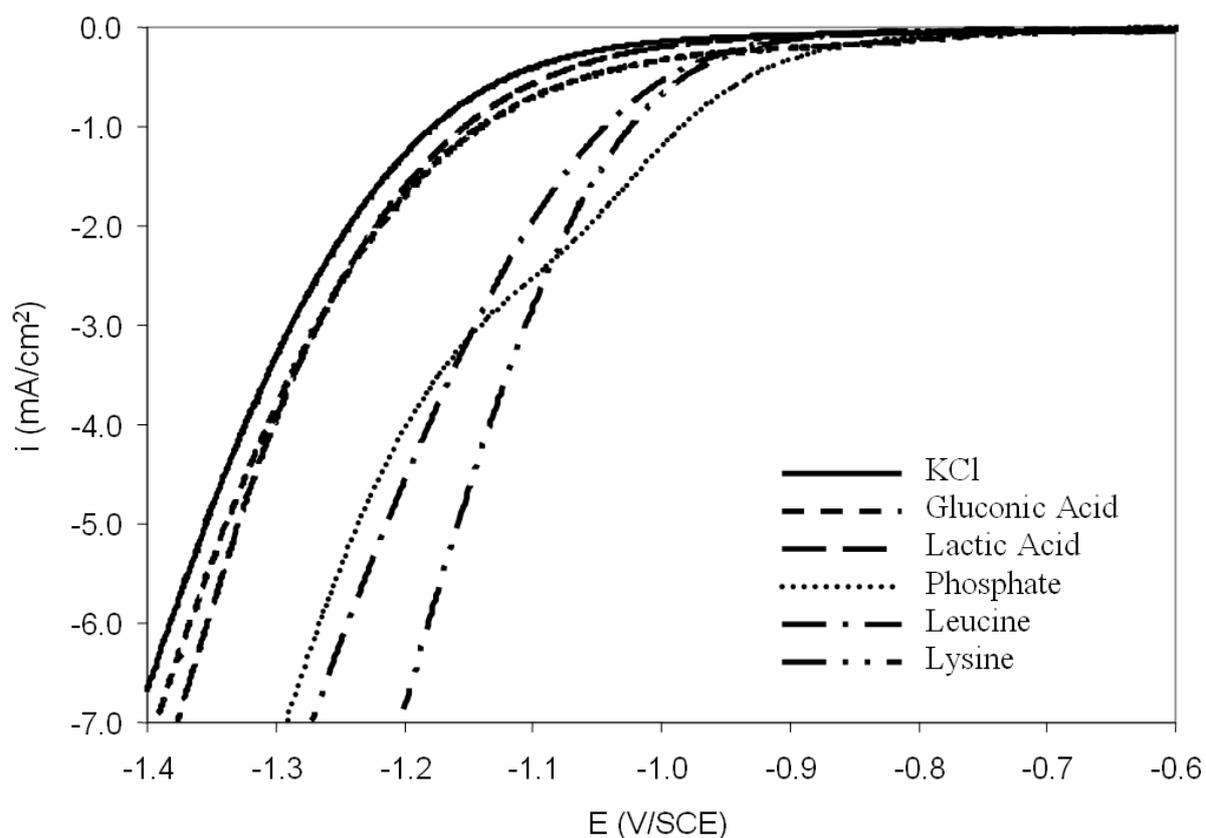


Figure 4. Linear voltammetry (scan rate = 20 mV/s) performed with a 316L stainless steel rotating disk electrode (1000 rpm) in 100 mM KCl solutions with and without 100 mM of different weak acids at pH = 8.0 : gluconic acid, lactic acid, phosphate, leucine and lysine.

The current density enhancement due to the presence of weak acids observed on the voltammetry curves in figure 4 depends on the strength of the acids and of the abundance of each acidic species at pH = 8. This can be seen by comparing the pKa values of each of the acids used presented in table II. The lowest pKa corresponds to  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  which was the species responsible for the wave on the phosphate curve. This was shown in a previous paper devoted to the ED of phosphate where it was demonstrated that the current density of the reduction waves in the voltammetry curves of phosphate solutions at pH 8.0 depended linearly on the phosphate concentration [5]. From -0.89 to -1.09 V/SCE, the phosphate curve had the highest current density values, but at higher cathodic potentials the limited quantity of  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  (only 14% of the total phosphate concentration) was no longer able to support the fast evolution of the current resulting in the formation of a diffusion wave that crossed amino acids curves. The current densities of the lysine curve were higher than those of leucine because  $\text{H}_2\text{Lys}^+$  is a stronger acid than HLeu. Logically, lactic and gluconic acid, which were completely

## I. Les acides faibles et la biocorrosion anaérobie des aciers.

dissociated at pH 8.0 and thus had no hydrogen atoms left to participate in the reduction reaction, gave almost no current enhancement. Nevertheless, it is interesting to note that there was a slight (but reproducible) current increase when in their presence. This means that there may be yet another unexplained phenomenon behind this behavior that could be related to either the ionic strength of the solution or to the adsorption of the conjugate bases of the acids on the electrode [18].

Acid name	Acid/conjugate base	pKa	Species	Abundance at pH = 8.0 (% of total acid concentration)
Gluconic acid	HGluc/Gluc <sup>-</sup>	3.7	HGluc	0
			Gluc <sup>-</sup>	100
Lactic acid	HLac/Lac <sup>-</sup>	3.86	HLac <sup>-</sup>	0
			Lac <sup>-</sup>	100
Phosphate	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> / H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	7.20	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	0
	H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup> / HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	7.20	H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	14
	HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> / PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	12.33	HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	86
			PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	0
Leucine	H <sub>2</sub> Leu <sup>+</sup> /HLeu	2.33	H <sub>2</sub> Leu <sup>+</sup>	0
	HLeu/Leu <sup>-</sup>	9.74	HLeu	97
			Leu <sup>-</sup>	3
Lysine	H <sub>3</sub> Lys <sup>2+</sup> / H <sub>2</sub> Lys <sup>+</sup>	2.16	H <sub>3</sub> Lys <sup>2+</sup>	0
	H <sub>2</sub> Lys <sup>+</sup> / HLys	9.06	H <sub>2</sub> Lys <sup>+</sup>	94
	HLys / Lys <sup>-</sup>	10.54	HLys	6
			lys-	0

Table II. pKa values of the acids used and abundance of the species present in each weak acid solution at pH = 8.0 [14, 19].

Anaerobic corrosion of steels is generally associated to the activity of sulphate reducing bacteria which produces H<sub>2</sub>S from hydrogen oxidation and sulphate reduction. The presence of sulfide ions causes the precipitation of iron sulfide on the surface of the metal that acts as a large surface cathode and catalyses the hydrogen evolution reaction [20]. The hydrogen evolution catalysis by iron sulfide is considered the main reason behind the anaerobic corrosion increase of steels by SRB. Here we show that weak acids can also enhance the hydrogen evolution reaction in mild pH conditions. Their abundance in biofilms in the form of inorganic acids like H<sub>2</sub>S, HSO<sub>3</sub><sup>-</sup>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> or of carboxylic acid groups in extracellular

polymeric substances, amino acids, proteins and enzymes and other organic compounds, not only has an effect on the pH in the vicinity of the substrate, as generally accepted, but also could enhance the hydrogen evolution reaction via the electrochemical deprotonation of the acids on metallic surfaces. In fact, in the case of corrosion enhancement by SRB, the current obtained thanks to  $H^+$  reduction into  $H_2$  should be small compared to the one obtained from the electrochemical deprotonation of  $H_2S$  and other weak acids near the cathodic sites. In SRB biofilms the fast kinetics of  $H^+$  reduction would be limited by the low proton concentration, which could be around  $10^{-6.5}$  according to the pH regulation capabilities of SRB [21]. Meanwhile, the overwhelming abundance of acidic groups and compounds at the vicinity of metal substrates covered by biofilms are more likely to participate in cathodic reactions that could enhance corrosion without the need of a previous dissociation step. The influence of weak acids on the anaerobic corrosion of metals should be also a concern in laboratory corrosion studies where such compounds are used to buffer the pH of the studied media.

### *Conclusion*

Linear voltammetry curves have been recorded to study the cathodic response of gluconic acid, lactic acid, phosphate, leucine and lysine at different pH values and concentrations on a stainless steel (AISI 316L) rotating disk electrode. This is the first time this kind of study is made on stainless steel with the weak acids used except for phosphate. Results show that the studied weak acids can undergo an electrochemical deprotonation (ED) that strips their weakly bonded hydrogen atoms, which are more easily reduced than those linked to the water molecule. This results in higher cathodic currents that depend on the concentration of the weak acids and their dissociation constants. In anaerobic conditions the ED of weak acids could enhance the cathodic part of the corrosion process.

### *References*

- [1] W. Sand, *International Biodeterioration & Biodegradation* **40**:183 (1997).
- [2] S. Da Silva, R. Basseguy, and A. Bergel, *Electrochimica Acta* **49**:2097 (2004).
- [3] W. A. Badawy, K. M. Ismail, and A. M. Fathi, *Electrochimica Acta* **51**:4182 (2006).
- [4] D. Talbot and J. Talbot, *Corrosion science and technology*, CRC Press, Boca Raton, 1998.
- [5] L. De Silva Munoz, A. Bergel, and R. Basseguy, *Corrosion Science* **49**:3988 (2007).
- [6] A. Molina and I. Morales, *Journal of Electroanalytical Chemistry* **583**:193 (2005).
- [7] S. Da Silva, R. Basseguy, and A. Bergel, *Electrochimica Acta* **49**:4553 (2004).

## I. Les acides faibles et la biocorrosion anaérobie des aciers.

- [8] S. Daniele, I. Lavagnini, M. A. Baldo, and F. Magno, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 404:105 (1996).
- [9] Z. Stojek, M. Ciszowska, and J. G. Osteryoung, *Anal. Chem.* 66:1507 (1994).
- [10] V. Marinovic and A. R. Despic, *Electrochimica Acta* 44:4073 (1999).
- [11] M. Ciszowska, Z. Stojek, S. E. Morris, and J. G. Osteryoung, *Anal. Chem.* 64:2372 (1992).
- [12] C. Canhoto, M. Matos, A. Rodrigues, M. D. Geraldo, and M. F. Bento, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 570:63 (2004).
- [13] D. L. Nelson and M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, W. H. Freeman, London/Basingstoke, 2004.
- [14] "Dissociation Constants of Inorganic Species" in *CRC Handbook of Chemistry and Physics, Internet Version 2007* (D. R. Lide, ed.), Taylor and Francis, Boca Raton, FL, 2007.
- [15] S. Daniele, M. A. Baldo, and F. Simonetto, *Analytica Chimica Acta* 331:117 (1996).
- [16] S. Daniele, M. Antonietta Baldo, C. Bragato, and I. Lavagnini, *Analytica Chimica Acta* 361:141 (1998).
- [17] A. J. Bard and L. R. Faulkner, *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, John Wiley & Sons Inc., New York, 1980.
- [18] A. N. Frumkin, in *Advances in Electrochemistry and Electrochemical Engineering*, Vol. 1 (P. Delahay, ed.), Interscience, New York London, 1961.
- [19] D. T. Sawyer and J. B. Bagger, *Journal of the American Chemical Society* 81:5302 (1959).
- [20] W. A. Hamilton and W. Lee, in *Sulfate Reducing Bacteria* (L. L. Barton, ed.), Plenum Press, New York, 1995, p. 243.
- [21] S. Daumas, M. Magot, and J. L. Crolet, *Research in Microbiology* 144:327 (1993).



## **I.6. Résultats complémentaires sur la réversibilité de la réduction des atomes d'hydrogène des acides faibles sur acier inoxydable.**

Après avoir démontré que la réduction sur acier inoxydable des atomes d'hydrogène liés aux phosphates peut être une réaction réversible (section I.4), et que les acides faibles catalysent les réactions de réduction dans la corrosion anaérobie des aciers (section I.5), des expériences ont été réalisées pour vérifier si les acides aminés présentaient également un mécanisme de réduction réversible sur acier inoxydable. Les expériences consistaient à mesurer le potentiel d'abandon d'électrodes d'acier 316L dans des solutions de leucine en présence d'une phase gazeuse composée d'azote ou d'hydrogène. En plus, des expériences supplémentaires avec le phosphate ont été réalisées afin de vérifier l'influence de l'hydrogène et du phosphate sur le potentiel d'abandon des électrodes d'acier inoxydable après une longue période de stabilisation du potentiel, contrairement à ce qui a été effectué dans l'article présenté dans la section I.4 où la composition de la phase gazeuse a été modifiée chaque heure.

### **I.6.1. Matériel et méthodes**

Les expériences ont été réalisées dans trois récipients en plastique de 100 mL fermés hermétiquement. Les mesures ont été effectuées avec un potentiostat à 4 voies modèle VSP de BioLogic. Les électrodes de travail sont des rondins en acier 316L (2 cm de diamètre, 1 cm d'épaisseur) enrobés dans de la résine (Combisub T 150 de Chryсор). Le contact électrique est assuré par des tiges de titane taraudées et visées à l'arrière des rondins. La surface plane exposée au milieu est une disque de 3,14 cm<sup>2</sup> de surface polie à l'aide de papiers abrasifs de taille de grains décroissante (P400 à P4000 de LAM PLAN) Les échantillons sont ensuite nettoyés aux ultrasons dans de l'eau déionisée pendant 5 minutes. Des grilles de platine (10% iridium de Platecxis, France) ont été utilisées comme électrodes auxiliaires et des électrodes Ag-AgCl comme électrodes de référence. Les électrodes de référence ont été préparées en immergeant des fils d'argent dans de l'acide nitrique concentré et après dans une solution saturée en KCl. Les expériences ont été réalisées avec trois solutions différentes:

- a) KCl 0,1 M, pH = 8,0
- b) Leucine 1 mM, KCl 0,1 M, pH = 8,0
- c) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 mM, KCl 0,1 M, pH = 8,0

Le pH des solutions a été ajusté avec de la potasse ou de l'acide chlorhydrique concentrés. L'oxygène dissous a été enlevé des solutions à l'aide d'un bullage d'azote pendant 15 minutes. Le flux de gaz a été ensuite laissé au-dessus des solutions. Après avoir imposé un potentiel de  $-0.6 \text{ V/Ag-AgCl}$  pendant 5 minutes, la mesure du potentiel d'abandon a commencé. Après avoir constaté une stabilisation du potentiel d'abandon, le flux de  $\text{N}_2$  était remplacé par un flux de  $\text{H}_2$  pendant au moins 10 heures pour ensuite remettre le flux d'azote. Dans le cas des solutions KCl (a) et leucine (b), les expériences ont été suffisamment longues pour substituer, à trois reprises, le flux d'azote par un flux d'hydrogène après la stabilisation du potentiel.

## I.6.2. Résultats

La figure I.3 montre l'évolution du potentiel d'abandon d'électrodes d'acier inoxydable 316L dans des solutions de KCl (a), du leucine (b) et du phosphate (c) en présence d'une phase gazeuse constituée d'azote ou d'hydrogène. Le potentiel d'abandon, mesuré dans du KCl seul, présente une longue période de stabilisation (45 h). Suite à la substitution de l'azote par l'hydrogène, le potentiel est modifié de manière notable, traduit par une rupture de l'évolution du potentiel au cours du temps. A chaque fois que l'hydrogène a été introduit à la phase gazeuse de la cellule, le potentiel est descendu (entre 15 à 47 mV par rapport au potentiel en présence d'azote) et à chaque fois que l'azote était réintroduit, le potentiel est remonté. Ce résultat n'était pas du tout attendu, dans la mesure où sur les courbes présentées dans la section I.4, le potentiel d'une électrode d'acier inoxydable immergée dans du KCl seul n'avait pas montré une sensibilité à la présence d'hydrogène. Le fait d'avoir laissé les électrodes si longtemps dans la solution de KCl, a dû modifier les propriétés des électrodes vis à vis des phénomènes de réduction en présence d'hydrogène. L'influence de la présence d'hydrogène sur le potentiel d'abandon pourrait suggérer que la réduction de l'eau sur l'acier inoxydable pourrait être une réaction réversible contrairement à ce qui est affirmé dans la bibliographie (Videla, 1988; Crolet, 1990; Crolet and Magot, 1996). Mais il semblerait que cette influence soit fortement liée à l'état de surface de l'électrode si l'on compare ces résultats à ceux de la section I.4.

## I. Les acides faibles et la biocorrosion anaérobie des aciers.

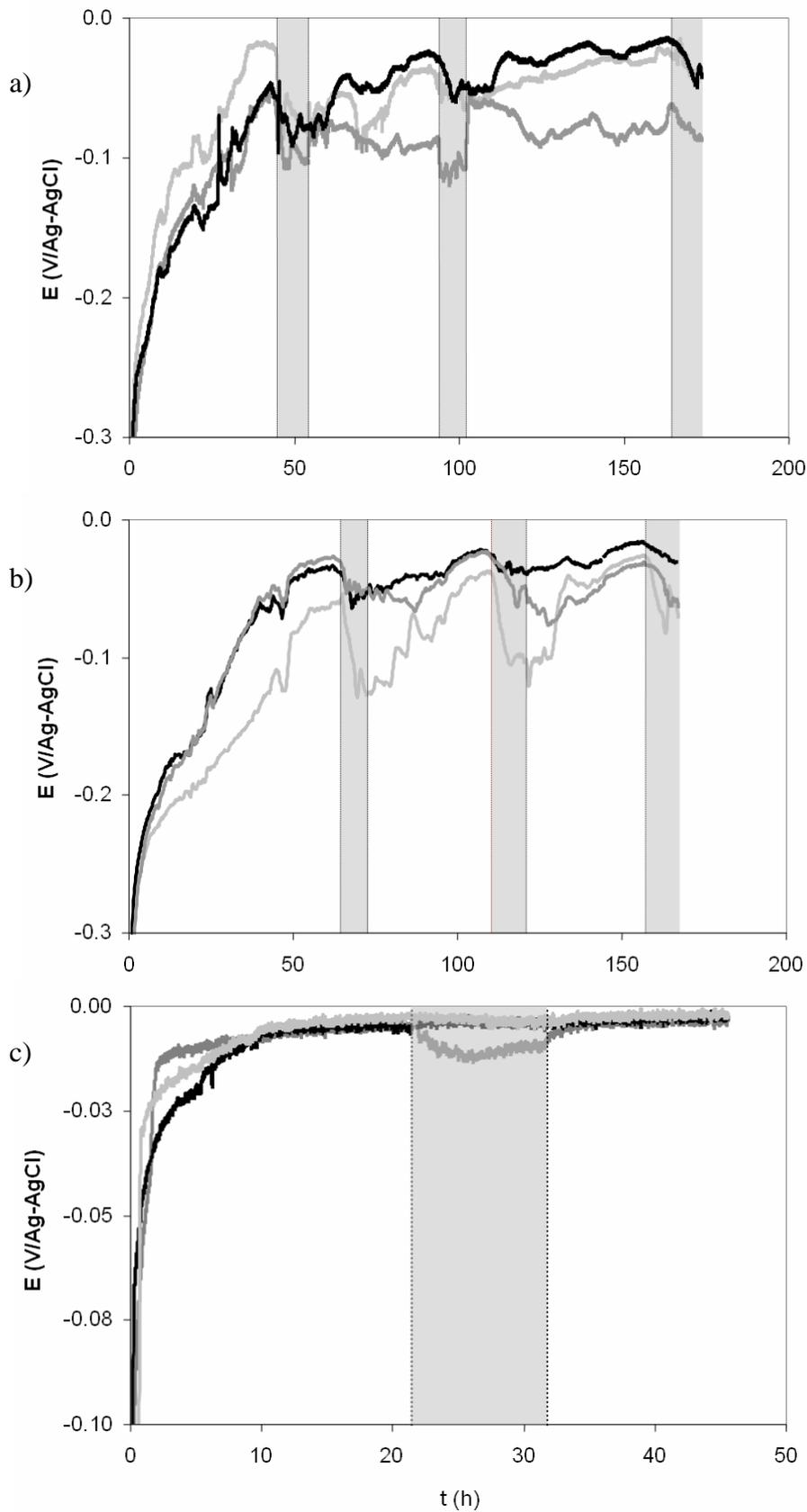


Figure I.3. Evolution du potentiel d'abandon au cours du temps pour trois électrodes d'acier 316L immergées dans a) KCl 0,1 M, pH 8,0, b) Leucine 1 mM, KCl 0,1 M, pH 8,0 et c)  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 mM, KCl 0,1 M, pH 8,0. Les zones en gris indiquent les plages de temps où la phase gazeuse était constituée d'hydrogène pur.

En présence de leucine, le temps de stabilisation a été un peu plus long qu'en présence de KCl seul, atteignant les 64 heures. L'effet de l'hydrogène sur le potentiel a été plus marqué avec des différences de potentiel comprises entre 14 et 62 mV; valeurs qui approchent de celles obtenues avec le phosphate dans les expériences de la section I.4 (de 80 à 160 mV). Encore une fois, le potentiel est remonté quand l'azote était remis dans la cellule. En présence de phosphate, la stabilisation du potentiel a été beaucoup plus rapide atteignant des potentiels stables après 10 heures avec presque les mêmes valeurs pour les trois électrodes. L'influence de l'hydrogène sur le potentiel n'a pourtant été constatée que pour une des électrodes dont le potentiel a eu une variation de 3 mV par rapport à la valeur en présence d'azote. Ce comportement du potentiel vis-à-vis de l'hydrogène en présence du phosphate est très différent par rapport aux résultats reportés dans la section I.4 où le potentiel était sensiblement affecté par la présence simultanée d'hydrogène et de phosphate. Après la longue exposition des électrodes d'acier inoxydable aux ions phosphate, un dépôt de phosphate de fer s'est peut être formé suite à une augmentation de la corrosion de l'acier tel comme il a été constaté dans le cas de l'acier doux (section I.4). Ce dépôt peut être le responsable de la modification du comportement de l'acier inoxydable en présence d'hydrogène et de phosphate.

## **Conclusion**

Les résultats montrent que la présence d'hydrogène a une influence sur le potentiel, néanmoins, l'effet reste faible, peu reproductible et avec beaucoup de fluctuations du potentiel. Bien que l'on ne puisse pas mettre en évidence de manière indiscutable la réversibilité de la réaction de dégagement d'hydrogène sur l'acier 316L grâce à la présence des acides faibles, les résultats donnent des indices suffisants pour ne pas rejeter cette hypothèse. Il reste quand même à faire une étude plus rigoureuse avec un contrôle de l'état initial de la surface des électrodes et une hydrodynamique contrôlée (électrode tournante) pour éliminer les fluctuations dues aux mouvements chaotiques des espèces près des électrodes.

Chapitre II.  
**Production d'hydrogène par électrolyse.**



## II. Production d'hydrogène par électrolyse.

L'hydrogène est connu comme un bon vecteur d'énergie qui peut être utilisé dans les piles à combustible ou dans les moteurs à combustion pour produire de l'électricité ou du travail avec de l'eau et de la chaleur comme produits secondaires. L'hydrogène est généralement reconnu comme une des meilleures alternatives pour substituer les combustibles fossiles dont l'utilisation produit un grand impact négatif sur l'environnement à cause de la production du dioxyde de carbone ( $\text{CO}_2$ ); le principal gaz à effet de serre. Par contre, pour être considéré comme un combustible 'propre', l'hydrogène doit être issu de procédés qui n'utilisent pas de combustibles fossiles comme matière primaire ni comme source d'énergie. En fait, actuellement, la plus grande partie de la production de l'hydrogène est réalisée à partir des combustibles fossiles par reformage du gaz naturel (48%), gazéification du charbon (18%) et raffinage du pétrole (30 %) (Kothari, Buddhi et al., 2006). Tous ces procédés produisent du dioxyde de carbone ( $\text{CO}_2$ ). Cependant, l'hydrogène peut être aussi produit par la décomposition de l'eau par électrolyse, procédé faisable à petite et grande échelle qui produit de l'hydrogène de haute pureté. En utilisant de l'électricité produit par des générateurs hydroélectriques, nucléaires, photovoltaïques ou éoliens, la production d'hydrogène par électrolyse n'a pas besoin des combustibles fossiles.

Les premiers appareils industriels d'électrolyse travaillaient en milieu acide (acide sulfurique) et utilisaient le plomb comme matériau conducteur pour les électrodes et les tuyauteries. Or, les problèmes de corrosion des électrodes et des tuyauteries ont rapidement conduit tous les constructeurs à employer des solutions alcalines (Damien, 1992). Néanmoins, le milieu utilisé dans l'électrolyse alcaline, est aussi très agressif, et les membranes et joints utilisés dans la cellule doivent avoir une bonne résistance au milieu basique (KOH). En plus, les cathodes contiennent des catalyseurs à base de nickel pour améliorer la cinétique de dégagement d'hydrogène en milieu basique (Kibria, Mridha et al., 1995; Podesta, Piatti et al., 1995).

La réaction de dégagement d'hydrogène pourrait être catalysée par d'autres moyens que par des électrodes à base de métaux nobles. Dans le chapitre précédent, on a montré que les acides faibles peuvent catalyser la réaction de réduction de l'eau. Par contre, cette catalyse ne peut se faire que dans des milieux dont le pH est tel que les acides faibles utilisés ne soient pas complètement dissociés. En effet, ce sont les atomes d'hydrogène, liés aux acides faibles, qui sont les réactifs indispensables pour observer la catalyse de la réduction de l'eau. En utilisant des phosphates, travailler à des pH neutres ou légèrement acides, par exemple pH 4, peut donner des améliorations importantes dans la cinétique de la réaction de réduction.

Le chapitre est divisé en deux parties. D'abord, la partie expérimentale, comme dans le chapitre II, est présentée sous la forme d'un article soumis pour être publié dans un journal scientifique précédé d'un résumé en français incluant les points clés de la publication. Les résultats présentés ont également fait l'objet d'un dépôt de brevet français No. BD1699 (25 juillet 2006) suivi d'une demande d'extension internationale PCT déposée le 11 juin 2007 sous le numéro PCT/FR2007/000949. La seconde partie, rapporte des discussions sur les conséquences de travailler avec des acides faibles du côté cathodique et de la potasse dans le côté anodique et sur des points à observer lors du choix d'un acide faible comme catalyseur de la réduction de l'eau.

## **II.1. Le travail expérimental réalisé.**

L'objectif de ce travail était de tester l'utilisation des phosphates comme catalyseurs de la réduction de l'eau pour la production d'hydrogène en travaillant avec une cathode d'acier inoxydable. La première partie concerne la comparaison du comportement électrochimique (étude voltamétrique) du platine et de l'acier inoxydable pour leur utilisation comme cathodes lors de la production d'hydrogène dans une solution de phosphates. Dans la deuxième partie, des expériences d'électrolyse à potentiel constant et à courant constant ont été réalisées dans une cellule électrochimique dont les compartiments présentaient un volume de 90 cm<sup>3</sup> : le schéma de l'électrolyseur est donné dans la figure II.1. Pour évaluer l'impact des phosphates sur la production d'hydrogène, des milieux de référence (KCl, KOH) ont été testés.

Les résultats ont montré :

- L'acier inoxydable de type 316L est une cathode stable sur laquelle la cinétique de réduction n'est pas modifiée aux cours des balayages de potentiel successifs, alors que le platine présente une évolution qui rend sa surface de moins en moins réactive.
- La présence de phosphate augmente considérablement le courant cathodique et la production d'hydrogène gazeux sur une électrode d'acier inoxydable.
- Les performances obtenues en utilisant une solution de phosphate (1,0 M) dans le compartiment cathodique étaient identiques à celles obtenues en présence de KOH 25% w (milieu classique pour la production d'hydrogène par électrolyse).
- L'utilisation d'une électrode en platine comme anode en présence de phosphate donne de mauvaises performances à cause d'un empoisonnement du platine par les ions phosphate.

## II. Production d'hydrogène par électrolyse.

- L'utilisation d'une solution 1,0 M de phosphate dans le compartiment cathodique (pH = 4.0) et de la potasse 25%w dans le compartiment anodique (pH = 15), améliore les rendements énergétiques de 31 % par rapport à l'utilisation de KOH 25 %w dans les deux compartiments. Ces gains d'énergie sont dus à la baisse de la tension réversible de la décomposition de l'eau générée par le gradient de pH.

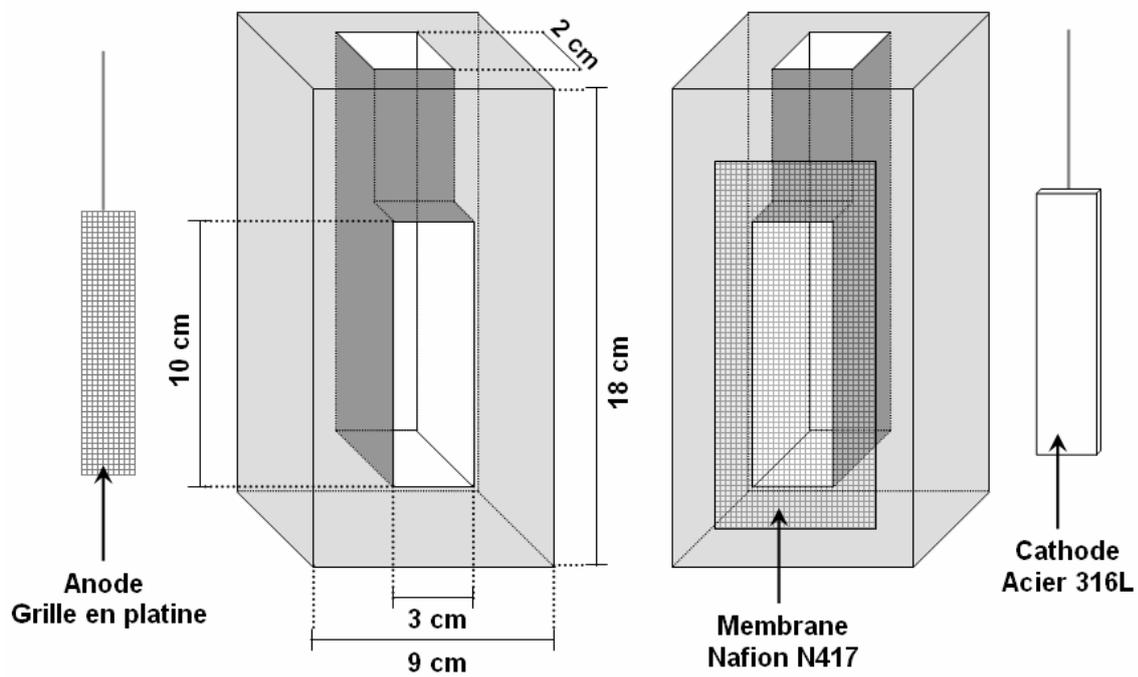


Figure II.1. Schéma du réacteur utilisé dans les expériences de production d'hydrogène par électrolyse.



**II.2. Article**

**"Hydrogen production by electrolysis of a phosphate solution on a stainless steel cathode."**

Article à soumettre



**Hydrogen production by electrolysis of a phosphate solution on a stainless steel cathode.**

DE SILVA MUÑOZ Leonardo<sup>a</sup>, BERGEL Alain<sup>a</sup>, FERON Damien<sup>b</sup>, BASSEGUY Régine<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire de Génie Chimique (CNRS-INPT), 5 rue Paulin Talabot, 31106 Toulouse  
France.

<sup>b</sup> Service de la Corrosion et du Comportement des Matériaux dans leur Environnement, CEA-  
Saclay, 91191 GIF-SUR-YVETTE Cedex, France

\*Corresponding author. Regine.Basseguy@ensiacet.fr,

*Abstract*

The catalytic properties of phosphate on reduction reactions shown on anaerobic corrosion of steels could be exploited for hydrogen production by electrolysis of phosphate solutions. A voltammetric study of the hydrogen evolution reaction was performed using phosphate solutions at different concentrations on 316L stainless steel and platinum rotating disk electrodes. Then, hydrogen was produced in an electrolytic cell using a phosphate solution as catholyte. The performance of the system was compared to classical alkaline electrolysis by using a 25% KOH solution. Phosphate species work as homogeneous catalysts that enhances the cathodic current at mild pH values. Stainless steel cathodes of type 316L showed a stable behavior in presence of phosphate. The use of phosphate and other weak acids as catalysts of the hydrogen evolution reaction could prove useful to develop electrolysis units that work on mild pH values permitting the use of lower cost construction materials.

*Introduction*

Hydrogen is known to be a good energy carrier that can be used in fuel cells or in combustion engines to produce electricity or work, with only water as a by product. It is generally recognized as one of the best alternatives to substitute fossil fuels whose utilization inflicts enormous impacts on the environment. Hydrogen production by electrolysis is the only process that need not rely on fossil fuels; it produces hydrogen with high purity and is feasible on small and large scales. Currently most of the industrial production of hydrogen through water electrolysis is performed using aqueous KOH (30 wt. %) at 80°C applying a cell potential from 1.65 to 1.8 V [1]. Research on alkaline electrolysis has been mainly focused in materials investigation for electrocatalysts in order to increase current density and life span.

Nickel based alloys with several depositions on the electrode surface have been successfully used as electrocatalysts [2, 3].

Research on the electrochemical reduction of weak acids has shown that they can act as homogeneous catalysts for the hydrogen evolution reaction. The most widely accepted mechanism for the reduction of weak acids is of the CE (chemical–electrochemical) type, where the dissociation of the acid takes place before the electrochemical reduction of free protons [4-6]:



The dissociation step for most weak acids is considered to be very rapid because, in most cases, no chemical limitation is found.

An alternative mechanism has been proposed by other authors who claim that the hydrogen atoms of undissociated weak acids (HB) could be directly reduced without a dissociation step [7-10]. Stojek et al. [10] studied the influence of supporting electrolyte in the reduction of polyprotic acids on platinum electrodes. They proposed that, after the electrochemical reduction of the undissociated acid in the presence of a supporting electrolyte, the conjugate base of the acid ( $\text{B}^-$ ) reacted with water or with protons ( $\text{H}^+$ ) in order to re-establish the acid-base equilibrium in the solution. O'Neil et al. [11] and Takehara et al. [12] showed that hydrogenated phosphate species may undergo an electrochemical deprotonation on platinum electrodes and Da Silva et al. showed that this electrochemical deprotonation of phosphate was possible on stainless steel according to the following reaction mechanism:

A two step electrochemical reduction:



coupled with the acid-base equilibrium:



This type of reaction system is normally known as an EC' or catalytic Electrochemical-Chemical mechanism [13]. It should be noted that coupling reactions (3) and (4) with the acid base equilibrium of phosphoric acid (6) leads to water reduction as the global reaction:



## II. Production d'hydrogène par électrolyse.

The experimental data and the theoretical model proposed by Da Silva et al. in their corrosion studies, showed that a significant quantity of molecular hydrogen was produced by this mechanism [7].

In order to test phosphate species as catalysts of water electrolysis for hydrogen production, a voltammetric study of the hydrogen evolution reaction was performed using phosphate solutions at different concentrations on stainless steel and platinum rotating disk electrodes. Then, hydrogen was produced in an electrolytic cell using a phosphate solution as catholyte. The performance of the system was compared to classical alkaline electrolysis by using a 25% KOH solution.

### *Materials and methods*

#### **a) Chemicals**

The chemical substances used in the experiments were: dihydrogen potassium phosphate ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; Prolabo), potassium chloride (KCl; Sigma Aldrich), hydrochloric acid (HCl; Acros Organics), potassium hydroxide (KOH, Prolabo), deionised water (ELGA PURELAB Option-R, 10-15  $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$ )

#### **b) Voltammetric study**

The experiments were performed in a three-electrode cell (Metrohm) using a Solartron 1286 potentiostat controlled by the software 'Corrware'. The working electrode was a rotating disk made of platinum (2 mm diameter) or AISI 316L<sup>2</sup> stainless steel (5 mm diameter) embedded in Teflon<sup>®</sup>. Both rotating electrodes were purchased from Radiometer. The rotation speed was controlled by a Radiometer CTV101 speed control unit. The counter-electrode was a grid made of a platinum-iridium alloy (10 % iridium, from Patecxis, France) and a saturated calomel electrode was used as the reference electrode (Radiometer Analytical). Experiments were carried out in solutions containing 0.1 M potassium chloride as the supporting electrolyte and different phosphate concentrations at pH = 8.0. Before each voltammetric experiment, the working electrode was polished with a 1  $\mu\text{m}$  grade abrasive sheet (3M 262x Imperial) and then ultrasonically cleaned in deionised water for 5 minutes. Before introducing

---

<sup>2</sup> AISI 316L composition in percentage. C 0.03; Cr 17; Fe 65; Mn 2; Mo 2.5; Ni 12; S 0.03; P 0.045; Si 1.

the electrode into the cell, the solution was deoxygenated with a nitrogen gas flux for 15 minutes. The nitrogen flux was maintained above the solution throughout the experiment. Then, with a rotation speed of 1000 rpm, the linear voltammetry curves were recorded at 20 mV/s from  $-0.1$  V/SCE for the platinum electrode and from  $-0.5$  V/SCE for the stainless steel electrode to  $-1.1$ ,  $-1.3$  or  $-1.5$  V/SCE.

### **c) Electrochemical production of hydrogen**

The experiments were made in a Plexiglas filter-press type reactor with two  $90\text{ cm}^3$  compartments separated by a Nafion<sup>®</sup> N417 membrane (DuPont). The measurements were made by imposing a constant cell voltage or current using a Solartron 1286 potentiostat controlled by the software 'Corrware'. The cell voltage and current were measured with the potentiostat while the cathodic and anodic potentials were measured separately using two saturated calomel electrodes (Radiometer) connected to multimeters (Fluke). Each reference electrode communicated to its corresponding compartment by a luggin capillary. The cathode was a 316L stainless steel plate with an area of  $20\text{ cm}^2$  and was polished with abrasive paper from grades P600 to P2400 (LamPlan). The anode was a platinum-iridium alloy (10 % iridium, from Patecxis, France) grid with a geometric area of  $20\text{ cm}^2$ . Temperature was measured with a digital thermometer (TP3001) and pH with a combined pH electrode (Radiometer). The cathodic compartment was hermetically closed and equipped with an outlet tube that collected the produced hydrogen into an upside down, 10 mL, graduated, glass cylinder filled with water.

## *Results and discussion*

### **a) Voltammetric study**

Figures 1 and 2 show the linear voltammetry curves made with platinum and stainless steel rotating disk electrodes (1000rpm) using different phosphate concentrations at pH = 8.0 with KCl 0.1 M as supporting electrolyte. In the presence of phosphate, a reduction wave was observed, starting at approximately  $-0.7$  V/SCE for the platinum (figure 1) and  $-0.9$  V/SCE for the stainless steel (figure 2). For both electrodes the current density values of the waves were of the same order of magnitude with the same concentration of phosphate. The reduction current density depended strongly on phosphate concentration. Insets in figures 1 and 2 show

a linear relationship between current density and phosphate concentration at  $-0.85$  and  $-1.20$  V/SCE for the platinum and stainless steel electrodes respectively.

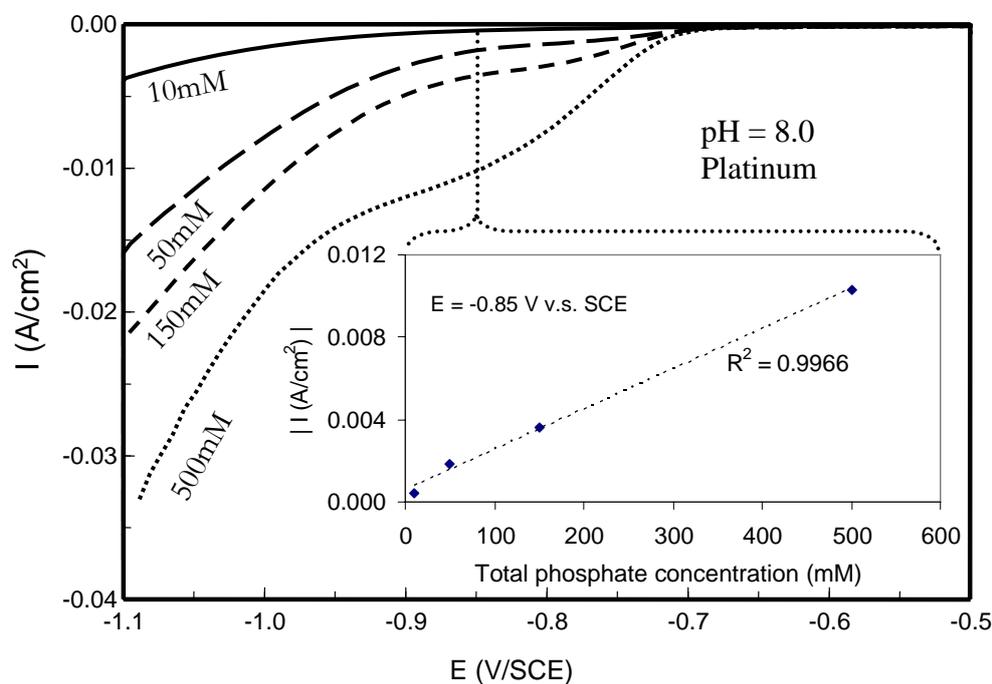


Figure 1. Linear voltammetry curves with the platinum electrode at different phosphate concentrations (KCl 0.1 M as supporting electrolyte, pH = 8.0). As an inset, current density vs. phosphate concentration at  $-0.85$  V vs. SCE.

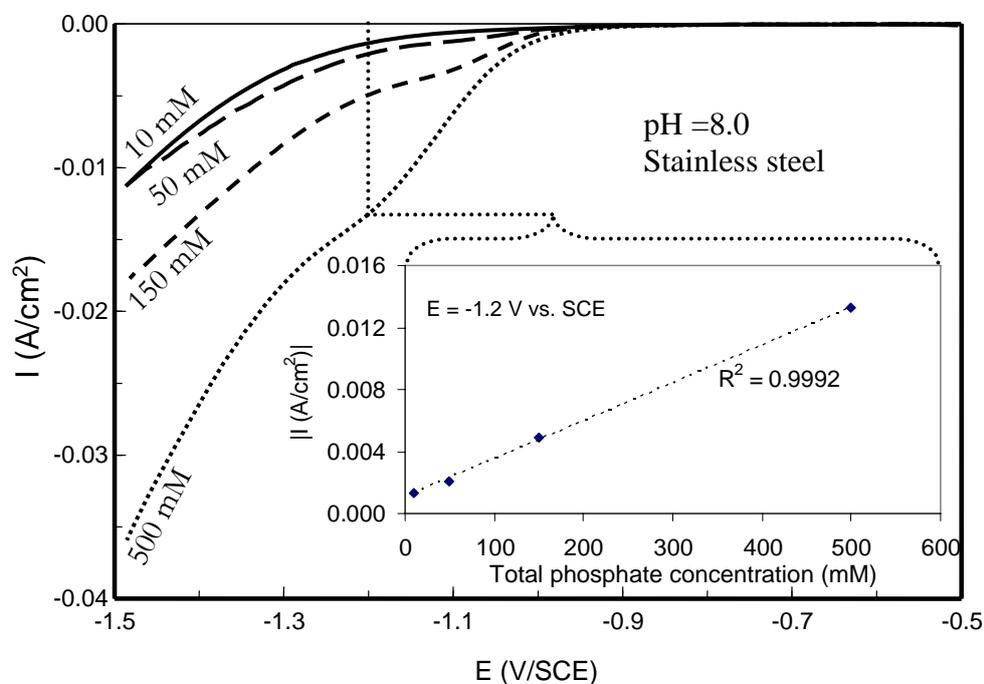


Figure 2. Linear voltammetry curves with the stainless steel (316L) electrode at different phosphate concentrations (KCl 100mM as supporting electrolyte, pH = 8.0). As an inset, current density vs. phosphate concentration at  $-1.2$  V vs. SCE.

The results clearly show that the cathodic wave corresponds to the reduction of a species whose concentration was directly proportional to the phosphate content in the solution. At constant pH, the increase in the cathodic current with total phosphate concentration cannot be attributed to an increase in proton concentration, which remained the same in each experiment. Furthermore at pH 8.0 the proton concentration was too small to explain the high current obtained. The current density augmentation has been explained in other works by the electrochemical deprotonation of phosphate [7, 14]. At this pH, the predominant phosphate species involved in the reduction reaction were  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  and  $\text{HPO}_4^{2-}$  (14 and 86 % of total phosphate respectively). Daniele et al. [5] found that the reduction curves of weak acids appeared at less negative potentials as the dissociation constant of the acid increased. As  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  has a higher dissociation constant than  $\text{HPO}_4^{2-}$  ( $10^{-7.21}$  for  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  and  $10^{-12.33}$  for  $\text{HPO}_4^{2-}$  [15]),  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  would be easier to reduce and should be the species involved in formation of the reduction wave.

Figure 3 presents successive linear voltammetry curves obtained with platinum and stainless steel electrodes in a 0.5 M phosphate, 0.1 KCl solution. The curves show an evolution of the platinum electrode behaviour that renders it less and less active, shifting the curves towards more negative potentials. The curves also show an alteration on the reaction mechanism since the reduction wave disappeared after the first polarization. In contrast, the stainless steel electrode did not show any evolution during the successive potential scans. It remained stable reproducing the same curve shown in figure 3, which had higher values than those obtained with the poisoned platinum electrode after 3 or more scans.

Results from the voltammetric study confirmed that phosphate species can serve as a source of hydrogen atoms that need less energy than water to achieve their reduction. This enhances the reduction current density in the presence of phosphate species. Their reduction coupled with the acid-base equilibrium of the solution gives as a resulting reaction the reduction of water into hydrogen and hydroxyl ions. This behaviour makes phosphate species an interesting homogeneous catalyst in the cathodic compartment of an electrolytic cell to enhance the reduction of water to produce hydrogen. Moreover, stainless steel electrodes of type 316L have shown a very stable behaviour as cathode in the electrolysis of phosphate solutions. Its relative low cost and its large availability as industrial material makes it a promising option as cathode material for  $\text{H}_2$  production.

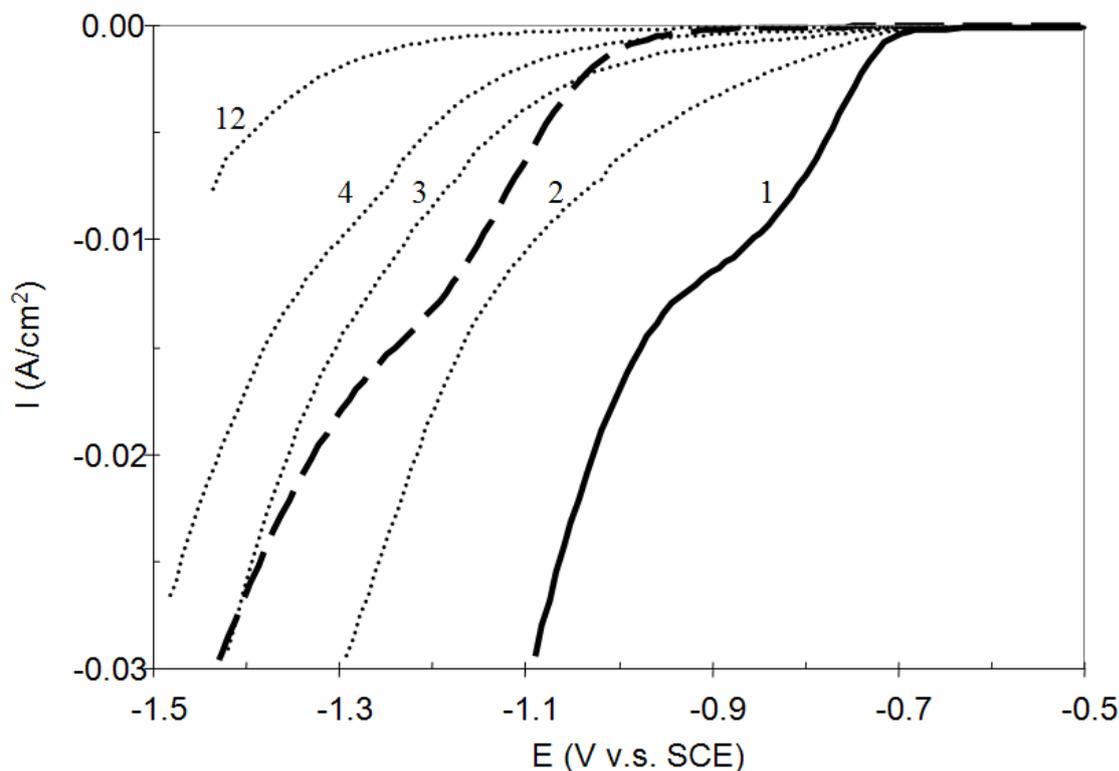


Figure 3. Linear voltammetry curves with platinum (— and ..... ) and stainless steel (— — —) electrodes in phosphate 0.5 M, KCl 0.1 M at pH = 8.0. Numbers beside the curves made with platinum correspond to the scan number.

### b) Electrochemical production of hydrogen

The production of hydrogen was performed in a filter-press type reactor with two 90 cm<sup>3</sup> compartments separated by a Nafion N417 membrane, using stainless steel plate (AISI 316L) as cathode and a platinum grid as anode. The electrolyte was a 0.5 M phosphate solution at pH = 8.0 with 0.1 M KCl as supporting electrolyte. Control experiments were performed with a phosphate free 0.1 M KCl solution at pH = 8.0. The electrolysis was achieved by imposing a cathodic potential of -1.1 V/SCE on the stainless steel cathode with respect to the reference electrode of the cathodic compartment. At this potential, as it can be seen in figure 2, enhancement of the cathodic current due to phosphate species was significant so it was not necessary to use higher cathodic potentials in order to test the catalytic effect of phosphate.

The current density, as expected, was found to be more important when phosphate species were present than in the control experiment without phosphate (figure 4). During the first five minutes of electrolysis the current densities decrease rapidly (in absolute value) for both

solutions. After this, the current density for the phosphate free solution drifted slowly from -0.39 mA/cm<sup>2</sup> to -0.16 mA/cm<sup>2</sup>. In the phosphate solution, the current density remained relatively stable around -1.35 mA/cm<sup>2</sup> during the 100 minutes of electrolysis, presenting only some minor oscillating variations. In the presence of phosphate, the hydrogen production rate was approximately 10 mL/h (T = 298 K, P = 101.3 kPa) (figure 5) whereas the phosphate free solution gave no measurable quantity of produced hydrogen.

After 100 minutes, the total consumed electricity was 156.6 C in the presence of phosphate which corresponded to a faradic efficiency of 91.4% with respect to hydrogen production. With the phosphate free solution, the consumed electricity after 100 minutes was 30.1 C. As no gaseous hydrogen was produced in this case, it may be supposed that the hydrogen produced could, at the most, saturate the 90 cm<sup>3</sup> of cathodic solution with a solubility of  $7.8 \cdot 10^{-4}$  mol/L at 101.3 kPa. Consequently the faradic efficiency of the process in absence of phosphate would be less than 45.0 %. The rest of the charge, 55.0 % of the used electricity or 16.5 C, was probably spent in the reduction of the oxide layer present on the surface of the stainless steel cathode. By subtracting this last quantity from the electricity used in the presence of phosphate, the faradic efficiency of the process in the presence of phosphate becomes 102.5 %. This means that all the excess current obtained thanks to the presence of phosphate was completely used to produce hydrogen.

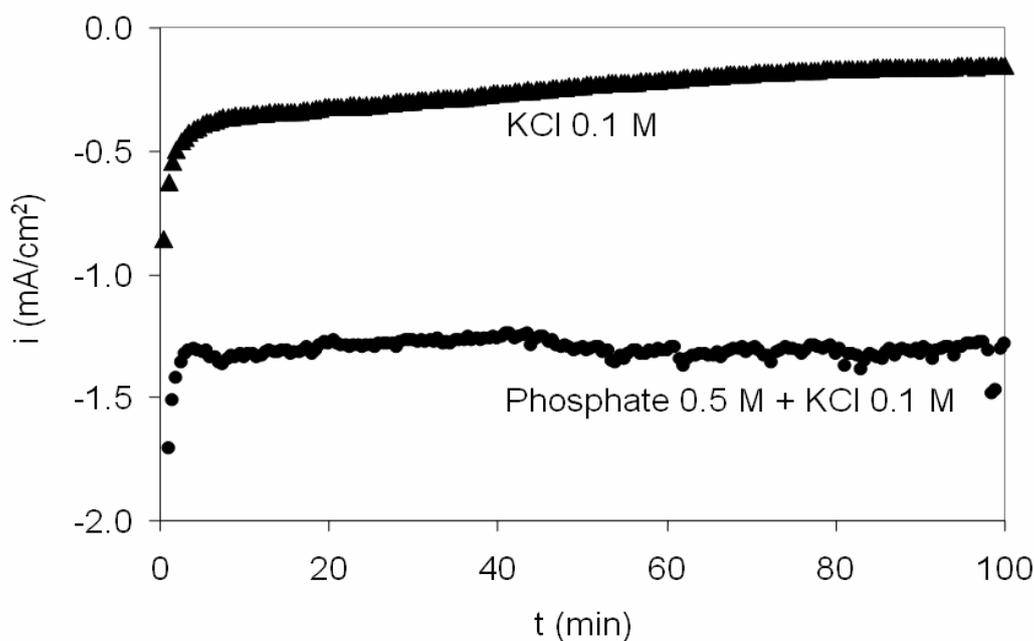


Figure 4. Cathodic current density at -1.1 V/SCE obtained with a 316L stainless steel electrode in 0.1 M KCl solutions with and without 0.5 M phosphate. Initial pH = 8.0.

## II. Production d'hydrogène par électrolyse.

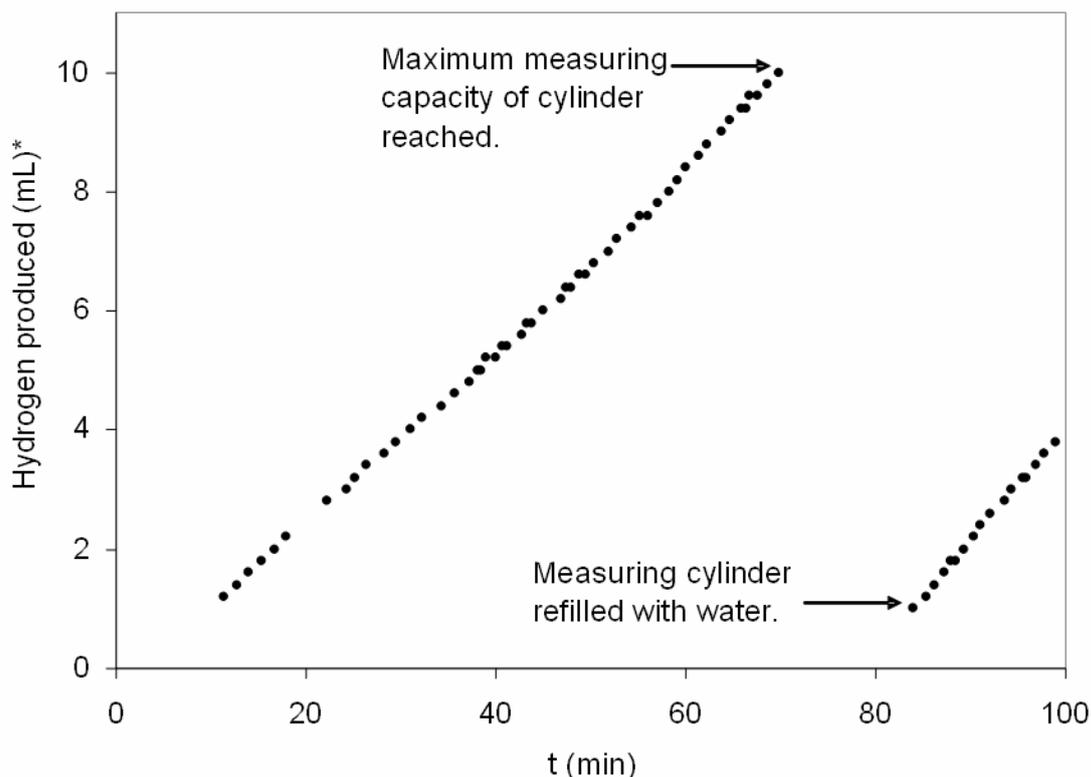


Figure 5. Hydrogen produced on a 316L stainless steel electrode at  $-1.1\text{V/SCE}$  in a  $0.5\text{ M}$  phosphate,  $0.1\text{ M}$  KCl solution, pH 8.0.

\*  $T = 298\text{ K}$ ,  $P = 101.3\text{ kPa}$ .

Galvanostatic electrolysis experiments were carried out in different solutions at  $-1.35\text{ mA/cm}^2$ , which was the average current density value obtained in the previous experiment with a phosphate solution. The conditions are listed in table I. The hydrogen production was the same for all conditions with an approximate production rate of  $11\text{ mL/h}$  ( $T = 298\text{ K}$ ,  $P = 101.3\text{ kPa}$ ) with a faradic efficiency of  $92.1\%$ .

Figure 6 presents the cell voltage and the anodic and cathodic potentials measured during 2 hours of continuous galvanostatic electrolysis for the conditions mentioned in table I. Conditions 'KCl-KCl' and 'KCl-Phos' were kept operating for only 1 hour. The lowest cell voltage was found when KOH 25%w was used as anolyte and phosphate 1 M as catholyte (condition 'KOH-Phos-2') with a stable value of  $1.30\text{ V}$  while the highest cell voltage was obtained when using a  $0.1\text{ M}$  KCl solution in both anodic and cathodic compartments (condition 'KCl-KCl') attaining  $2.83\text{ V}$  (figure 6a).

Condition name	Anolyte	Catholyte
KCl –KCl	KCl 0.1 M pH = 5.5	KCl 0.1 M pH = 5.5
KCl-Phos	KCl 0.1 M pH = 5.5	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.5 M, KCl 0.1 M, initial pH adjusted to 8.0 with KOH
Phos-Phos	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.5 M, initial pH adjusted to 8.0 with KOH	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.5 M, initial pH adjusted to 8.0 with KOH
KOH-KOH	KOH 25%w pH 15.2	KOH 25%w pH 15.2
KOH-Phos-1	KOH 25%w pH 14.7	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.5 M, initial pH adjusted to 8.0 with KOH
KOH-Phos-2	KOH 25%w pH 14.7	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1.0 M pH 4.0

Table I. Conditions used for each of the experiments performed in galvanostatic mode.

The cathodic potential ( $E_{cat}$ ) showed a strong dependency on the electrolyte composition (figure 6b). The highest cathodic potential was found with KOH 25%, with a value of -1.45 V/SCE, which is not surprising when considering the alkalinity of the solution with pH > 15 (table II). Using a 0.1 M KCl solution also gave high cathodic potentials (-1.39 V/SCE) because of its lack of buffering capacity which allowed a pH augmentation in the catholyte passing from pH 5.5 to 11.9 (table II). When phosphate 0.5 M was used (conditions 'KCl-Phos', 'Phos-Phos ' and 'KOH-Phos-1') the cathodic potential was less negative with values between -1.15 and -1.27 V/SCE. In condition 'KOH-Phos-1' the cathodic potential decreased at 0.5 mV/min due to a pH augmentation from pH 8.0 to 11.0. This pH modification was probably caused by proton diffusion from the cathodic compartment to the anodic one because of the great pH difference between the two compartments of about 7 pH units. This same phenomenon was seen for condition 'KOH-Phos-2' but with a slightly smaller decrease of the potential with time (0.4 mV/min) even though the pH gradient was much higher with about 11 pH units of difference between the two compartments. This was due to the higher phosphate concentration which augmented the buffering capacity of the catholyte. Condition 'KOH-Phos-2' presented the lowest cathodic potential that went from -0.83 to -0.88 V/SCE thanks to a lower pH (between 4.0 and 5.0) and a higher phosphate concentration.

## II. Production d'hydrogène par électrolyse.

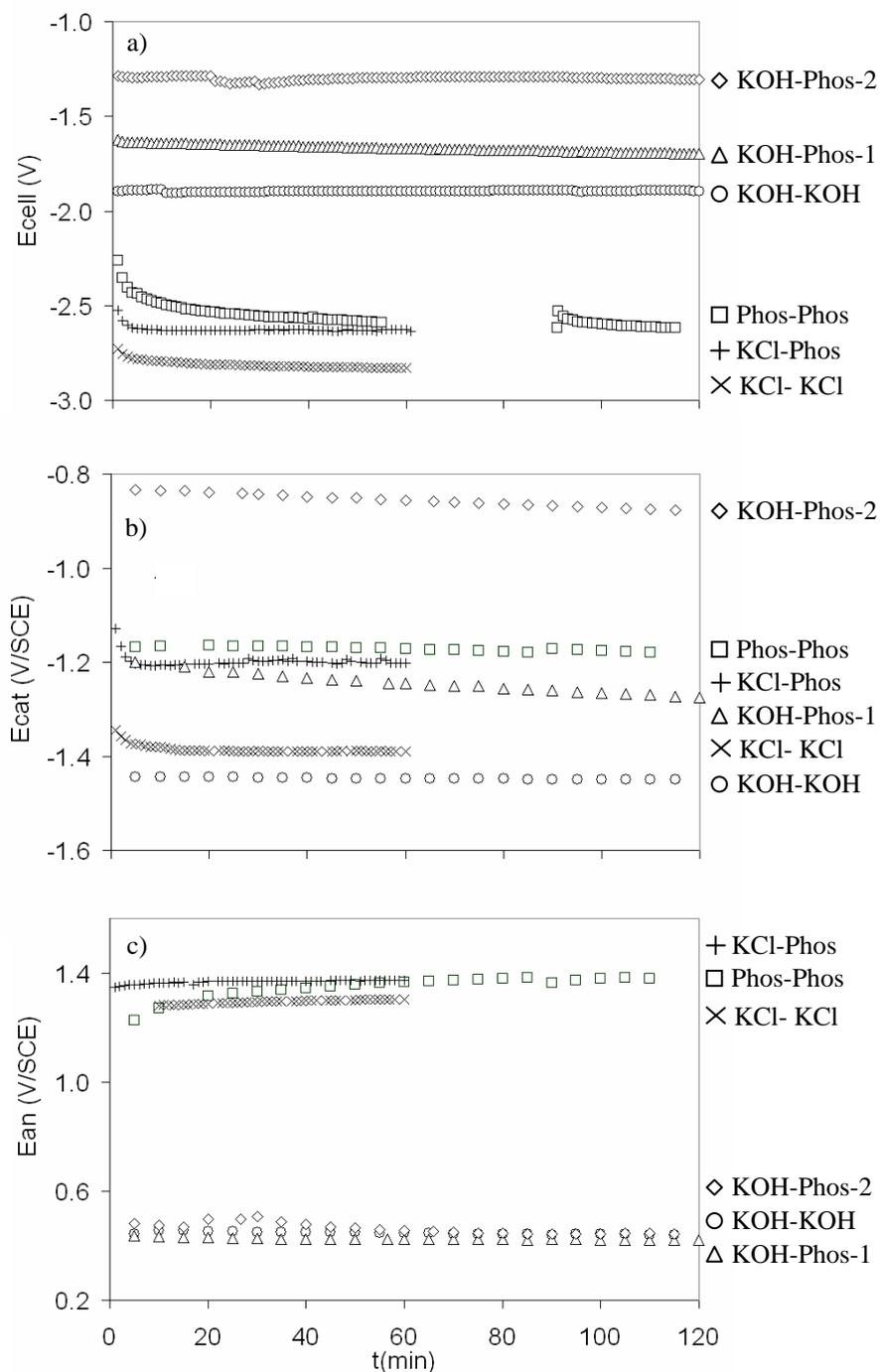


Figure 6. Variation of cell voltage ( $E_{\text{cell}}$ ), cathodic ( $E_{\text{cat}}$ ) and anodic ( $E_{\text{an}}$ ) potentials during the galvanostatic electrolysis at  $-1.35 \text{ mA/cm}^2$  for different conditions. The lack of points in figure 7c, for condition 'KOH-Phos-2' was due to a data storage failure. The perturbation observed at 90 min was caused when the electrolysis was stopped and then restarted. There were lacking points only for the cell voltage because the cathodic and anodic potentials were measured independently with a multimeter.

The anodic potential ( $E_{\text{an}}$ ) curves appeared in two zones (figure 6c): one with high anodic potentials with values between 1.23 and 1.37 V/SCE, which corresponded to conditions where

the anolyte was not a KOH solution (conditions 'KCl-KCl ', 'KCl-Phos' and 'Phos- Phos ') and another one with potentials between 0.4 and 0.5 V/SCE, which corresponded to the experiments made using KOH 25%w as anolyte (conditions 'KOH-KOH ', 'KOH-Phos-1' and 'KOH-Phos-2'). The low anodic potentials obtained with KOH 25%w were due to a high concentration of OH<sup>-</sup>, which implied a lower thermodynamic potential.

Condition	Temperature (anodic side)		Anodic pH		Cathodic pH	
	t = 0	t = 2 h	t = 0	t = 2 h	t = 0	t = 2 h
KCl-KCl	24	24*	2.8	1.9*	5.5	11.9*
KCl-Phos	21.0	21.3*	5.5	1.1*	8.0	8.2*
Phos-Phos	18.8	20.5	8.0	7.9	8.0	8.4
KOH-KOH	23.8	23.1	15.2	15.3	15.2	15.3
KOH-Phos-1	22.9	23.9	14.7	14.4	8.0	11.0
KOH-Phos-2	20.3	21.4	14.7	14.5	4.0	5.0

Table II. Initial and final values of pH and temperature of the cell. The temperature was measured on the anodic side. (\* t = 1 h)

The ohmic drop, cathodic and anodic overpotentials, process efficiency, energy efficiency, and spent energy after 55 minutes of electrolysis are shown in table III for each experimental condition carried out in galvanostatic mode. The ohmic drop due to the resistance of the solution and the membrane, calculated as  $U_{ohm} = E_{cell} - (E_{cat} - E_{an})$ , had the lowest values for conditions using KOH 25%w as anolyte, with 10 mV for condition 'KOH-KOH' and a value close to zero for condition 'KOH-Phos-1' (Table III). The experiments carried out without KOH showed ohmic drops between 50 to 140 mV; 5 to 14 times larger than when using KOH.

The overpotentials were calculated as the difference between the thermodynamic potential and the measured potentials in galvanostatic mode. By considering the Nernst equation applied to the reduction of a weak acid (HB), the thermodynamic potential is written:

Condition	$E_{cell}$ (V)	$U_{ohm}$ (V) $E_{cell} - (E_{an} - E_{cat})$	$\eta_{an}$ (V) $(E_{an} - E_{an}^{th})$	$\eta_{cat}$ (V) $(E_{cat} - E_{cat}^{th})$	Energy Eff. (%) $100 * 1.23/E_{cell}$	$E_{cell}^{th}$ $(E_{an}^{th} - E_{cat}^{th})$	Process Eff. (%) $100 * (E_{an}^{th} - E_{cat}^{th})/E_{cell}$	Spent Energy (kWh/Nm <sup>3</sup> H <sub>2</sub> ) <sup>‡</sup>
KCl-KCl	2.8	0.14	0.43	-0.44	44	1.82	64	7.3
KCl-Phos	2.6	0.06	0.45	-0.48	47	1.63	62	6.8
Phos-Phos	2.6	0.05	0.85	-0.46	47	1.23	47	6.6
KOH-KOH	1.9	0.01	0.37	-0.31	65	1.21	64	4.9
KOH-Phos-1	1.7	0.00	0.30	-0.47	72	0.90	54	4.3
KOH-Phos-2	1.3	-0.01	0.33 <sup>†</sup>	-0.34 <sup>†</sup>	95	0.64	49	3.4

Table III. Cell voltage ( $E_{cell}$ ), ohmic drop ( $U_{ohm}$ ), cathodic ( $\eta_{cat}$ ) and anodic ( $\eta_{an}$ ) overpotentials, energy efficiency, process efficiency, and spent energy for each experimental condition after 55 minutes of electrolysis at  $i = 1.35 \text{ mA/cm}^2$ .

<sup>†</sup> These values are not exactly the real ones because the ohmic drop for condition 'KOH-Phos-2' was negative. The error is attributed to problems with reference electrodes.

<sup>‡</sup> Energy spent per cubic meter of produced hydrogen at  $T = 273.15 \text{ K}$ ,  $P = 101.3 \text{ kPa}$ .

$$E_{\text{red}}^{\text{th}} = E_{\text{HB}/\text{H}_2}^{\circ} + \frac{RT}{2F} \ln \frac{[\text{HB}]^2}{[\text{B}^-]^2 P_{\text{H}_2}} \quad (8)$$

where

$$E_{\text{HB}/\text{H}_2}^{\circ} = \frac{RT}{F} \ln K_{\text{diss}} \quad (9)$$

Substituting (9) in (8):

$$E_{\text{red}}^{\text{th}} = \frac{RT}{F} \ln K_{\text{diss}} + \frac{RT}{2F} \ln \frac{[\text{HB}]^2}{[\text{B}^-]^2 P_{\text{H}_2}} \quad (10)$$

With no current flowing, the system is in equilibrium because no reaction occurs. Under these conditions:

$$\frac{[\text{HB}]}{[\text{B}^-]} = \frac{[\text{H}^+]}{K_{\text{diss}}} \quad (11)$$

Substituting (11) in (10):

$$E_{\text{red}}^{\text{th}} = \frac{RT}{2F} \ln \frac{[\text{H}^+]^2}{P_{\text{H}_2}} \quad (12)$$

The Nernst equation for the reduction of protons in solution is logically recovered, as HB acts as an homogeneous catalyst. Equations 9 to 13 show that the thermodynamic potential for a weak acid depends on the pH of the solution and is independent of the weak acid concentration.

The anodic thermodynamic potentials ( $E_{\text{an}}^{\text{th}}$ ) were calculated using the measured anodic pH values (pH measured continuously in the anodic compartment) while the cathodic thermodynamic potentials ( $E_{\text{cat}}^{\text{th}}$ ) were calculated with estimated cathodic pH values. The cathodic pH was estimated considering a linear variation between initial and final pH values (pH measured at the beginning and at the end in the cathodic compartment). This hypothesis was based on the linear behaviour of the measured anodic pH when phosphate or KOH were

used (fig. 7) and was confirmed with condition 'KOH-Phos-2', the only experiment where the cathodic pH was measured continuously (fig. 8). For condition KCl-KCl the cathodic pH measured at the end of the experiment was the value used to calculate  $E_{cat}^{th}$ .

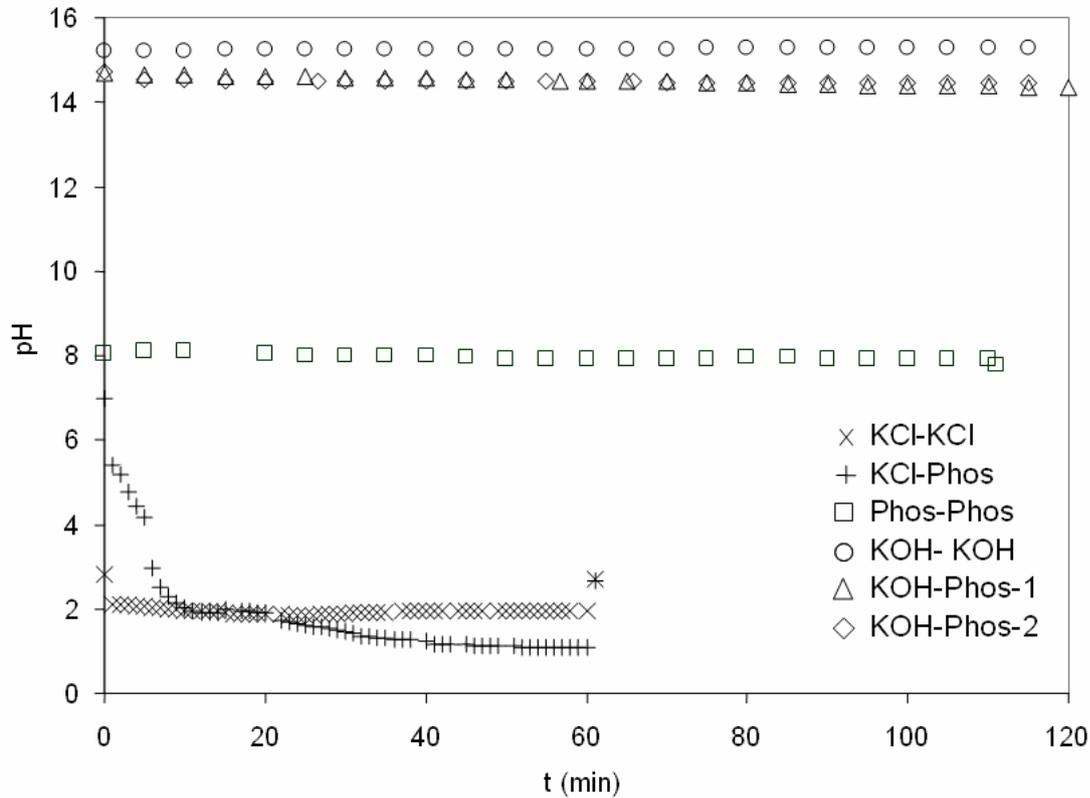


Figure 7. Evolution of pH values of the anodic compartment for each condition during the galvanostatic electrolysis at  $-1.35 \text{ mA/cm}^2$ .

The cathodic overpotential ( $\eta_{cat} = E_{cat} - E_{cat}^{th}$ ) was about 0.5 V when the catholyte was a 0.5 M phosphate solution (conditions 'KCl-Phos', 'Phos-Phos ' and 'KOH-Phos-1'). When 1.0 M phosphate was used as catholyte (condition 'Phos-KOH-2'), the overpotential was 0.34 V. For this condition, the pH of the catholyte was between 4.0 and 5.0 and the species involved in the cathodic reaction was  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ , present in 99 % of the total phosphate concentration, proving once more that the presence of a protonated phosphate species had a catalytic effect on the cathodic current. A higher concentration of phosphate, for example 1.5 M at a pH between 4 and 5, would certainly generate lower overpotentials. The overpotential found with the KOH solution, although similar to the one on condition 'Phos-KOH-2', was the lowest of the five experiments because the proton sources were the water molecules themselves. Their large concentration at the surface of the electrode (about 56 mol/L) produced a high reaction rate.

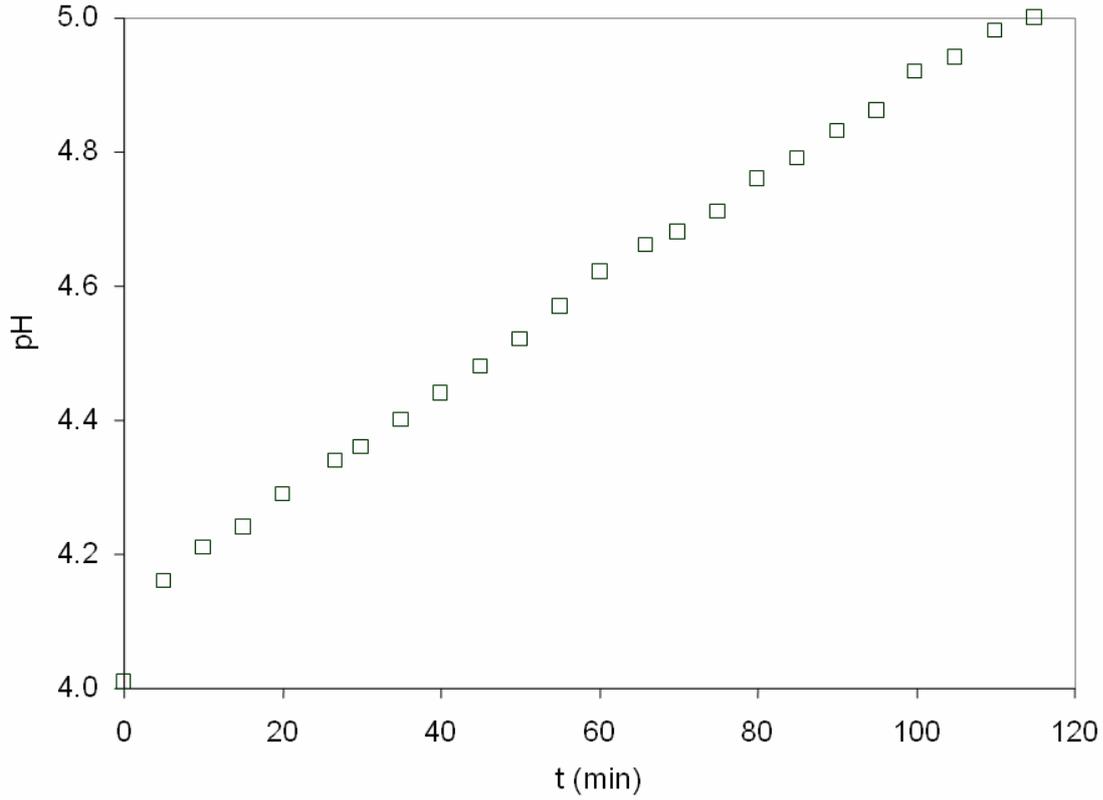


Figure 8. Evolution of pH values of the cathodic compartment for condition 'KOH-Phos-2' during the galvanostatic electrolysis at  $-1.35 \text{ mA/cm}^2$ .

The lowest anodic overpotentials ( $\eta_{\text{an}} = E_{\text{an}} - E_{\text{an}}^{\text{th}}$ ), with values between 0.37 and 0.31 V, were obtained using KOH 25%w as anolyte because the large concentration of  $\text{OH}^-$  produced high reaction rates. The high anodic overpotential of 0.8 V found with phosphate 0.5 M as anolyte (condition 'Phos-Phos'), was probably caused by a poisoning of the platinum electrode due to the adsorption of phosphate ions on its surface as it was seen to happen for the reduction of a phosphate solution (figure 3). Using another anode material may prevent anode poisoning and give lower overpotentials.

The energy efficiency ( $\text{En}_{\text{eff}}$ ), calculated as the ratio between the Gibbs Free Energy of hydrogen combustion ( $\Delta G_{\text{R}}^{\circ} = -237.2 \text{ kJ/mol}$ ) and the Gibbs Free Energy consumed by the process  $\Delta G_{\text{R}} = -2FE_{\text{cell}}$  (equation 14) went from 44 % for condition 'KCl-KCl' to 94.6% for the condition 'KOH-Phos-2' (Table III).

$$\text{En}_{\text{eff}} = \left( \frac{\Delta G_{\text{R}}^{\circ}}{\Delta G_{\text{R}}} \right) * 100 = \left( \frac{237.2 \text{ kJ/mol}}{2FE_{\text{cell}}} \right) * 100 = \left( \frac{1.23 \text{ V}}{E_{\text{cell}}} \right) * 100 \quad (13)$$

## II. Production d'hydrogène par électrolyse.

The high energy efficiency of 94.6% obtained for the condition 'KOH-Phos-2' is quite high if compared to the efficiencies found in industrial processes (70 to 79 %) [1] considering that the current density used was about 75 times lower than the minimum values used in industry which are around 1000 A/m<sup>2</sup> [16]. Further analysis showed that the high efficiency found for condition 'KOH -Phos-2' came from the low cell voltage obtained thanks to the pH difference between the compartments. To compare the performance of each condition considering the pH of the solutions, the process efficiency was calculated as

$$P_{\text{eff}} = \left( \frac{E_{\text{an}}^{\text{th}} - E_{\text{cat}}^{\text{th}}}{E_{\text{cell}}} \right) * 100 \quad (14)$$

which is the percentage of the energy that was used to produce hydrogen and oxygen and was not lost in the form of anodic and cathodic overpotentials. Its values were between 47 and 64 % (table III). These values show that the performance of the reactor is not optimal, but it serves well for the purpose of this section which is to evaluate the use of phosphate solutions as catholyte and compare it with KOH and KCl solutions.

In industrial electrolysis, typical values for the energy consumption are between 4.5 and 5 kWh/Nm<sup>3</sup> H<sub>2</sub>. The consumed energy found in the present work is listed in table III for each operating condition. The best values were found for conditions 'KOH-KOH', and 'KOH-Phos-1', 'KOH-Phos-2'. Condition 'KOH- KOH ' and 'KOH-Phos-1' had an energy consumption with values inside the range of those found in classical electrolysis. However, 'Phos-KOH-1' was better than alkaline electrolysis by 12%. For condition 'KOH-Phos-2', the energy spent to produce 1 Nm<sup>3</sup> of hydrogen (T = 273.15 K, P = 101.3 kPa) was 3.4 kWh/Nm<sup>3</sup>H<sub>2</sub> which is 31% less of the energy required in condition 'KOH- KOH '. Nevertheless this energy gain was principally due to the pH difference between the compartments. Although a process with an acid catholyte and a basic anolyte would seem to give an energetic advantage over using a KOH solution in both compartments, such a process would need a constant feed of an acid solution into the cathodic compartment and of an alkaline solution one into the anodic compartment. The regeneration of the electrolytes would also be necessary to avoid phosphate salts precipitation. Here the purpose of using a KOH solution as anolyte was only to focus on the cathodic side performance.

Results of this section show that the use of phosphate as catholyte can match the performance of KOH solutions but with the advantage of working at mild pH values. Using an even more concentrated phosphate solution, without reaching the saturation concentration of about 1.6 M at 20 °C [17], would work even better generating lower overpotentials than those obtained with KOH 25%w. Phosphate in the anodic compartment did not show a good performance, but using an anode material other than platinum may produce better results. The 316L stainless steel cathode has shown to work well in phosphate solutions for the production of hydrogen.

### *Conclusions*

A voltammetric study of the reduction of phosphate solutions was made on stainless steel 316L and platinum cathodes. Results show that phosphate species serve as a source of hydrogen atoms that need less energy than water to achieve their reduction. This makes phosphate an interesting homogeneous catalyst for the cathodic compartment of an electrolytic cell to catalyse the reduction of water to produce hydrogen. Stainless steel electrodes of type 316L have shown a stable behaviour as cathode in the electrolysis of phosphate solutions.

Hydrogen was produced by the electrolysis of KCl, KOH and Phosphate solutions in a two compartment filter-press Plexiglas reactor using a stainless steel 316L cathode and a platinum grid as anode. Using phosphate 1 M at pH between 4.0 and 5.0 as catholyte can equal the performance of a KOH 25%w solution but with the advantage of working at mild pH values. A more concentrated phosphate solution at the same pH values could show even better results by generating lower overpotentials. Phosphate in the anodic compartment did not show a good performance, but using an anode material other than platinum may produce better results. Phosphate also served as a buffering agent that maintained a relatively stable pH at the cathode preserving a pH difference between the cell compartments. Working with an acidic catholyte and a basic anolyte lowered the reversible potential of the cell producing energy gains of up to 31% when compared to the energy spent with 25%w KOH as electrolyte in both compartments. The best performance was obtained with 25%w KOH as anolyte and 1 M phosphate as catholyte, spending only 3.4 kWh per normal cubic meter of produced hydrogen ( $T = 273.15 \text{ K}$ ,  $P = 101.3 \text{ kPa}$ ).

**References**

- [1] H. Wendt and G. Kreysa, Génie Electrochimique, DUNOD, Paris, 2001.
- [2] M. F. Kibria, M. S. Mridha, and A. H. Khan, International Journal of Hydrogen Energy **20**:435 (1995).
- [3] J. J. Podesta, R. C. V. Piatti, and A. J. Arvia, International Journal of Hydrogen Energy **20**:111 (1995).
- [4] W. J. Albery, Electrode Kinetics, Clarendon Press, Oxford, 1975.
- [5] S. Daniele, I. Lavagnini, M. A. Baldo, and F. Magno, Journal of Electroanalytical Chemistry **404**:105 (1996).
- [6] J. Heyrovsky and J. Kuta, Principles of Polarography, Academic Press, New York, 1966.
- [7] S. Da Silva, R. Basseguy, and A. Bergel, Electrochimica Acta **49**:4553 (2004).
- [8] V. Marinovic and A. R. Despic, Journal of Electroanalytical Chemistry **431**:127 (1997).
- [9] V. Marinovic and A. R. Despic, Electrochimica Acta **44**:4073 (1999).
- [10] Z. Stojek, M. Ciszowska, and J. G. Osteryoung, Analytical Chemistry **66**:1507 (1994).
- [11] P. O'Neill, F. Busi, V. Concialini, and O. Tubertini, Journal of Electroanalytical Chemistry **284**:59 (1990).
- [12] K. Takehara, Y. Ide, T. Nakazato, and N. Yoza, Journal of Electroanalytical Chemistry **293**:285 (1990).
- [13] A. Molina and I. Morales, Journal of Electroanalytical Chemistry **583**:193 (2005).
- [14] L. De Silva Munoz, A. Bergel, and R. Basseguy, Corrosion Science **49**:3988 (2007).
- [15] "Dissociation Constants of Inorganic Species" in CRC Handbook of Chemistry and Physics, Internet Version 2007 (D. R. Lide, ed.), Taylor and Francis, Boca Raton, FL, 2007.
- [16] P. Häussinger, R. Lohmüller, and A. M. Watson, in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, John Wiley & Sons, 2002.
- [17] "Aqueous Solubility of Inorganic Compounds at Various Temperatures" in CRC Handbook of Chemistry and Physics, Internet Version 2007 (D. R. Lide, ed.), Taylor and Francis, Boca Raton, FL, 2007.



### II.3. Considérations sur l'utilisation des gradients de pH dans un électrolyseur.

L'électrolyse de l'eau est réalisée, classiquement, dans une cellule électrochimique constituée par un compartiment anodique et un compartiment cathodique séparés par une membrane ou un diaphragme qui empêche le mélange entre les gaz formés (figure II.2).

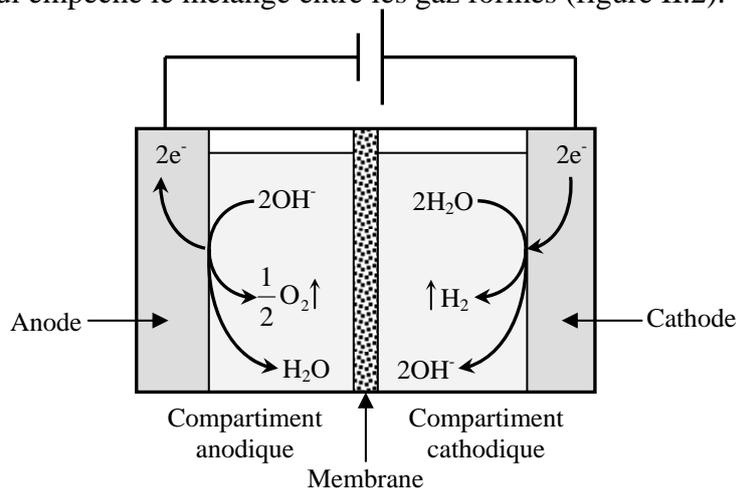
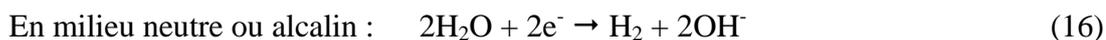
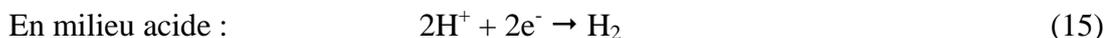
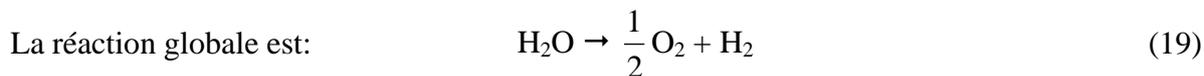
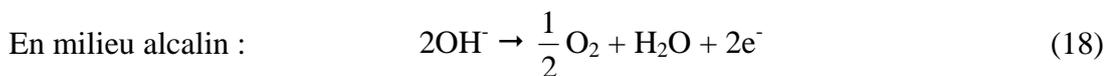
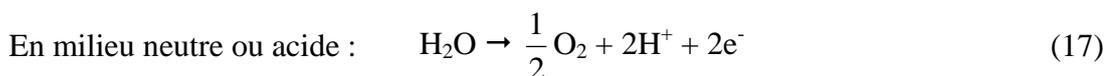


Figure II.2 Schéma d'une cellule d'électrolyse travaillant en milieu basique.

Les réactions impliquées dans la décomposition de l'eau par électrolyse sont, à la cathode:



et à l'anode :



Dans une cellule d'électrolyse, quand la solution est la même dans les deux compartiments, le potentiel réversible ou thermodynamique, qui est le potentiel minimum à dépasser pour que les réactions de décomposition puissent se produire, est :  $\Delta E_{\text{rev}} = E_{\text{an}}^{\text{rev}} - E_{\text{cat}}^{\text{rev}} = 1.229 \text{ V}$ . Mais si le pH des deux compartiments n'est pas le même, cette tension réversible peut augmenter ou

diminuer. Avec l'équation de Nernst, on peut calculer les potentiels des réactions anodique et cathodique à différentes valeurs de pH:

$$\text{Réaction de réduction : } E_{\text{cat}}^{\text{rev}} = -\frac{2.3RT}{F} \left( \frac{1}{2} \log P_{\text{H}_2} + \text{pH} \right) \quad (20)$$

$$\text{Réaction d'oxydation : } E_{\text{an}}^{\text{rev}} = 1.229 + \frac{2.3RT}{F} \left( \frac{1}{4} \log P_{\text{O}_2} - \text{pH} \right) \quad (21)$$

R est la constante universelle des gaz parfaits, T la température, F la constante de Faraday,  $P_{\text{H}_2}$  et  $P_{\text{O}_2}$  sont les pressions partielles d'hydrogène et d'oxygène respectivement. Si le pH augmente, le potentiel de la réaction cathodique se déplace vers des valeurs plus négatives et le potentiel de la réaction anodique diminue. Le potentiel réversible de la cellule lorsque le pH des deux compartiments est différent est:

$$\Delta E_{\text{rev}} = E_{\text{an}}^{\text{rev}} - E_{\text{cat}}^{\text{rev}} = 1.229 + \frac{2.3RT}{F} \left( \log P_{\text{H}_2}^{\frac{1}{2}} P_{\text{O}_2}^{\frac{1}{4}} + \text{pH}_{\text{cat}} - \text{pH}_{\text{an}} \right) \quad (22)$$

Les réactions 15 à 18 montrent qu'au cours du fonctionnement, le pH du côté cathodique a tendance à augmenter à cause de la production des ions  $\text{OH}^-$  ou de la consommation de  $\text{H}^+$  alors que dans le compartiment anodique, le pH a tendance à diminuer à cause de la consommation des ions  $\text{OH}^-$  ou de la production de  $\text{H}^+$ . Si la vitesse de transfert des protons à travers la membrane n'est pas égale au courant ou si les électrolytes ne sont pas mélangés pour neutraliser l'évolution du pH, selon l'équation 22, la tension réversible ( $\Delta E_{\text{rev}}$ ) augmentera, et donc, l'énergie nécessaire pour atteindre un certain courant augmentera aussi.

Dans les électrolyseurs classiques, l'électrolyte circule dans les deux compartiments et à la sortie les solutions provenant des deux compartiments sont mélangées. Les différences de pH, s'il y en a, sont neutralisées grâce à ce mélange. Ainsi, dans les électrolyseurs classiques, la tension réversible n'est pas affectée par une différence de pH entre les électrolytes. Par contre, si l'on fait fonctionner une cellule d'électrolyse avec un compartiment anodique basique et un compartiment cathodique acide, selon l'équation 22, la tension réversible sera plus basse qu'en utilisant le même pH dans les deux compartiments. Ce fait est la cause principale de la diminution de la consommation énergétique de 31%, reportée dans l'article de la section précédente, lorsqu'on substitue la solution de potasse par la solution de phosphate 1,0 M dans le compartiment cathodique.

Travailler avec un gradient de pH entre les électrolytes anodiques et cathodiques présente des avantages énergétiques, mais pour maintenir ce gradient de pH, les électrolytes doivent être régénérés de façon à ne pas diminuer ce gradient. Il faut également éviter la précipitation de sels liée à l'inévitable neutralisation des électrolytes par la production constante de  $\text{OH}^-$  du côté cathodique et du  $\text{H}^+$  du côté anodique et par la diffusion des protons à travers la membrane. Dans un procédé travaillant ainsi, l'énergie gagnée par la diminution du potentiel réversible due au gradient de pH, serait vite perdue par l'énergie nécessaire pour régénérer les électrolytes par des procédés comme, par exemple, l'électrodialyse. Le seul moyen de profiter d'un gain d'énergie grâce à un gradient de pH serait d'utiliser des effluents acides ou basiques qui doivent être neutralisés. De cette façon, au lieu de perdre l'énergie du mélange sous forme de chaleur, elle pourrait être utilisée pour produire de l'hydrogène et éventuellement, par la suite, de l'électricité grâce à une pile à combustible.

### **II.4. Considérations sur la nature d'un acide faible et son effet catalytique sur la réduction de l'eau.**

Dans le chapitre I, il a été montré que la catalyse de la réduction de l'eau par un acide faible dépend de la force de l'acide en question. Pour une même concentration à un pH donné, un acide plus fort présentera une cinétique électrochimique plus rapide qu'un autre acide avec une constante de dissociation plus petite. Egalement, il a été constaté que l'augmentation du courant de réduction augmente avec la concentration de l'acide. Donc, pour choisir un acide faible avec le but de catalyser la réduction de l'eau, il faut prendre en compte quatre facteurs :

#### 1. La solubilité

Vu que l'augmentation de la concentration d'acide faible produit des courants cathodiques plus importants, sa solubilité dans l'eau jouera un rôle important. Un acide faible très soluble dans l'eau pourra être utilisé avec de grandes concentrations qui permettraient d'obtenir des valeurs de courant plus élevées.

#### 2. Le pH de travail et le pKa.

Si le pKa de l'acide est plus faible que le pH de travail, une grande partie de l'acide sera sous sa forme dissociée et donc il ne pourra pas participer comme donneur d'atomes d'hydrogène et ainsi catalyser la réaction de réduction. Alors, il faut que la valeur du pKa de l'acide à utiliser soit plus élevée que le pH de travail. De plus, il est plus intéressant de travailler avec des acides dont le pKa est assez éloigné du pH ( $\text{pKa} \gg \text{pH}$ ) pour avoir la

concentration de la forme la plus protonée la plus importante possible. En effet, à  $pK_a = pH$ , la distribution entre les formes dissociée et non dissociée de l'acide est de 50 %.

### 3. La force de l'acide.

A un pH donné, parmi les acides qui pourraient rester principalement sous la forme non dissociée, le meilleur sera celui dont le  $pK_a$  est le plus petit, c'est-à-dire, l'acide le plus fort. En effet, plus l'acide est fort, plus son atome d'hydrogène est facile à réduire.

### 4. Le coefficient de diffusion.

Le courant limite de diffusion pour la réduction des atomes d'hydrogène d'un acide faible dépend du coefficient de diffusion de l'acide faible. Un coefficient de diffusion plus grand permet un transport des réactifs plus rapide vers l'électrode ce qui permet d'obtenir des valeurs du courant plus élevées.

### **Exemple:**

La figure II.3 présente les diagrammes de prédominance des espèces  $H_3PO_4$ ,  $H_2PO_4^-$ , HLac (acide lactique) et  $Lac^-$  (lactate) en fonction du pH. Si l'on veut catalyser la réaction de réduction de l'eau en utilisant soit les phosphates ou l'acide lactique à une concentration donnée, la figure II.3 peut aider à choisir l'acide à utiliser en fonction du pH de travail. Travaillant à pH 4, par exemple, le phosphate serait un meilleur choix car à ce pH, 60 % de l'acide lactique est sous forme de lactate alors que le phosphate serait à 99% sous la forme  $H_2PO_4^-$ . Le lactate ne peut pas catalyser la réduction de l'eau car il n'a pas d'atomes d'hydrogène à donner tandis que le  $H_2PO_4^-$ , comme il est démontré dans ce chapitre et le chapitre précédent, peut augmenter considérablement le courant de réduction. Par contre, travaillant à pH 3, l'acide lactique serait plus intéressant que le phosphate car, dans ce cas, 87% de l'acide lactique est sous sa forme protonné 'HLac' et 88% du phosphate est sous la forme  $H_2PO_4^-$ . Donc, à pH 3, la présence de l'acide lactique, en étant un acide plus fort que le  $H_2PO_4^-$  ( $pK_{a_{HLac}} < pK_{a_{H_2PO_4^-}}$ ), produira un courant cathodique plus important. Pour finaliser l'exemple, si l'on pense travailler à pH 1, le phosphate redeviendrait la meilleure option car le  $H_3PO_4$ , l'espèce phosphate prédominante à pH 1, est un acide plus fort que l'acide lactique.

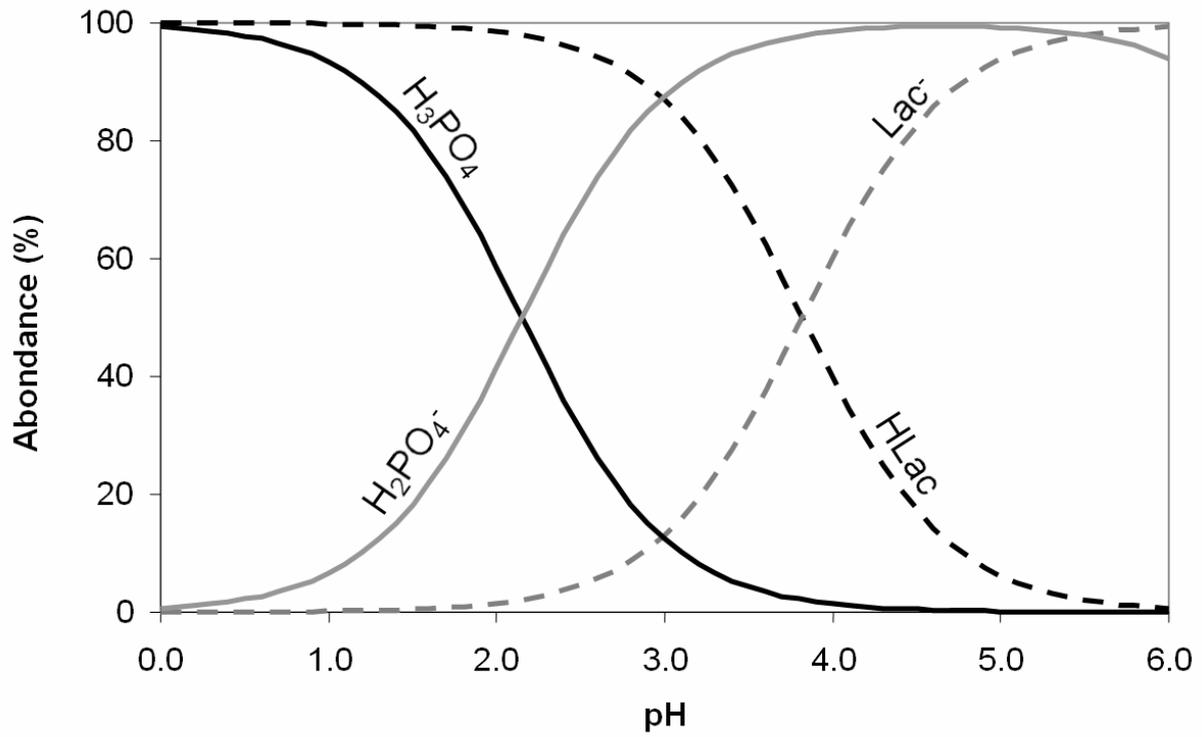


Figure II.3 Diagrammes de prédominance des deux formes du phosphate ( $H_3PO_4$ ,  $H_2PO_4^-$ ), de l'acide lactique ( $HLac$ ) et du lactate ( $Lac^-$ ) à des différentes valeurs de pH.



**Chapitre III.  
Les enzymes comme catalyseurs dans des piles à  
combustible**



### III. Les enzymes comme catalyseurs dans des piles à combustible.

Les enzymes sont des composés organiques synthétisés par le monde vivant. Elles ont une fonction primordiale dans la plupart des réactions chimiques dans notre corps et dans le reste des organismes de la planète. Leurs vertus comme catalyseurs des réactions chimiques et électrochimiques font d'elles des composés qui peuvent être exploités dans des systèmes comme les biocapteurs, les piles à combustible et des procédés de synthèse, mais qui peuvent aussi intervenir dans des processus de biodétérioration des matériaux, comme la biocorrosion des métaux.

Coupler les propriétés catalytiques des enzymes à des matériaux 'industriels' tels que l'acier inoxydable et le titane, qui ne présentent pas en soi un comportement électrochimique idéal pour leur utilisation dans les piles à combustible, pourrait améliorer les performances de ces matériaux. L'intérêt à les utiliser dans les piles à combustible est double : ces matériaux peuvent prendre différentes formes sans compromettre leur stabilité mécanique, ainsi on peut augmenter la surface active et réaliser facilement des changements d'échelle. Par ailleurs, ils présentent des coûts de production moindres que le platine et même que les électrodes à base de graphite pyrolytique ou carbone vitreux, matériaux très souvent utilisés pour la fabrication des électrodes enzymatiques.

Ce chapitre présente d'abord un aperçu bibliographique sur les enzymes : la nature des enzymes et le principe de leur fonctionnement comme catalyseurs sont brièvement expliqués. Le rôle des enzymes dans la biocorrosion et leur utilisation dans des systèmes comme les biocapteurs et les piles à combustible sont aussi commentés. Ensuite le travail expérimental réalisé est présenté. Ce dernier est divisé en deux parties : une étude sur des électrodes modifiées avec des enzymes pour tester la catalyse de la réduction de l'oxygène et l'oxydation du glucose et de l'hydrogène avec différents couples enzyme/matériaux d'électrode, et une étude sur la catalyse de l'oxydation du glucose dans une biopile à combustible utilisant une cathode en acier inoxydable. Finalement les conclusions et les perspectives sont présentées.

#### **III.1. Aperçu bibliographique**

##### **III.1.1. Les enzymes**

Les enzymes sont des structures organiques formées par des acides aminés avec des groupes fonctionnels qui permettent la création des conditions nécessaires pour que certaines réactions chimiques puissent se produire.

En générale, les enzymes ont des formes complexes (fig. III.1) et des hétérogénéités d'ordre :

- Géométrique : ce sont des réseaux d'acides aminés rarement symétriques avec des branches, des bosses et des trous.
- Electrostatique : il y a des zones chargées positivement, négativement ou neutres.
- Hydrophobique : il y a des zones plus hydrophobes que d'autres.
- Chimique : il peut y avoir beaucoup de sortes d'acides aminés et de groupes fonctionnels.

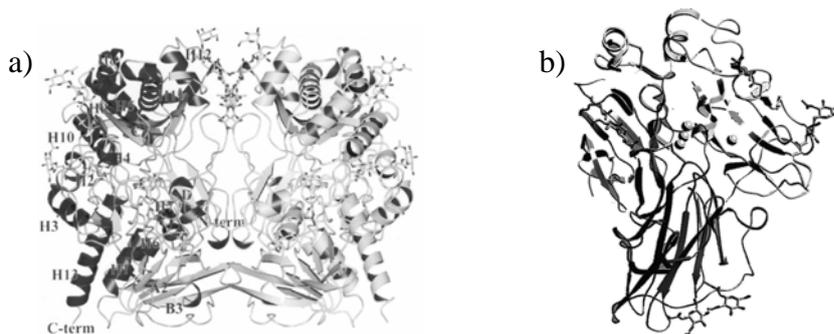
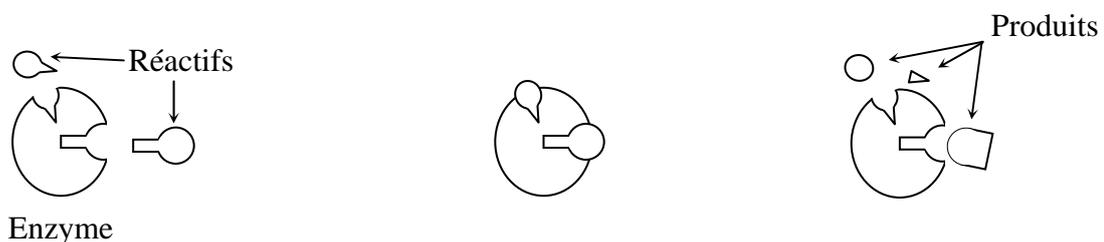


Figure III.1. Représentation schématique de la structure de deux enzymes: a) glucose oxydase (Wohlfahrt, Witt et al., 1999), et b) laccase (Piontek, Antorini et al., 2002).

L'hétérogénéité des enzymes leur permet d'orienter et d'attacher des composés spécifiques dans des sites appelés 'sites actifs', de façon à faciliter leur transformation. La structure complexe des enzymes leur permet d'être des catalyseurs sélectifs, c'est-à-dire qu'elles interviennent dans un seul type de réaction avec un seul type de substrat. Le fonctionnement d'une enzyme peut être vu comme un jeu de puzzle où les pièces sont l'enzyme et les espèces chimiques à transformer (fig. III.2).



1) L'enzyme a des sites libres où des composés spécifiques peuvent s'y attacher.

2) Les sites disponibles sont occupés. Les réactions peuvent se dérouler.

3) Une fois les réactions terminées, les sites sont libérés.

Figure III.2. Schéma simplifié de la catalyse des réactions par une enzyme.

### III. Les enzymes comme catalyseurs dans des piles à combustible.

Les enzymes se classifient selon la nature du substrat et la réaction catalysée. Dans la nomenclature en vigueur, les enzymes portent un numéro à quatre chiffres, le premier chiffre indique le type de réaction catalysée par l'enzyme :

1 : **oxydoréductases**, qui catalysent les réactions d'oxydoréduction.

2 : **transférases**, qui catalysent le transfert de groupes fonctionnels d'une molécule à une autre.

3 : **hydrolases**, qui catalysent les hydrolyses.

4 : **lyases**, qui catalysent les additions sur des doubles liaisons.

5 : **isomérases**, qui catalysent les isomérisations.

6 : **ligases**, qui catalysent la formation de liaisons covalentes C — C ou carbone-hétéroatome avec hydrolyse d'un triphosphate comme l'adénosine triphosphate (ATP).

Normalement, les substrats réduits ou oxydés par les oxydoréductases sont des composés en solution qui doivent s'accrocher à l'enzyme pour que les réactions aient lieu. Mais grâce à la nature électrochimique des réactions liées aux oxydoréductases, ces enzymes peuvent interagir avec une électrode qui peut être la source ou l'accepteur d'électrons. Le système électrode-enzyme peut fonctionner de façon directe: les électrons sont transférés directement entre l'électrode et le site actif de l'enzyme, ou au moyen d'un substrat en solution, appelé médiateur, qui est oxydé ou réduit à l'électrode (fig. III.3).

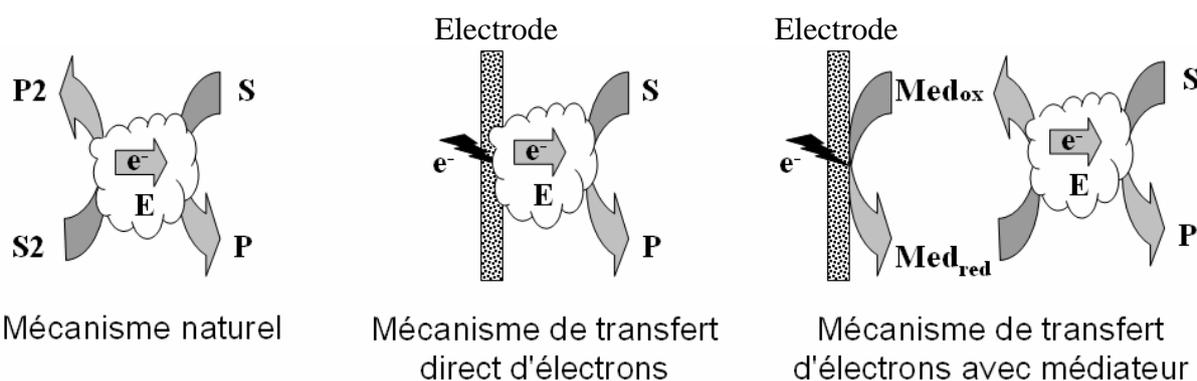


Figure III.3. Représentation schématique des différents mécanismes de transfert d'électrons au sein des oxydoréductases. S et S2: substrats, P et P2: produits, Med<sub>ox</sub>: médiateur oxydé, Med<sub>red</sub>: médiateur réduit, E: enzyme.

La possibilité d'interaction entre une enzyme et une électrode donne lieu à plusieurs applications médicales, industrielles et scientifiques. Comme applications médicales, on peut fabriquer des biocapteurs qui permettent de mesurer des concentrations en composés

organiques comme les sucres, alcools et autres (Scheller, Wollenberger et al., 2001). Dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique, les biocapteurs peuvent aussi simplifier les analyses chimiques des composés organiques (Scheller, Wollenberger et al., 2001; Smutok, Ngounou et al., 2005). Une autre application industrielle est la synthèse dans des réacteurs bioélectrochimiques (Wong and Schwaneberg, 2003). Dans le domaine scientifique, les électrodes modifiées avec des enzymes permettent également d'élucider des mécanismes réactionnels correspondant à des systèmes biologiques (Johnson, Norman et al., 2003).

Par ailleurs, le couplage d'électrodes avec des enzymes est un sujet qui a attiré l'attention de beaucoup de chercheurs intéressés par la production d'énergie à partir des ressources renouvelables. Les électrodes modifiées avec des enzymes peuvent être utilisées dans des biopiles à combustible pour produire de l'énergie électrique à partir de la transformation de composés organiques comme des sucres et des alcools (Katz, Shipway et al., 2003; Bullen, Arnot et al., 2006).

### III.1.2. Les piles à combustible

Les piles à combustible sont des réacteurs électrochimiques dans lesquels l'énergie chimique est transformée en énergie électrique avec un apport continu des réactifs. La génération de l'électricité à partir des réactions électrochimiques est possible grâce à l'échange des électrons qu'il y a entre deux réactifs : un oxydant ou accepteur d'électrons comme l'oxygène:



et un réducteur ou donneur d'électrons comme l'hydrogène:



Si la réaction est spontanée, c'est-à-dire qu'il n'y a pas d'énergie à fournir pour que la réaction se produise, il est possible d'utiliser les électrons échangés pour produire un courant électrique. Les piles et les piles à combustible fonctionnent sur ce principe, mais dans les piles normales, les réactifs ne sont pas fournis en continu.

### III. Les enzymes comme catalyseurs dans des piles à combustible.

Les principaux types de pile à combustible sont listés dans le tableau III.1.

Type de PAC	Electrolyte	Porteur de charge	Température d'opération	Combustible	*Efficacité électrique (système)	Rang de Puissance
PAC Alcaline	KOH	OH <sup>-</sup>	60-120°C	H <sub>2</sub>	35-55%	< 5 kW
Membrane Echangeuse de Protons	Polymère solide	H <sup>+</sup>	50-100°C	H <sub>2</sub>	35-45%	5-250 kW
Acide phosphorique	Acide phosphorique	H <sup>+</sup>	~220°C	H <sub>2</sub>	40%	200 kW
Carbonate fondue	LiCO <sub>3</sub> , KCO <sub>3</sub>	CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	650°C	H <sub>2</sub> , CO, CH <sub>4</sub> , autres hydrocarbures	> 50 %	200 kW - MW
Oxyde solide	Yttria, Zircon	O <sup>2-</sup>	~1000°C	H <sub>2</sub> , CO, CH <sub>4</sub> , autres hydrocarbures	> 50 %	2 kW - MW

\*prend en compte les pertes énergétiques liées aux pompes et ventilateurs

Tableau III.1. Principaux types de piles à combustible (Hoogers, 2003).

La PAC la plus populaire est la pile à hydrogène montrée sur la figure III.4. L'hydrogène (le combustible) traverse une couche de diffusion pour arriver à l'anode où il est oxydé. Les électrons libérés circulent à travers un circuit électrique en produisant ainsi un courant électrique qui peut être utilisé pour fournir du travail. Ces électrons, après avoir parcouru le circuit électrique, arrivent à la cathode et sont consommés dans la réduction de l'oxygène. Les ions H<sup>+</sup> produits par l'oxydation de l'hydrogène traversent une membrane échangeuse de protons, constituée d'un réseau polymérique avec des groupes fonctionnels chargés négativement. Ce transfert des protons entre les compartiments cathodique et anodique est nécessaire pour fermer le circuit électrique. Les protons arrivent à la cathode et participent à la réaction de réduction de l'oxygène.

Oxyder l'hydrogène par voie électrochimique est beaucoup plus efficace énergétiquement que le brûler dans un moteur de combustion interne. Les moteurs à combustion interne ont des

efficacités de l'ordre de 30 % (Stone, 2003), tandis que les piles à combustible ont une efficacité normalement supérieure à 50 % (Chen, 2003; Stone, 2003). En plus, comme les PAC n'ont pas de parties mécaniques ni de réactions explosives, elles travaillent silencieusement.

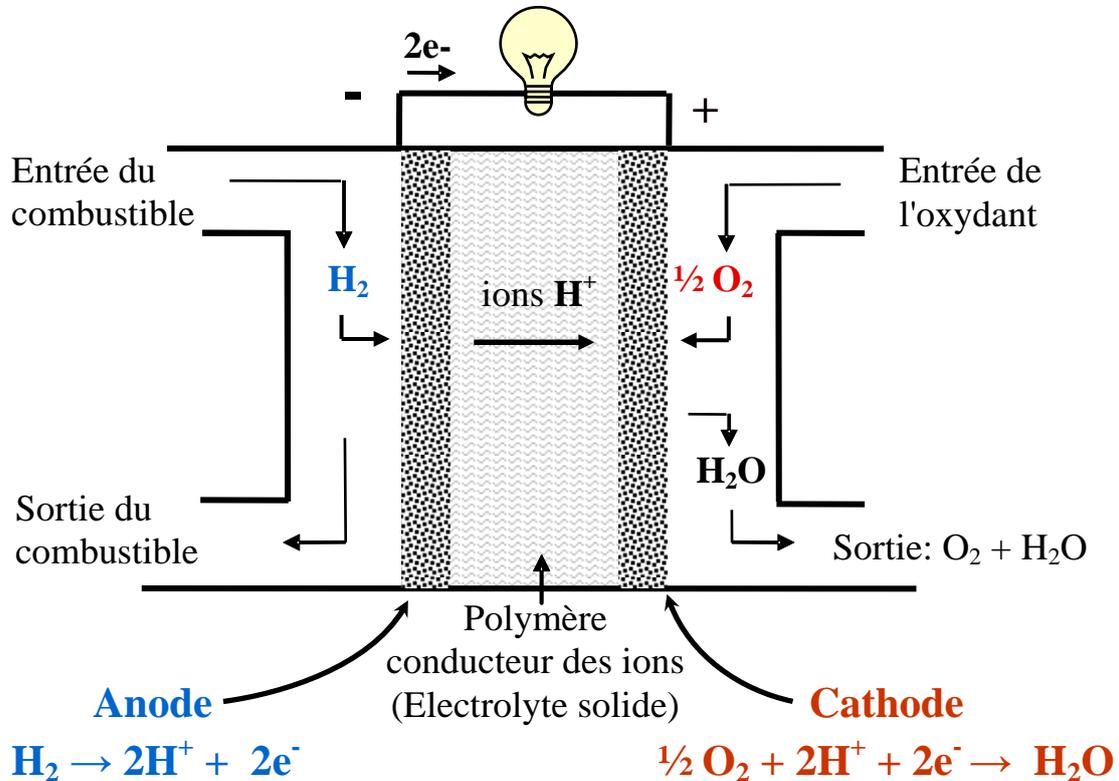


Figure III.4. Schéma d'une pile à combustible à hydrogène et oxygène

Un des principaux verrous à la commercialisation des piles à combustible est le prix. Les matériaux de construction, les coûts de fabrication et l'utilisation du platine comme catalyseur des réactions tant anodiques que cathodiques, font des piles à combustible des alternatives chères par rapport à l'électricité générée par des moyens conventionnels (Hoogers, 2003). Un autre problème à résoudre pour que l'utilisation des PAC soit plus généralisée, est la distribution et le stockage du principal combustible des PACS actuels : l'hydrogène. Bien qu'il y ait des solutions comme le stockage dans des tanks à haute pression, le rapport énergie/volume de combustible est encore loin de celui des combustibles fossiles (Bruijn, 2005). Cela est particulièrement défavorable pour les piles dans la compétition entre les PAC et les moteurs à combustion dans les véhicules. Mais la possibilité d'obtenir de l'énergie électrique à partir des réactions électrochimiques n'est pas limitée à l'oxydation de l'hydrogène. Beaucoup d'autres réactions spontanées, pour lesquelles il y a échange d'électrons, pourraient être utilisées pour générer de l'électricité. Le principal problème à

### III. Les enzymes comme catalyseurs dans des piles à combustible.

résoudre est de trouver les bons catalyseurs pour baisser l'énergie d'activation des réactions et pour transférer les électrons d'une molécule à une électrode et vice versa sans perdre beaucoup d'énergie. Parmi les piles à combustible, qui utilisent d'autres combustibles que l'hydrogène, on trouve les piles qui utilisent des catalyseurs d'origine biologique pour produire de l'électricité à partir de l'oxydation de composées organiques. Ces piles sont connues sous le nom de biopiles à combustible.

#### **III.1.3. Les biopiles à combustible**

Les biopiles à combustible (BioPAC) sont principalement de deux types: celles qui travaillent avec des enzymes (piles enzymatiques) et celles qui utilisent des microorganismes pour fonctionner (piles microbiennes).

Les piles microbiennes fonctionnent avec des microorganismes qui transforment de la matière organique en utilisant une électrode comme récepteur d'électrons. Les électrons passent à travers un circuit électrique pour arriver à la cathode. La cathode peut fonctionner de manière conventionnelle avec un catalyseur inorganique pour réduire l'oxygène ou avec des microorganismes capables de catalyser la réduction de l'oxygène à travers leur voie métabolique en utilisant les électrons de la cathode provenant des réactions anodiques (Bergel, Feron et al., 2005; He and Angenent, 2006). Les premiers systèmes de piles microbiennes fonctionnaient avec des médiateurs synthétiques qui permettaient le transfert d'électrons entre les électrodes et les enzymes utilisées par les microorganismes, mais depuis 2002, de nouveaux types de piles microbiennes ont été développés dans lesquelles les microorganismes échangent directement les électrons avec les électrodes ou grâce à des médiateurs naturels (He and Angenent, 2006). Le grand avantage des piles microbiennes est la grande variété de combustibles potentiels, comme des sucres, des alcools, des déchets organiques, des eaux usées, etc. Une des applications les plus intéressantes des piles microbiennes est la production d'énergie à partir de la dégradation de matière organique des eaux usées (Du, Li et al., 2007; Ghangrekar and Shinde, 2007).

Les piles enzymatiques utilisent des électrodes modifiées avec des enzymes. Les enzymes servent de catalyseurs des réactions qui ne seraient pas possible d'effectuer sur une électrode nue. Un des principaux problèmes de l'utilisation des enzymes comme catalyseurs des

réactions électrochimiques est la nécessité d'un transfert efficace d'électrons entre l'électrode et l'enzyme. Mais au cours des progrès réalisés dans le domaine des biocapteurs, des techniques d'immobilisation ont été développés qui améliorent considérablement le transfert d'électrons (Davis and Higson, 2007).

Plusieurs techniques existent pour immobiliser des enzymes près des électrodes : l'adsorption physique, le confinement avec une membrane de dialyse ou dans une couche polymérique, le couplage covalent via un agent de liaison, ou l'incorporation dans le sein d'un composite de carbone (Krishna, (2002)). Dans certains cas, les enzymes sont utilisées avec des médiateurs tandis que dans d'autres cas, leurs capacités à transférer directement les électrons avec des électrodes sont exploitées (Armstrong and Wilson, 2000).

Les piles enzymatiques ont comme avantage la possibilité d'être conçues pour utiliser une grande variété de combustibles. En plus, grâce à leur bonne sélectivité, il y a la possibilité de travailler sans membrane (Ramanavicius, Kausaite et al., 2005). La figure III.5 montre un exemple de pile enzymatique sans membrane qui utilise du glucose et de l'éthanol comme combustibles. Les réactions aux électrodes sont catalysées par des enzymes qui sélectionnent les réactifs sans risque d'avoir des réactions parasites qui baissent la puissance de la pile, comme par exemple l'oxydation du glucose sur l'anode ou la réaction spontanée du mélange des réactifs.

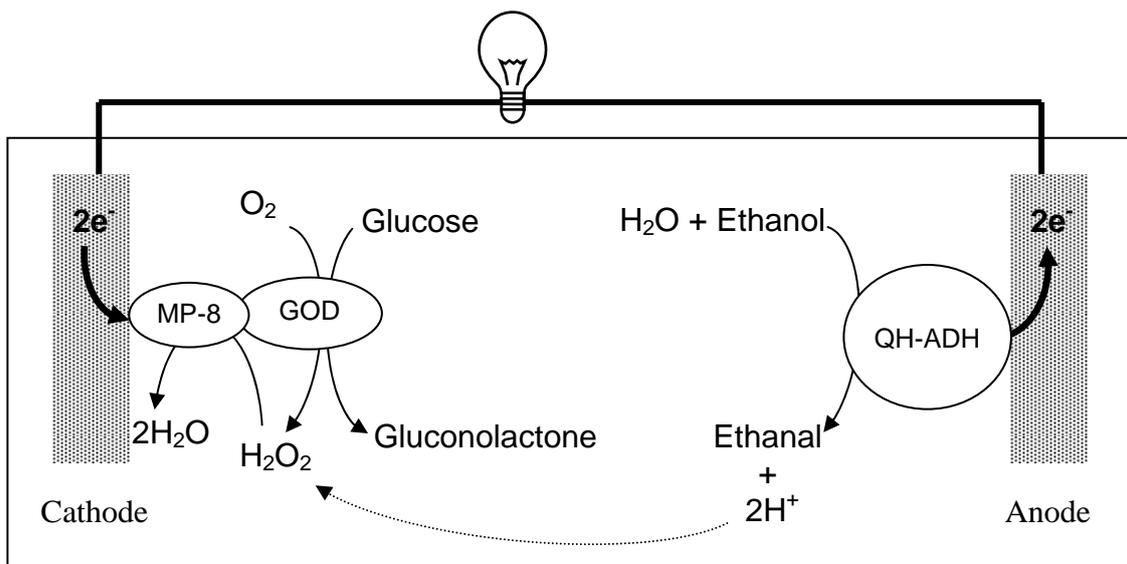


Figure III.5. Représentation schématique d'une pile enzymatique sans membrane fonctionnant avec du glucose et de l'éthanol comme combustibles, une cathode de graphite modifiée avec la microperoxydase-8 (MP-8) et la glucose oxydase (GOD), et une anode modifiée avec une alcool déshydrogénase (QH-ADH) (Ramanavicius, Kausaite et al., 2005).

### III. Les enzymes comme catalyseurs dans des piles à combustible.

Par ailleurs, le pouvoir catalytique des enzymes, s'il n'est pas contrôlé, peut être source de problèmes de biocorrosion dans l'interaction entre le monde vivant et les structures artificielles exposées aux milieux non stériles. Une meilleure compréhension de la biocorrosion peut aider à la contrôler et à proposer des nouveaux systèmes enzyme-matériaux conducteurs qui ensuite pourraient être exploités dans d'autres types d'applications comme les biopiles à combustible.

#### **III.1.4. Les enzymes et la biocorrosion**

Les colonies de microorganismes qui se développent sur des surfaces inorganiques, appelés couramment biofilms, sont des systèmes biologiques qui fonctionnent grâce aux enzymes. Ces dernières font partie du système métabolique des microorganismes en catalysant des réactions dans leurs cellules ou dans le milieu autour. En effet, les enzymes dans les biofilms peuvent être présentes dans les cellules des organismes vivants, dans des cellules mortes ou dans le réseau polymérique excrété par les microorganismes. Certains microorganismes excrètent des enzymes pour dégrader des molécules organiques insolubles pour les rendre métabolisables (Heitz, Flemming et al., 1996). Ce type d'exoenzymes pourraient dégrader des inhibiteurs de corrosion, constitués par des produits organiques comme des résines, peintures, cires, etc. (Sand, 1997). Les oxydoréductases peuvent, également, oxyder des métaux comme le fut montré dans le travail de Nedoluzhko et al. où des surfaces en plomb ou en cadmium ont été oxydés par des hydrogénases grâce à un transfert direct d'électrons entre l'enzyme et le métal (Nedoluzhko, Shumilin et al., 2000). Un autre rôle des enzymes dans la corrosion induite par des microorganismes est celui de la catalyse directe des réactions cathodiques comme la réduction de l'oxygène (Beech and Sunner, 2004) et la réduction du proton, de l'eau ou encore des cofacteurs comme le  $\text{NAD}^+$  (Da Silva, Basseguy et al., 2004). Une accélération des réactions cathodiques implique une demande en électrons plus grande qui peut être obtenue par l'oxydation du substrat métallique, ce qui résulte en une augmentation de la corrosion du matériau.

Un groupe de chercheurs du CEA ont proposé un modèle 'glucose oxydase + glucose' dans de l'eau de mer synthétique pour reproduire l'évolution du potentiel de corrosion de l'acier inoxydable observé dans de l'eau de mer naturelle (L'Hostis, Dagbert et al., 2003). Dans leur

travail, ils ont montré que le peroxyde d'hydrogène et l'acide gluconique produits par l'oxydation du glucose catalysée par la GOD modifiaient la couche passive de l'acier et augmentaient le courant cathodique sur des voltammogrammes tracés en présence d'oxygène (L'Hostis, 2002). L'utilisation de GOD pour améliorer la cinétique de la réduction de l'oxygène est une option intéressante pour l'utilisation des cathodes en acier dans une pile à combustible.

De nouvelles électrodes enzymatiques à base de matériaux 'industriels' tels que l'acier inoxydable et le titane, pourraient alors être conçues pour améliorer les caractéristiques électrochimiques de ces matériaux. Cette amélioration passe soit par une catalyse enzymatique des réactions couplées à un transfert d'électrons vers l'électrode, soit par une modification des propriétés électrochimiques des électrodes par des processus enzymatiques qui rendent les surfaces plus réactives.

## **III.2 Travail expérimental**

### **III.2.1 Catalyse des réactions par des enzymes et l'hémine.**

Dans le but de tester des couples enzyme-électrode pour leur application dans des piles à combustible avec des matériaux 'industriels', l'acier 316L et le titane ont été utilisés en présence de laccase, glucose oxydase, hydrogénase et hémine. Comme expériences de référence, des électrodes de graphite et de carbone vitreux, matériaux très souvent utilisés dans les études de bioélectrocatalyse, ont été aussi employés. Les enzymes choisies l'ont été dans le but d'exploiter leurs capacités de transférer des électrons sans avoir recours à des médiateurs. La glucose oxydase, l'hydrogénase et la laccase sont des enzymes qui ont été déjà reportées comme des enzymes capables de fonctionner de cette manière-là.

#### **a) Laccase**

Les laccases (p-diphénol : dioxygène oxydoréductases, EC1.10.3.2) font partie d'un groupe d'enzymes appelés "enzymes multicuivre". Ces enzymes catalysent l'oxydation de divers composés (phénols, amines et lignines) mais aussi la réduction de certains ions inorganiques et de l'oxygène moléculaire. Elles sont produites par des plantes, des champignons, certaines bactéries et des insectes. La plupart des laccases d'origine mycosique (les "bleu oxydases")

### III. Les enzymes comme catalyseurs dans des piles à combustible.

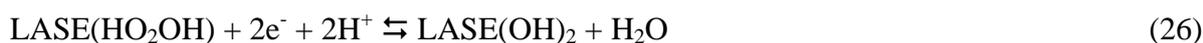
contiennent quatre atomes de cuivre dans un état d'oxydation II réparties dans trois sites redox: un dans un site nommé T1, un autre dans le site T2 et les autres deux dans le site T3 (Gianfreda, Xu et al., 1999). Les laccases (LASE) sont considérées comme de bonnes candidates pour substituer le platine comme catalyseur de la réduction de l'oxygène dans des piles à combustible (Farneth and D'Amore, 2005).

Le mécanisme de réduction de l'oxygène de la laccase implique trois étapes:

une étape de formation d'un complexe enzyme-substrat (Solomon, Sundaram et al., 1996):



un transfert simultané de deux électrons:



et un deuxième transfert de deux électrons plus la dissociation du complexe enzyme-substrat:



Les électrons peuvent être transférés directement entre le site T1 et l'électrode. Le site T1 réduit transfert alors ses électrons aux sites T2 et T3 où les transformations des substrats se déroulent (Gianfreda, Xu et al., 1999).

Les potentiels, à partir desquels la réduction de l'oxygène commence, sont normalement très proches du potentiel d'oxydoréduction du site actif, appelé T1, qui est impliqué dans l'étape de transfert d'électrons entre l'électrode et l'enzyme dans le mécanisme de réduction de l'oxygène (equation 26)(Yaropolov, Skorobogat'ko et al., 1994):

Le potentiel d'oxydoréduction du site T1 dépend de l'origine de la laccase ; pour la laccase *trametes versicolor*, laccase utilisé dans cette étude, ce potentiel se situe entre 0,525 et 0,544 V vs. ECS (Reinhammar, 1972; Solomon, Sundaram et al., 1996). Souvent, le courant limite correspondant à la réduction de l'oxygène dépend aussi de l'origine de la laccase car ce courant ne dépend pas seulement des limitations par diffusion mais aussi des limitations

d'ordre cinétique (Tarasevich, Bogdanovskaya et al., 2003). Sur des électrodes lisses, il a été conclu que seul 10 % de la laccase adsorbée participent aux réactions de réduction (Tarasevich, Bogdanovskaya et al., 2001). Cela a été attribué à une orientation défavorable de l'enzyme adsorbée qui empêche un transfert efficace d'électrons. Avec des électrodes fabriquées à base de nanoparticules de carbone dont la taille est à peu près la même que celle de l'enzyme, presque toute la laccase immobilisée participe à la catalyse de la réduction de l'oxygène (Tarasevich, Bogdanovskaya et al., 2003).

## b) Glucose oxydase

La glucose oxydase (GOD) ( $\beta$ -D-glucose : oxygène 1-oxydoréductase, E.C. 1.1.3.4) est l'enzyme qui catalyse le transfert d'électrons du glucose à l'oxygène en produisant de l'acide gluconique et du peroxyde d'hydrogène. Avec un poids d'approximativement 150-180 kDa, elle est formée par deux chaînes identiques avec un cofacteur flavine adénine nucléotide (FAD) localisé à l'intérieur de chaque chaîne. Le cofacteur FAD est la molécule qui permet la réaction d'oxydoréduction nécessaire pour transformer le glucose et l'oxygène. Le mécanisme réactionnel de l'oxydation du glucose en présence d'oxygène commence avec l'oxydation du  $\beta$ -glucose en gluconolactone par transfert de 2 électrons et 2 protons à l'ensemble GOD-FAD qui se trouve ainsi réduit (fig. III.6). L'oxygène est l'accepteur final d'électrons qui oxyde le  $\text{FADH}_2$  en récupérant 2 électrons et 2 protons pour former du peroxyde d'hydrogène.

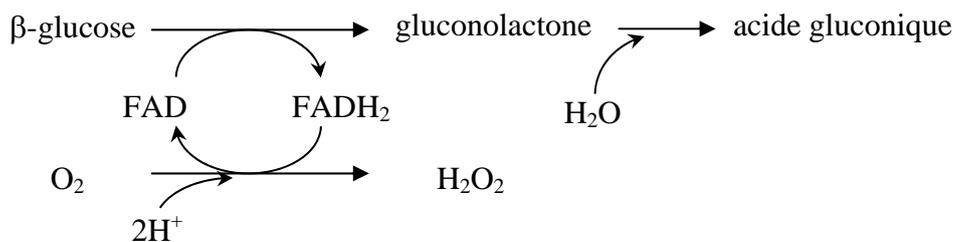


Figure III.6. Schéma du mécanisme de l'oxydation du glucose par la glucose oxydase en présence d'oxygène.

La glucose oxydase est utilisée principalement dans la production de l'acide gluconique et dans des biocapteurs pour doser le glucose dans des produits alimentaires ou dans le sang. Cette enzyme a généré, également, un intérêt pour son utilisation dans des piles à combustible fonctionnant avec du glucose où le peroxyde d'hydrogène produit par la réaction enzymatique est réduit sur la cathode (Ramanavicius, Kausaite et al., 2005; Brunel, Denele et al., 2007) (voir l'exemple de la figure III.5).

### III. Les enzymes comme catalyseurs dans des piles à combustible.

La GOD peut travailler aussi sans oxygène en utilisant une électrode comme accepteur d'électrons pour régénérer le cofacteur FAD. Néanmoins la couche protéique qui entoure le cofacteur rend difficile le transfert direct d'électrons entre le site actif de l'enzyme et l'électrode. Des techniques ont été proposées pour contourner ce problème, comme l'utilisation de nanoparticules d'or (Zhao, Zhang et al., 2006), de nanotubes de carbone (Ivnitski, Branch et al., 2006) ou la réalisation de liaisons covalentes entre l'électrode et le FAD (Katz and Willner, 2003). Malgré la difficulté à réaliser un transfert direct d'électrons à cause de la structure de la GOD, certains travaux montrent ce transfert sur des électrodes non fonctionnalisées à base de carbone (Wang, Thai et al., 2006).

#### **c) Hydrogénase**

Les hydrogénases (HASE) (EC 1.12) sont des enzymes qui se trouvent dans plusieurs microorganismes qui les utilisent pour catalyser l'oxydation de l'hydrogène ou la réduction des protons.



Les hydrogénases sont souvent classées selon les métaux qu'elles contiennent : les plus abondantes sont les hydrogénases [NiFe]; les autres sont des hydrogénases [Fe], [NiFeSe] ou sans métal.

Certaines hydrogénases ont montré une capacité d'échanger des électrons avec des électrodes sans médiateurs (Karyakin, Morozov et al., 2002). Les hydrogénases ont été le sujet de travaux sur la production d'hydrogène par des microorganismes, sur la bioélectrocatalyse de l'oxydation de l'hydrogène dans des piles à combustible (Woodward, Cordray et al., 2000; Karyakin, Morozov et al., 2002). Leur rôle dans la biocorrosion anaérobie a parfois été évoqué (chapitre I).

#### **d) Hémine**

L'hémine (Fer(III) protoporphyrine IX) est une porphyrine contenant du fer (fig. III.7) qui correspond au centre actif des protéines de la famille "Heme" comme la peroxydase, la myoglobine et l'hémoglobine. Son centre Fe III peut être réduit facilement en Fe II sur des

électrodes de divers matériaux (Ye, Wen et al., 2004) et catalyser la réduction du peroxyde d'hydrogène et de l'oxygène avec, d'abord, une étape électrochimique (Zheng, Zeng et al., 2002) :



Suivi de l'étape chimique:

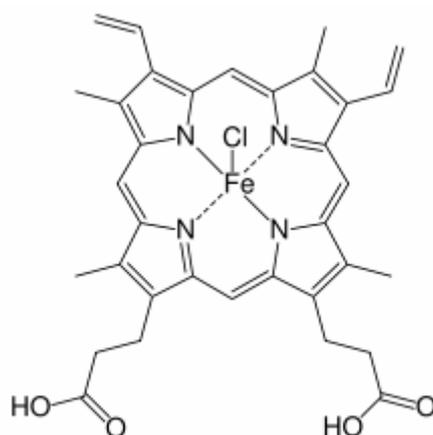


Figure III.7. Représentation schématique de la structure de l'hémine.

L'hémine présente également un pouvoir électrocatalytique pour la réduction d'uranium, de nitrite, de tryptophane et de  $\text{CO}_2$  (Gao and Chen, 2005). L'hémine et d'autres porphyrines métalliques ont été le sujet d'études pour la proposer comme substitut du platine dans des piles à combustible comme catalyseur de la réduction d'oxygène (Liu, Zhang et al., 2006). Elle a également été utilisée comme modèle pour étudier la biocorrosion aérobie de l'acier inoxydable (Basseguy, Idrac et al., 2007).

### III.2.1.1. Matériel et méthodes

Les composés chimiques utilisés sont : le dihydrogénophosphate de sodium ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; Prolabo), l'hydroxyde de sodium ( $\text{KOH}$ ; Prolabo), l'acide citrique ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ , Sigma), le glucose ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ , Sigma-Aldrich), le diméthylsulfoxyde ou DMSO ( $\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$ ; Acros Organics), l'hémine ( $\text{C}_{34}\text{H}_{32}\text{ClFeN}_4\text{O}_4$ , Fluka), l'ortho-dianisidine ( $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2 \cdot 2\text{HCl}$ , Acros Organics), le

### III. Les enzymes comme catalyseurs dans des piles à combustible.

catéchol (C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>, Sigma-Aldrich) et de l'eau déionisée (ELGA PURELAB Option-R, 10-15 MΩ.cm).

Les enzymes utilisées sont : la glucose oxydase (de *Aspergillus niger*, Sigma-Aldrich), la peroxydase (de Raifort *Amoracia rusticana*, Sigma-Aldrich), la laccase (de *Trametes versicolor*, Sigma-Aldrich) et l'hydrogénase (de *Clostridium acetobutylicum*, Laboratoire de Biotechnologie-Bioprocédés INSA Toulouse, France).

Les matériaux utilisés comme électrode de travail sont: l'acier 316L<sup>3</sup> (PMSO, France), le carbone vitreux (Carbone Lorraine), le graphite pyrolytique (Carbone Lorraine), le titane (Goodfellow) et le platine (disque pour électrode tournante, Radiometer Analytical) (Tableau III.2).

<b>Matériaux employés</b>	<b>Diamètre (cm)</b>	<b>Utilisation</b>
Acier 316L	2,0	Cathode
Carbone vitreux	0,3	Cathode et anode
Graphite	0,6	Cathode et anode
Titane	0,2	Cathode et anode
Platine	0,5	Cathode et anode sans enzyme

Tableau III.2. Matériaux employés comme électrodes de travail et leur mode d'utilisation.

Les feuilles abrasives utilisées pour polir les électrodes sont des feuilles de carbure de silicium avec des tailles de grains décroissante de P120 à P4000 (Lam Plan).

Les expériences ont été réalisées dans une cellule Metrohm avec une électrode au calomel saturée (ECS) (Radiometer Analytical) utilisée comme référence et une grille de platine-iridium (10 % iridium) comme électrode auxiliaire. Les électrodes de travail sont enrobées dans une résine (Combisub T 150 de Chrysor) pour définir une surface plane à exposer au milieu. Les différents catalyseurs et milieux employés sont listés dans le tableau III.3. Avant chaque expérience, les électrodes ont été nettoyées par polissage. Les solutions enzymatiques n'ont pas été ajoutées directement au sein de la cellule, mais elles ont été confinées près de

<sup>3</sup> Composition en pourcentage de AISI 316L. C 0,03; Cr 17; Fe 65; Mn 2; Mo 2,5; Ni 12; S 0,03; P 0,045; Si 1.

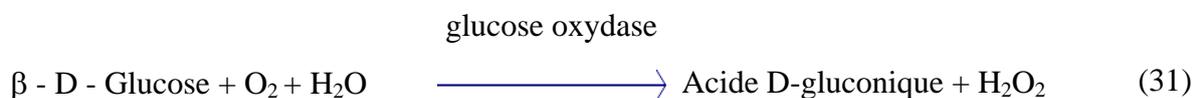
l'électrode de travail avec une membrane de dialyse (CelluSepT4, 12-14 kDa, Orange Scientific) selon le schéma montré dans la figure III.8. Dans le cas de l'hémine (une protoporphyrine qui est très peu soluble dans l'eau), le protocole utilisé est différent : une goutte de solution d'hémine dissoute dans du DMSO (1 mg/mL) a été déposée sur l'électrode de travail et laissée reposer pendant 15 minutes. L'électrode de travail est ensuite rincée à l'eau deionisée avant son introduction dans la cellule ; dans ce cas, aucune membrane n'a été utilisée.

Catalyseur / réaction	Solutions catalytiques	Electrolyte
Laccase / Réduction de l'oxygène	1,5 g/L , ~1,8 U/mL, dans tampon citrate-phosphate de sodium 0,1M à pH = 3,0	Saturé en oxygène à pression atmosphérique. Tampon citrate-phosphate de sodium 0,1M à pH = 3,0
Hémine / Réduction de l'oxygène	1 g/L dans DMSO	Saturé en oxygène à pression atmosphérique. Tampon citrate-phosphate de sodium 0,1 M à pH = 3,0
Glucose oxydase / Oxydation du glucose	~0,5 U/mL dans phosphate de sodium 0,1 M, pH 5,1	Désaéré avec de l'azote. Glucose 50 mM, phosphate de sodium 0,1M à pH = 5,1
Hydrogénase (Oxydation de l'hydrogène)	~400 U/mL dans phosphate de sodium 0,1 M à pH = 8,0	Saturé en hydrogène à pression atmosphérique. Tampon phosphate de sodium 0,1 M à pH = 8,0

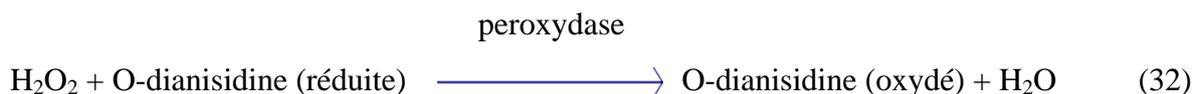
Tableau III.3. Milieux employés selon le catalyseur utilisé.

L'activité enzymatique de la laccase a été mesurée avec un spectrophotomètre (Agilent 8453, soft UV-Visible ChemStation) pour observer l'oxydation du catéchol (10 mM) à une longueur d'onde ( $\lambda$ ) de 410 nm, dans un tampon citrate-phosphate 0,1 M à pH 3,0. Une unité d'activité a été définie comme la variation d'une unité d'absorbance par minute.

L'activité de la glucose oxydase a été mesurée avec le même spectrophotomètre pour observer la transformation du glucose de manière indirecte avec l'O-dianisidine comme indicateur de l'évolution de la réaction ( $\lambda = 436$  nm). Les réactions qui se déroulent dans ce protocole sont :



### III. Les enzymes comme catalyseurs dans des piles à combustible.



L'activité de l'hydrogénase n'a pas été mesurée avant son utilisation. Elle a été calculée à partir de l'activité de la solution enzymatique fournie par le Laboratoire de Biotechnologie-Bioprocédés INSA Toulouse (France). Deux microlitres de la solution originale (225 550 U/mL) ont été dilués dans 1 mL de phosphate de sodium 0,1 M à pH = 8,0.

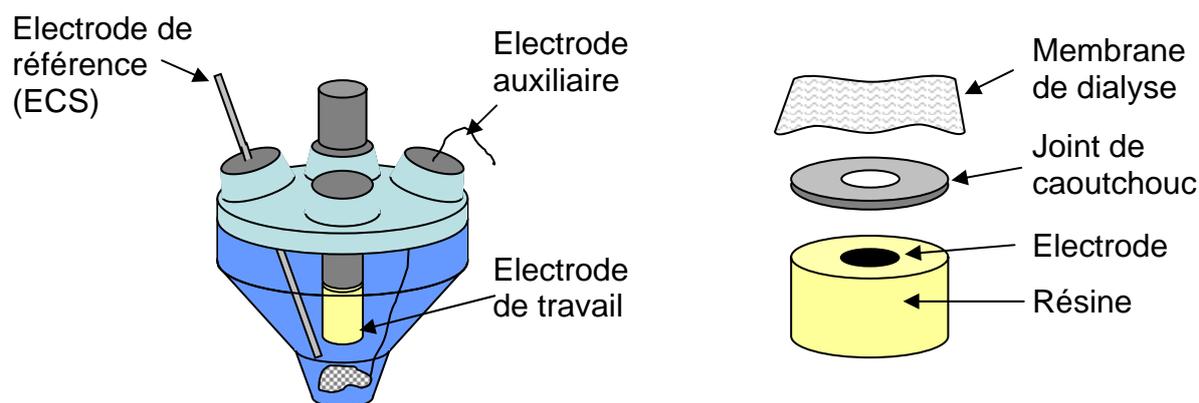


Figure III.8. Schéma du montage électrochimique utilisé dans les expériences.

#### III.2.1.2. Résultats.

##### III.2.1.2.1. Systèmes conçus pour tester la catalyse de la réduction de l'oxygène

###### a) Laccase (de *Trametes versicolor*)

La figure III.9 montre des courbes Intensité-Potentiel obtenues par voltamétrie linéaire avec des électrodes de titane (a), carbone vitreux (b) et graphite (c). Les courbes ont été tracées en présence et en absence d'oxygène avec et sans laccase. Une goutte de la solution enzymatique est confinée entre l'électrode et une membrane de dialyse. Ce confinement permet de maintenir l'enzyme en solution et tout proche de l'électrode.

Les trois électrodes ont montré une limitation par diffusion de la réduction de l'oxygène, laquelle est visible sous la forme d'une vague sur l'électrode de titane, (figure III.9 a) et d'un pic sur les électrodes de graphite et carbone vitreux (figures III.9 b et c). Dans les trois cas, l'effet catalytique de la laccase sur la réduction de l'oxygène a été observé.

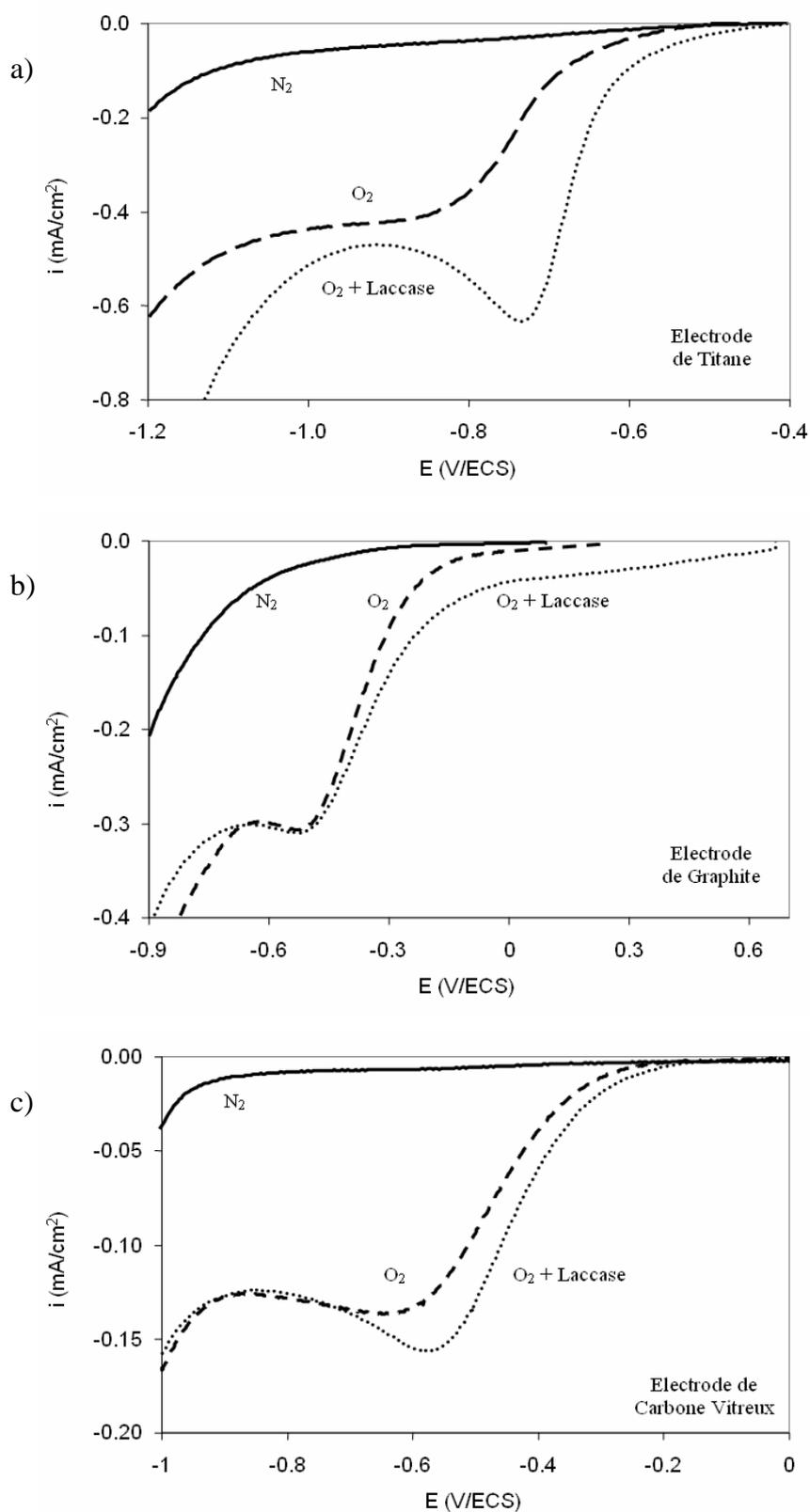


Figure III.9. Courbes Intensité-Potentiel effectuées sur des électrodes de titane (a), graphite (b) et carbone vitreux (c) dans une solution citrate-phosphate 0,1 M à pH 3,0 désoxygénée ou saturée en oxygène à pression atmosphérique avec et sans laccase confinée près des électrodes. Vitesse de balayage : 20 mV/s.

### III. Les enzymes comme catalyseurs dans des piles à combustible.

Les courbes tracées avec l'électrode de titane montrent deux modifications qui résultent de la catalyse de la réduction de l'oxygène : un déplacement de la courbe de 100 mV environ vers des potentiels moins négatifs et la substitution de la vague de réduction par un pic. Le pic est caractéristique des réactions très rapides qui consomment les molécules d'une espèce qui se trouvent près de la surface de l'électrode. A partir du sommet du pic, la concentration des molécules, et donc le courant, diminuent rapidement jusqu'à arriver à la valeur du courant limitée par la diffusion des molécules vers l'électrode. Le courant limite obtenu avec l'électrode de titane se situe entre -4,2 et -4,7 A/m<sup>2</sup>.

Pour l'électrode de carbone vitreux, un déplacement de la courbe vers de potentiels moins négatifs a aussi été montré en présence de laccase (environ 70 mV) et l'intensité du pic a augmenté de -1,37 à -1,57 A/m<sup>2</sup>; ce qui est équivalent à une augmentation de 15 %. Par contre, la valeur du courant limite est resté la même : -1,24 A/m<sup>2</sup>.

L'électrode de graphite a montré un comportement un peu différent en présence de laccase. Pour les courants faibles ( $i < -0,1 \text{ A/m}^2$ ), le potentiel de l'électrode est beaucoup moins négatif en présence de laccase mais au fur à mesure que le potentiel augmente, les courbes avec et sans laccase se rapprochent de façon à se superposer au niveau du pic et du courant limite (-0,3 A/m<sup>2</sup>). Le potentiel à courant nul s'est déplacé de +0,23 V/ECS en absence de laccase à +0,67 V/ECS en présence de l'enzyme.

Des courbes Intensité-Potentiel tracées avec l'électrode d'acier inoxydable en présence ou absence d'oxygène et de laccase sont montrées sur la figure III.10. Le potentiel à courant nul en absence et en présence d'oxygène est de -0,41 et -0,08 V/ECS respectivement (fig. III.10.a). La courbe en présence d'oxygène présente un courant faible sans limitation de diffusion et rejoint la courbe en absence d'oxygène à partir de -0,5 V/ECS avec presque les mêmes valeurs du courant pour le reste des potentiels (fig. III.10 b). La laccase n'a pas montré d'effets catalytiques sur la réduction de l'oxygène.

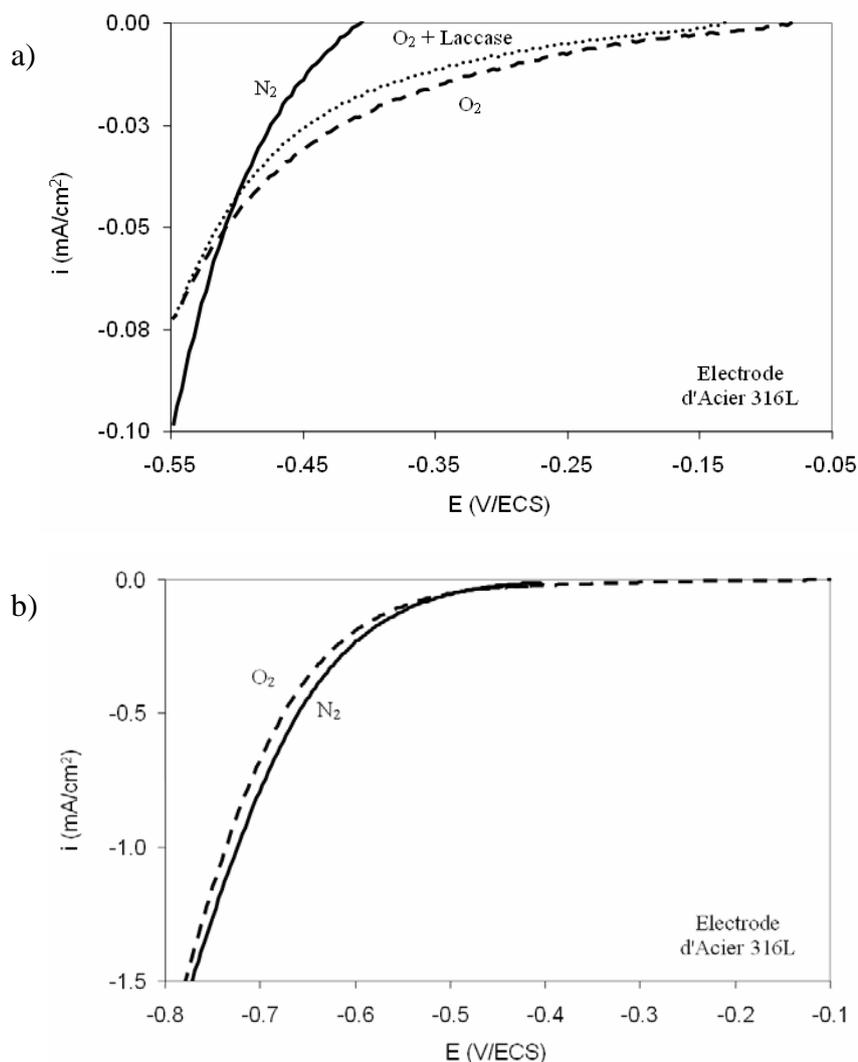


Figure III.10. Courbes Intensité-Potentiel effectuées sur une électrode d'acier inoxydable 316L dans une solution citrate-phosphate, 0,1 M à pH 3,0 désoxygénée ou saturée en oxygène à pression atmosphérique avec et sans laccase confinée près des électrodes. Vitesse de balayage : 20 mV/s.

La catalyse de la réduction de l'oxygène par la laccase en absence de médiateur a déjà été reportée pour des électrodes à base de carbone mais pas pour le titane (Berezin, Bogdanovskaya et al., 1978; Bogdanovskaya, Gavrilova et al., 1986; Yaropolov, Kharybin et al., 1996; Kuznetsov, Shumakovich et al., 2001). Les résultats montrés sur la figure III.9 montrent un effet catalytique de la laccase sur les électrodes de titane et carbone vitreux à des potentiels très bas par rapport à la bibliographie. En effet, le potentiel à partir duquel commence la réduction de l'oxygène (-0.4 V/ECS pour le titane, -0.2 pour le carbone vitreux) est loin du potentiel d'oxydoréduction du site T1 de la laccase utilisée (0.544 V vs. ECS). Sur le titane, la réduction de l'oxygène à des potentiels si négatifs est probablement due aux mauvaises qualités du titane comme cathode. La faible quantité d'enzyme utilisée dans les

### III. Les enzymes comme catalyseurs dans des piles à combustible.

expériences (concentration environ 10 fois plus petite que les valeurs données dans la bibliographie, par exemple 10 g/L dans (Shleeva, Jarosz-Wilkolazka et al., 2005)) est certainement à l'origine de la faible catalyse observée sur les électrodes de carbone : faible déplacement de la vague sur carbone vitreux et graphite. Cependant, pour cette dernière électrode, un plateau de réduction de faible intensité est observé à partir de +0.7 V/ECS. Une plus forte activité enzymatique dans la solution aurait certainement amplifié le phénomène. Pour le cas de l'acier, l'absence de catalyse par la laccase était peut-être due à une mauvaise orientation des enzymes adsorbées qui empêche un bon transfert d'électrons ou à la désactivation de l'enzyme due à des déformations de la structure protéique de la laccase lors de son adsorption sur l'électrode. Ces deux phénomènes ont été souvent rencontrés dans les travaux cherchant à utiliser des enzymes adsorbées sur des électrodes (Gilardi, Fantuzzi et al., 2001).

#### **b) Hémine**

Dans ces expériences, l'hémine n'est pas utilisée en solution car elle n'est pas soluble dans l'eau. L'hémine a été adsorbée sur les électrodes en laissant reposer une solution de DMSO contenant l'hémine dissoute. La membrane de dialyse n'est plus nécessaire et donc elle n'a pas été utilisée. Pour comparer le comportement en présence d'hémine avec celui en présence de laccase, l'électrolyte utilisé est une solution citrate-phosphate 0,1 M à pH 3,0.

La figure III.11 montre des courbes Intensité-Potentiel obtenues par voltamétrie linéaire avec des électrodes de graphite (a) de carbone vitreux (b) et d'acier 316L (c), en présence et en absence d'oxygène avec et sans hémine adsorbée sur les électrodes. Les courbes de réduction obtenues sur l'électrode d'acier ne présentent pas de limitation par diffusion de l'oxygène. La présence d'hémine a permis une augmentation de courant d'environ 150 % à -0,55 V/ECS avec un déplacement du potentiel vers de valeurs moins négatives de 156 mV à -0,07 mA/cm<sup>2</sup> démontrant un effet catalytique important. Cet effet est beaucoup plus flagrant pour les électrodes de carbone vitreux et de graphite avec des valeurs de courant plus importantes que celles obtenues avec la laccase. Pour ces deux électrodes, les courbes tracées en présence d'hémine présentent un pic suivi d'une vague, ce qui indique que l'oxygène est réduit selon un mécanisme différent que celui montré dans les équations 29 et 30. Ici, la réduction de l'oxygène suit plutôt un mécanisme à deux électrons avec la formation du peroxyde d'hydrogène comme produit intermédiaire.

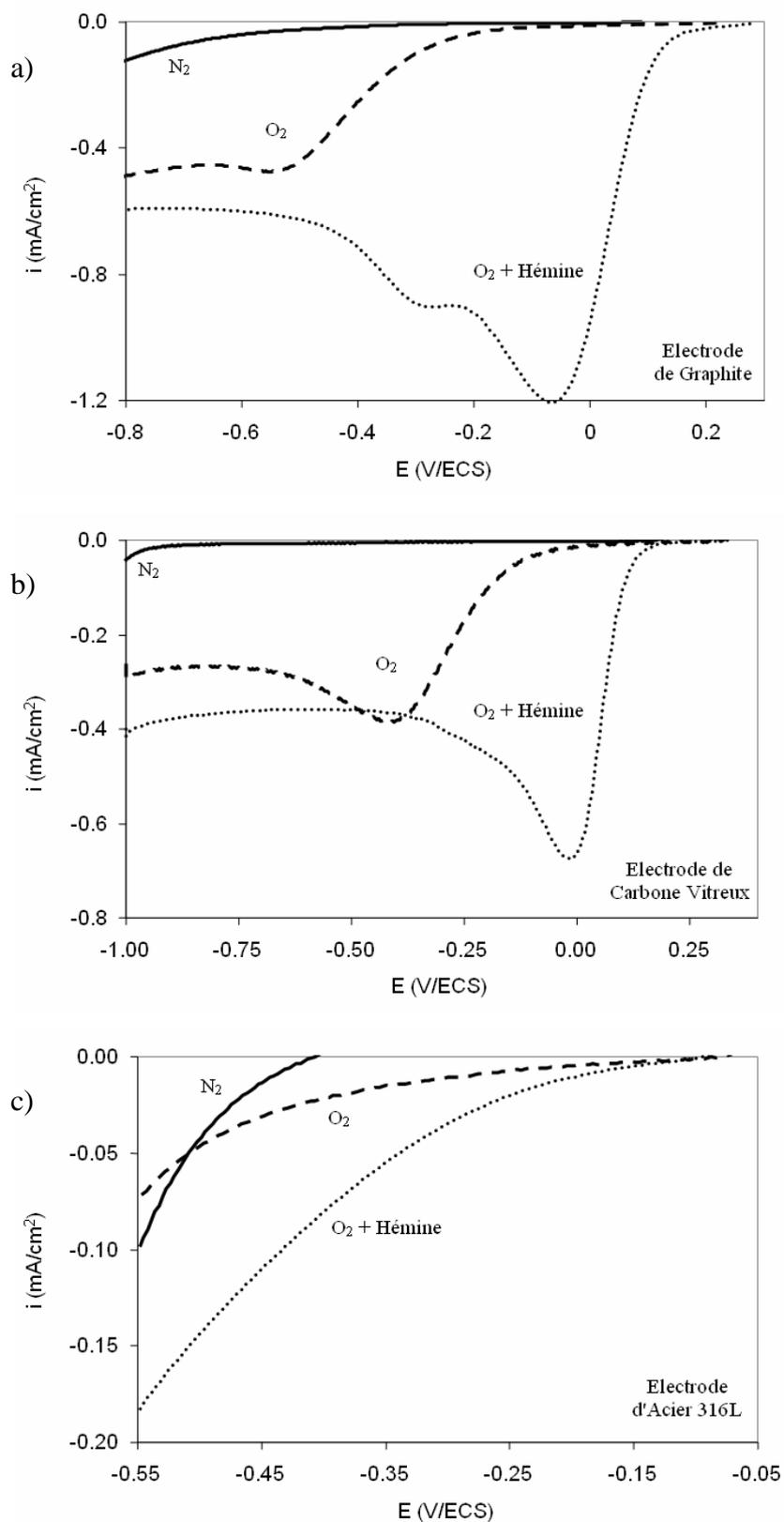


Figure III.11 Courbes Intensité-Potentiel effectuées sur des électrodes de graphite (a), carbone vitreux (b), et acier 316L (c) dans une solution citrate-phosphate 0,1 M à pH 3,0 désoxygénée ou saturée en oxygène à pression atmosphérique avec et sans hémime adsorbée sur les électrodes. Vitesse de balayage : 20 mV/s.

### III. Les enzymes comme catalyseurs dans des piles à combustible.

La réduction du peroxyde d'hydrogène est à l'origine de la vague après le pic. Ce mécanisme à deux électrons est fréquent chez les porphyrines (Liu, Zhang et al., 2006). Dans le cas du carbone vitreux, l'intensité du pic a augmentée de 75 % avec un déplacement de la courbe de 374 mV vers des potentiels moins négatifs. La courbe tracée avec l'électrode de graphite s'est déplacée de 550 mV vers de potentiels moins négatifs en présence d'hémime. L'intensité du pic obtenue en présence d'hémime ( $-1,21 \text{ mA/cm}^2$ ,  $-0,06 \text{ V/ECS}$ ) est 2,6 fois plus grande que celle obtenue avec l'électrode propre ( $-0,47 \text{ mA/cm}^2$ ,  $-0,55 \text{ V/ECS}$ ).

L'électrode de titane modifiée avec l'hémime présente un comportement contraire à celui espéré (Figure III.12). L'électrode se comporte comme si la surface active avait diminué, donnant ainsi des densités de courant plus faibles, avec cependant une réduction de l'oxygène catalysée par l'hémime qui déplace la vague de réduction vers des potentiels plus positifs. Le potentiel à courant nul, passe de  $-0,46 \text{ V/ECS}$  en absence à  $-0,13 \text{ V/ECS}$  en présence d'hémime. Apparemment, seule une partie de l'hémime a réussi à transférer des électrons à l'électrode; l'autre partie a plutôt masqué l'électrode, ce qui a provoqué la diminution de la surface active.

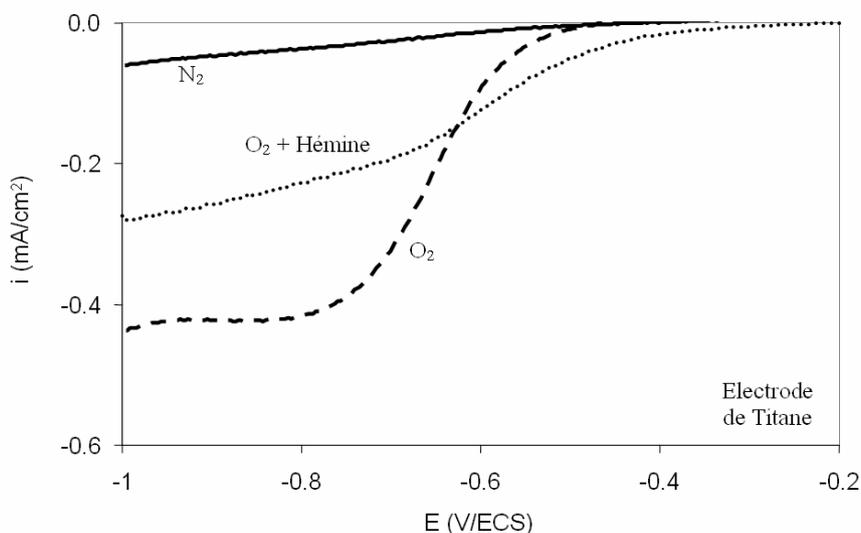


Figure III.12 Courbes Intensité-Potential effectuées sur une électrode de titane dans une solution citrate-phosphate 0,1 M à pH 3,0 désoxygénée ou saturée en oxygène à pression atmosphérique avec et sans hémime adsorbé sur l'électrode. Vitesse de balayage : 20 mV/s.

**c) Comparaison des performances des interfaces avec la laccase, l'hémine et celles du platine.**

La figure III.13 regroupe les courbes Intensité-Potentiel tracées sur toutes les électrodes utilisées en présence de laccase et une courbe tracée avec une électrode de platine (sans laccase) couvert avec une membrane de dialyse. Cette membrane était la même que celle utilisée pour confiner la solution de laccase près des électrodes. Les courbes obtenues avec l'acier et le titane présentent les valeurs de potentiel les plus négatifs, avec des potentiels à courant nul de -0,13 et -0,39 V/ECS respectivement, tandis que la courbe tracée avec le platine est celle avec les valeurs de potentiels les plus positives (potentiel à courant nul de +0,5 V/ECS). Cependant, la courbe du graphite avec la laccase présente un potentiel à courant nul plus positif (+166 mV) que celui du platine et sur une plage de potentiel allant de 0,66 à 0,33 V/ECS, des densités de courant cathodiques plus grandes que celles sur platine. Cela montre que la catalyse par la laccase permet au graphite d'atteindre des performances qui approchent celles du platine pour la réduction de l'oxygène. Le potentiel à courant nul de l'électrode de carbone vitreux est de 0,15 V/ECS.

La différence de la valeur du courant limite obtenue avec l'électrode de graphite et celle du carbone vitreux (fig. III.13), peut s'expliquer comme une différence de rugosité des électrodes car les valeurs de densité du courant ont été calculées à partir de la surface géométrique et non la surface active réelle des électrodes. Une rugosité plus importante a comme conséquence une surface réelle plus grande disponible pour "participer" aux réactions électrochimiques. Normalement le polissage des électrodes avec le même type de feuille abrasif devrait éliminer les différences de rugosité, mais le graphite a des pores dont la taille est normalement entre 0,2 et 10  $\mu\text{m}$  tandis que le carbone vitreux n'a pas de pores. La présence des pores du graphite a pu provoquer l'obtention d'une surface avec des imperfections plus grandes, et donc une surface active plus grande que le carbone vitreux.

Par ailleurs, la surface de l'électrode de titane était beaucoup plus petite que celle des autres électrodes (aire 2,25 fois plus petite que celle du carbone vitreux, 9,00 fois plus petite que celle du graphite et 6,25 plus petite que celle du platine) tandis que le volume du compartiment enzymatique était le même pour tous car le diamètre interne et l'épaisseur du joint qui séparait la membrane des électrodes étaient identiques dans tous les cas. A cause de la petite taille de l'électrode de titane, le courant total produit par les réactions était faible et

### III. Les enzymes comme catalyseurs dans des piles à combustible.

l'oxygène présent dans le compartiment enzymatique a été suffisant pour que la réaction de réduction puisse se dérouler sans que la diffusion de l'oxygène à travers de la membrane n'aie été le phénomène limitant (fig. III.14). Cela a eu comme conséquence que, en absence d'enzyme, le comportement de l'électrode de titane avec et sans membrane était le même (fig. III.15) et c'est la raison pour laquelle le titane a montré une valeur de densité de courant limite beaucoup plus grande que celles obtenues avec les autres électrodes couvertes par la membrane de dialyse (fig. III.13). Par contre, au niveau des potentiels, l'électrode de titane est la moins performante.

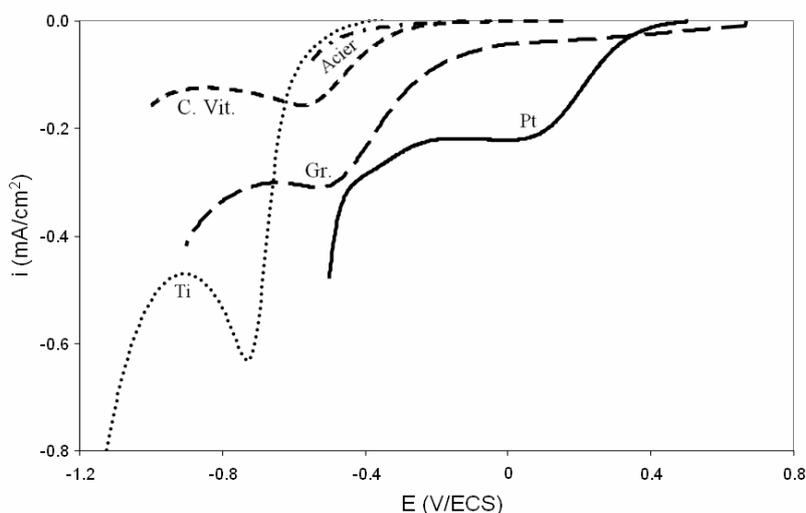


Figure III.13 Courbes Intensité-Potential effectués sur titane, acier, carbone vitreux et graphite en présence de laccase et sur platine sans laccase recouvert d'une membrane de dialyse (12-14 kDa) dans une solution citrate-phosphate 0,1 M a pH 3,0 saturée en oxygène a pression atmosphérique. Vitesse de balayage : 20 mV/s.

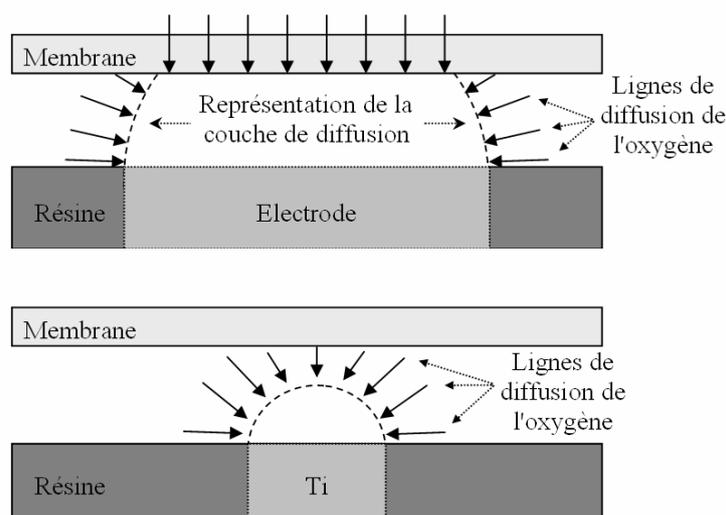


Figure III.14. Représentation schématique de l'effet de la taille des électrodes de titane et de carbone vitreux sur la limitation de la diffusion de l'oxygène par la membrane de dialyse.

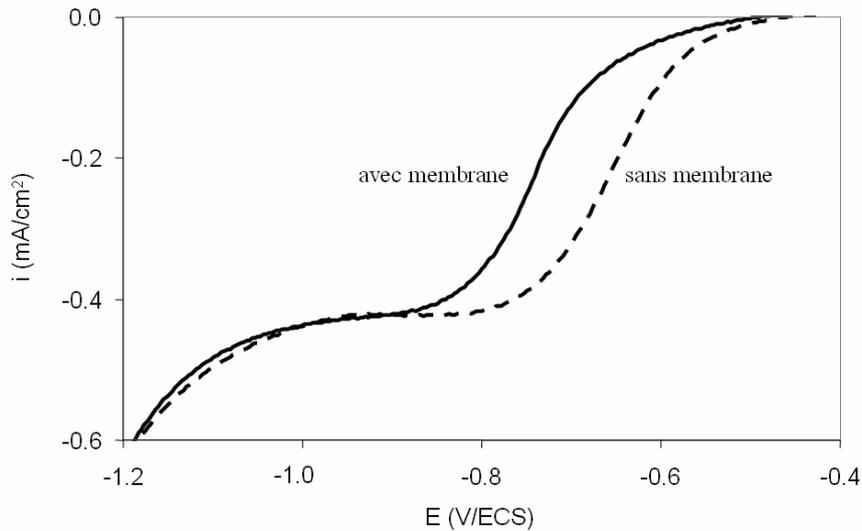


Figure III.15 Courbes Intensité-Potentiel effectuées sur une électrode de titane dans une solution citrate-phosphate 0,1 M à pH 3,0 saturée en oxygène à pression atmosphérique avec et sans membrane. Vitesse de balayage : 20 mV/s.<sup>4</sup>

La figure III.16 regroupe les courbes Intensité-Potentiel tracées sur toutes les électrodes modifiées par l'adsorption de l'hémine et une courbe tracée avec une électrode de platine sans hémine et sans membrane de dialyse.

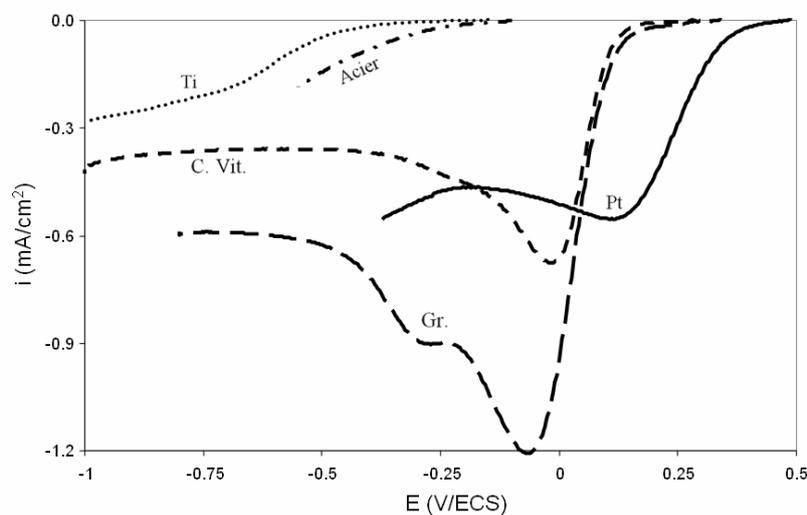


Figure III.16. Courbes Intensité-Potentiel effectuées sur titane, acier, carbone vitreux et graphite en présence d'hémine et sur platine sans hémine dans une solution citrate-phosphate 0,1 M à pH 3,0 saturée en oxygène a pression atmosphérique. Vitesse de balayage : 20 mV/s.

<sup>4</sup> Le décalage des courbes est attribué à une différence d'état de surface.

### III. Les enzymes comme catalyseurs dans des piles à combustible.

Les courbes obtenues avec le graphite et le carbone vitreux modifiées avec l'hémine sont presque superposées du potentiel à courant nul jusqu'à environ 0,04 V/ECS. Le domaine de potentiels dans lequel se situent ces deux courbes est très proche de celui de la courbe de platine avec seulement 137 mV d'écart observés pour une densité de courant de -0,46 mA/cm<sup>2</sup>. La densité de courant obtenue sur l'électrode de graphite est 1,6 fois plus importante que celle obtenue avec l'électrode de carbone vitreux très probablement à cause de la différence de rugosité entre ces deux électrodes. Les courbes tracées avec titane et acier inoxydable sont dans des domaines de potentiels éloignés de ceux des autres électrodes. Bien que le platine présente une meilleure réponse électrochimique, des électrodes modifiées avec l'hémine restent des alternatives très intéressantes pour catalyser la réduction de l'oxygène comme cela a été montré dans la bibliographie.

#### **III.2.1.2.2. Systèmes conçus pour tester la catalyse de l'oxydation du glucose et de l'hydrogène.**

##### **a) Glucose + Glucose oxydase (de *Aspergillus niger*)**

Des courbes Intensité-Potentiel sur des électrodes de graphite, carbone vitreux et titane ont été réalisées dans une solution de glucose en présence et absence de glucose oxydase confinée par une membrane de dialyse (figure III.17). Sur les électrodes de graphite et carbone vitreux, la présence de GOD entraîne l'apparition d'une vague supplémentaire dans le domaine des potentiels élevés (à partir de -0,8 et -0,9 V/ECS pour le graphite et le carbone vitreux respectivement). La différence maximale de potentiel entre les courbes tracées avec et sans GOD est de 120 mV pour le graphite (à une densité de courant de 0,1 mA/cm<sup>2</sup>) et de 156 mV pour le carbone vitreux (à une densité de courant de 0,28 mA/cm<sup>2</sup>). Ce comportement contraste avec celui de l'électrode de titane (figure III.17 c) pour lequel la différence de courant en absence ou présence de glucose oxydase est visible depuis -0,2 V/ECS, qui est un potentiel proche du potentiel à courant zéro (-0,4 V/ECS). Les courbes obtenues avec du titane, présentent un palier qui correspond très probablement à la formation d'oxydes très peu conducteurs car ce palier disparaît lors de balayages successifs sans repolir l'électrode. Le courant obtenu en présence de GOD lors du premier balayage est le résultat de la contribution de la formation de la couche d'oxydes plus l'oxydation du glucose catalysée par la GOD.

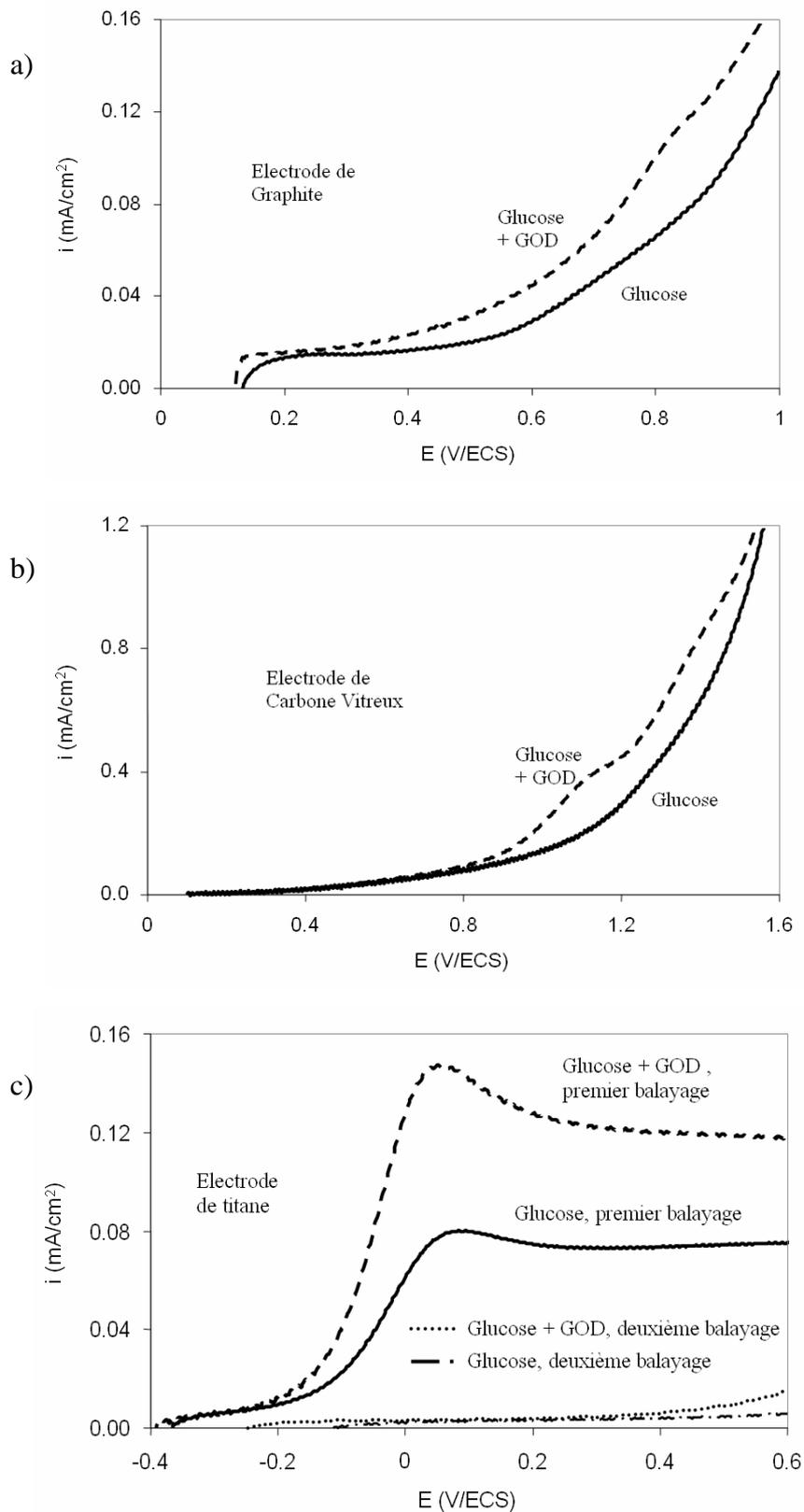


Figure III.17 Courbes Intensité-Potential effectuées sur des électrodes de graphite (a), carbone vitreux (b) et titane (c) dans une solution glucose 50 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1M à pH = 5,1 désoxygénée avec et sans glucose oxydase confinée près des électrodes. Vitesse de balayage : 20 mV/s.

### III. Les enzymes comme catalyseurs dans des piles à combustible.

La réponse obtenue en présence du système glucose/GOD sur le graphite est similaire à des résultats obtenus sur des électrodes à base de graphite hautement ordonné (highly ordered pyrolytic graphite) dans lesquels l'influence de la concentration en glucose est visible à partir de 0,4 V/Ag-AgCl (0,355 V/ECS) ; dans cette étude, les courbes ne présentent cependant pas de pics ou de vagues caractéristiques des phénomènes de limitation par diffusion dans un domaine allant de 0,4 V/Ag-AgCl à 1,0 V/Ag-AgCl (0,355 à 0,955 V/ECS) (Wang, Thai et al., 2006). Ici, les vagues sur les courbes obtenues avec le graphite et le carbone vitreux en présence de GOD pourraient être dues à des limitations par la diffusion, mais cela ne peut pas être confirmé actuellement puisqu'une seule concentration en glucose a été testée.

Le transfert direct d'électrons entre la glucose oxydase et des électrodes sans traitement particulier (fonctionnalisation, dépôt de nanoparticules, etc.) est peut être applicable pour des biocapteurs, mais pour les biopiles à combustible, le courant reste très faible et les potentiels très élevés. Pour réussir dans l'application de la GOD sans médiateur sur des anodes de piles à combustible, l'utilisation de nanostructures pourrait être intéressante car elle permettrait de diminuer la distance entre le centre actif de l'enzyme et l'électrode comme cela a été démontré dans une étude sur des électrodes modifiées avec des nanotubes de carbone (Ivnitski, Branch et al., 2006).

#### **b) Hydrogène + Hydrogénase (de *Clostridium acetobutylicum*)**

Des courbes Intensité-Potentiel réalisées sur des électrodes de graphite, de carbone vitreux et de titane en présence d'hydrogène avec ou sans hydrogénase sont présentées à la figure III.18. La catalyse de l'oxydation de l'hydrogène par l'hydrogénase n'est vraiment mise en évidence que sur l'électrode en carbone vitreux (fig. III.18 a). En effet sur cette électrode en absence et en présence d'hydrogénase, une différence de potentiel de 135 mV est observée entre les potentiels à courant nul et de 90 mV à 0,34 mA/cm<sup>2</sup>. Sur l'électrode de graphite (fig. III.18 b) l'écart entre les courbes en présence et en absence d'hydrogénase n'est visible qu'à partir de 0,9 V/ECS et il atteint une valeur maximale de 62 mV à 0,35 mA/cm<sup>2</sup>. L'électrode de titane (fig. III.18 c) n'a pas donné d'indices de catalyse de l'oxydation de l'hydrogène par l'hydrogénase. Les expériences faites sur l'électrode de titane ont été particulièrement difficiles à reproduire. Encore une fois, comme dans le cas de la figure III.18 c, le palier de formation des oxydes de titane est présent et complique le phénomène.

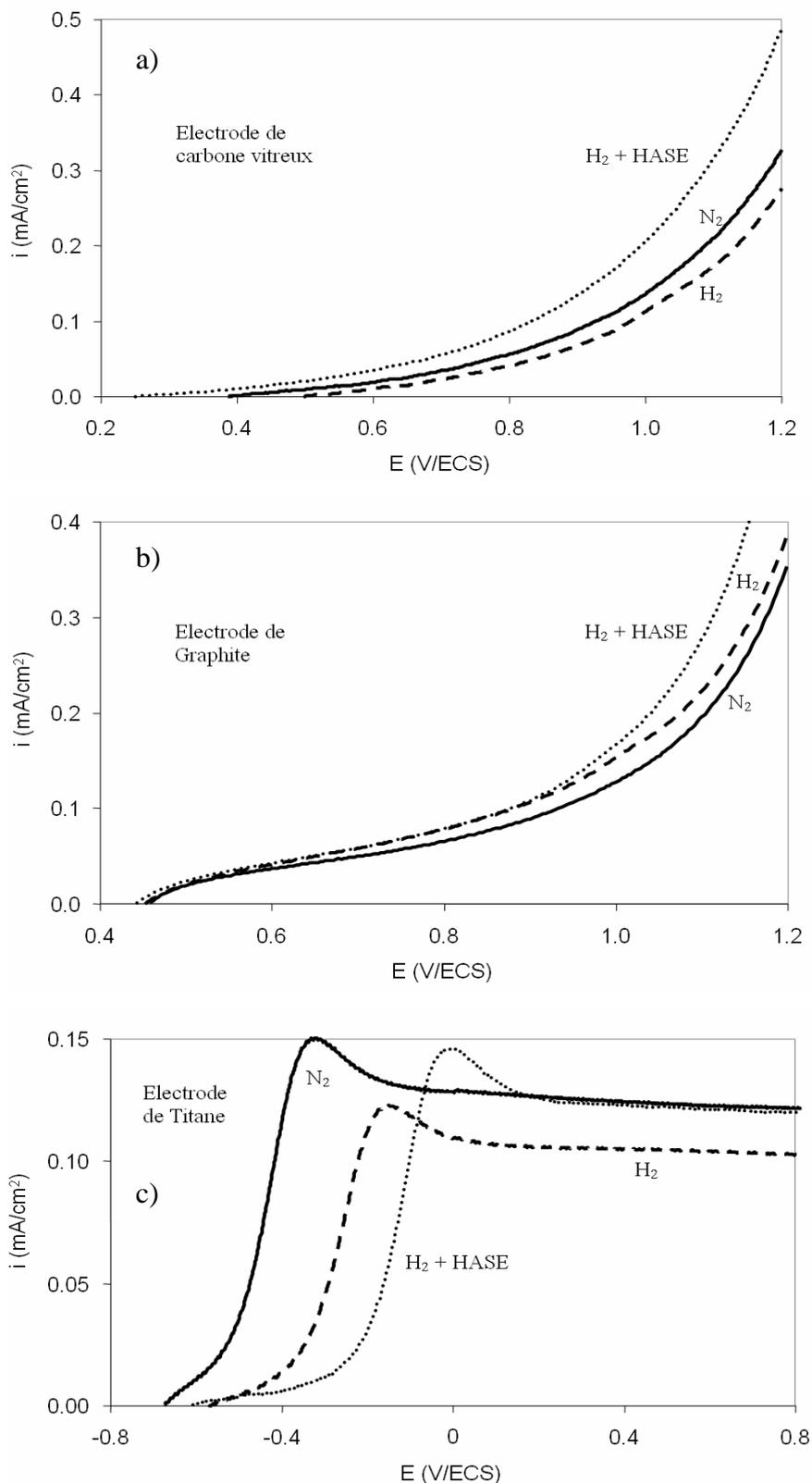


Figure III.18. Courbes Intensité-Potentiel effectués sur des électrodes de carbone vitreux (a), graphite (b) et titane (c) dans une solution phosphate de sodium 0,1 M à pH 8,0 sans hydrogène ou saturé en hydrogène à pression atmosphérique avec et sans hydrogénase confinée près des électrodes par une membrane de dialyse. Vitesse de balayage : 20 mV/s.

### III. Les enzymes comme catalyseurs dans des piles à combustible.

Les résultats présentés dans la figure III.18 montrent que l'hydrogénase utilisée peut transférer des électrons à une anode plate sans avoir besoin d'un médiateur, mais les potentiels auxquels l'augmentation de courant est détectable, ne sont pas pratiques pour une pile à combustible. Ils peuvent l'être, comme pour le cas de la GOD, pour une utilisation dans des biocapteurs. Des électrodes tridimensionnelles ou des techniques d'immobilisation avec des polymères conducteurs devraient être utilisées pour améliorer le transfert.

#### **c) Comparaison des performances des interfaces avec GOD ou hydrogénase et celles du platine.**

La figure III.19 présente la superposition des courbes Intensité-Potentiel réalisées sur les électrodes en présence de glucose oxydase et d'hydrogénase et celle obtenue avec du platine en présence d'hydrogène. La courbe du platine présente une cinétique très rapide atteignant des limitations par diffusion de l'hydrogène à travers la membrane pour une surtension de 50 mV. Les potentiels pour lesquels l'hydrogène commence à s'oxyder sur le platine sont 0,8 V plus bas que les potentiels nécessaires à l'observation des courants d'oxydation sur les autres électrodes. En plus, les cinétiques obtenues sur les autres électrodes sont visiblement très lentes en comparaison avec celle sur platine. Ces résultats montrent encore une fois que sur des électrodes plates, la catalyse de l'oxydation de l'hydrogène et du glucose n'est pas intéressante pour des piles à combustible visant à substituer le platine comme catalyseur.

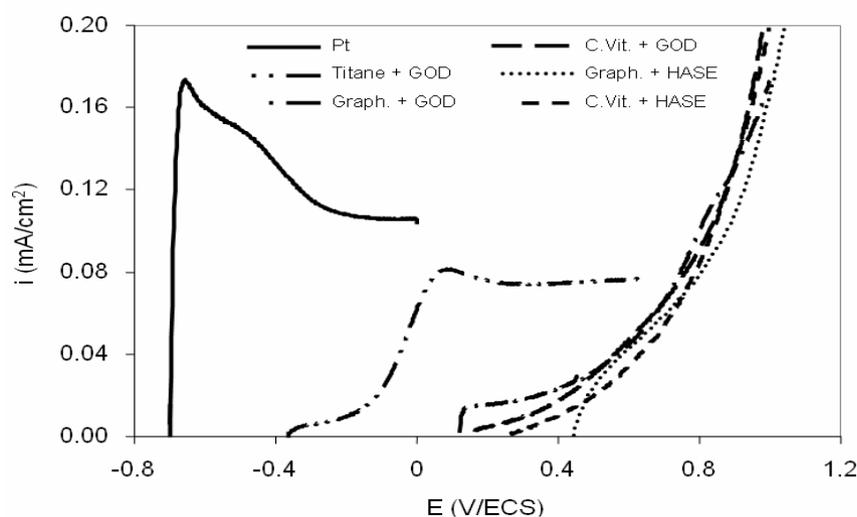


Figure III.19. Courbes Intensité-Potentiel effectuées sur les couples matériaux/catalyseur testés qui ont montré une catalyse de l'oxydation de l'hydrogène et du glucose et sur le platine dans une solution de phosphate de sodium 0,1 M à pH 8,0 saturée en hydrogène à pression atmosphérique. Vitesse de balayage : 20 mV/s.

### **III.2.2. Comportement des cathodes en acier en présence de GOD dans une pile à combustible aqueuse.**

L'interaction de la glucose oxydase avec l'acier inoxydable 316L a montré que la production de peroxyde d'hydrogène modifie les propriétés électrochimiques du matériau la rendant plus performant pour la réduction de l'oxygène (L'Hostis, Dagbert et al., 2003). Ce phénomène peut être à l'origine de problèmes de corrosion, mais ici on essaie de l'exploiter en utilisant des électrodes en acier inoxydable dans une pile à combustible aqueuse en présence de glucose et glucose oxydase.

Pour tester l'influence de la glucose oxydase dans la performance de la pile, des courbes de puissance ont été tracées. Des tests de Mott-Schottky ont été réalisés sur la cathode pour observer les modifications des caractéristiques électrochimiques de l'électrode.

#### **a) Les courbes de puissance pour caractériser des piles à combustible.**

Un moyen pour caractériser la performance d'une pile à combustible, est de mesurer le potentiel (U) que la pile peut fournir dans un circuit fermé en faisant varier la résistance (R) du circuit. Avec le potentiel mesuré, le courant (I) qui traverse le circuit et la puissance (P) de la pile peuvent être calculés selon:

$$I = \frac{U}{R} \quad (33)$$

et

$$P = UI \quad (34)$$

A partir de ces données, on peut tracer des courbes de puissance en fonction du courant, courbes qui prennent une forme de cloche selon l'illustration de la figure III.20. Avec ce genre de courbes, il est possible de comparer la performance de différentes piles. Plus grande et haute est la cloche, meilleure est la pile. Dans l'exemple de la figure III.20 la pile 2 présente une meilleur performance que la pile 1.

### III. Les enzymes comme catalyseurs dans des piles à combustible.

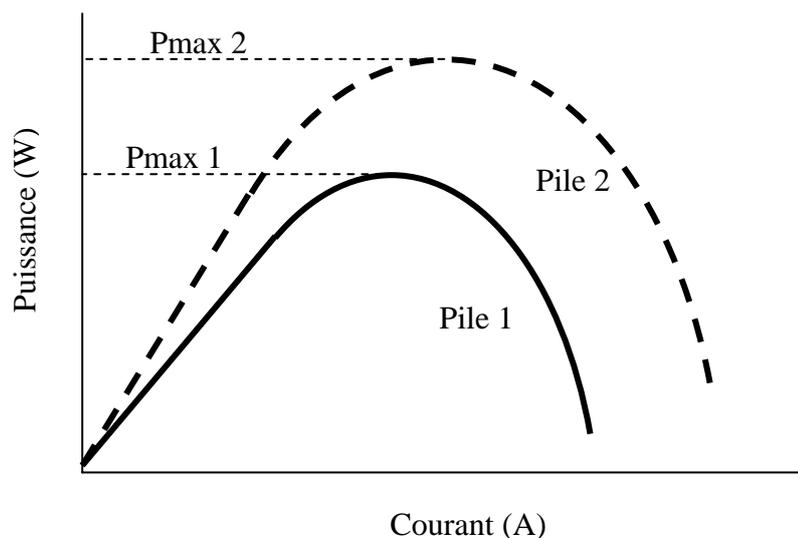


Figure III.20. Illustration schématique de la forme des courbes de puissance en fonction du courant.  $P_{max}$  = puissance maximale de la pile.

En plus de mesurer la tension de la pile, mesurer les potentiels des compartiments cathodique ( $E_{cat}$ ) et anodique ( $E_{an}$ ) par rapport à des électrodes de référence peut être très utile pour mieux caractériser une pile. Avec  $E_{cat}$ ,  $E_{an}$  et  $I = I_{an} = -I_{cat}$  on peut tracer des courbes Intensité-Potentiel selon l'illustration de la figure III.21. Les courbes anodiques et cathodiques obtenues donnent des informations sur la cinétique des réactions. Par exemple, sur l'illustration de la figure III.21, la courbe anodique de la pile 4 montre une cinétique d'oxydation plus lente que celle de la pile 3 car la courbe de cette dernière est plus verticale. Par contre, la pile 4 a une cinétique cathodique plus rapide que la pile 3.

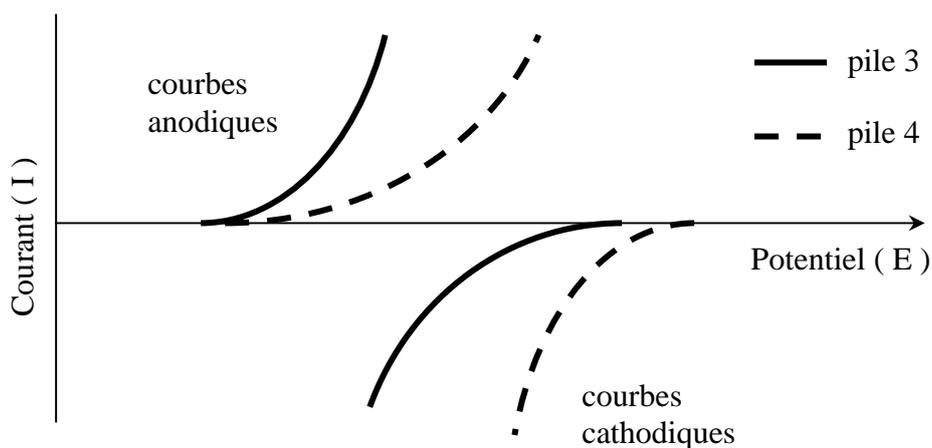


Figure III.21. Illustration schématique de la forme des courbes d'intensité-potentiel anodiques et cathodiques des piles.

### b) Les courbes Mott-Schottky.

Les courbes de Mott-Schottky sont utilisées pour obtenir des informations sur le comportement semi-conducteur des matériaux. Elles sont tracées en mesurant la capacitance d'une électrode pour différents potentiels à l'aide des mesures d'impédance à une fréquence unique. L'utilité de ces courbes repose sur la relation de Mott-Schottky :

$$\frac{1}{C^2} = \left( \frac{2}{e\epsilon\epsilon_0 N_D} \right) \left( -\Delta\phi - \frac{kT}{e} \right) \quad (35)$$

où C est la capacitance associée à la charge du matériau, e est la charge de l'électron,  $\epsilon$  et  $\epsilon_0$  sont les constantes diélectriques du matériau et du vide respectivement,  $N_D$  est le nombre de porteurs de charges,  $\Delta\phi$  est le potentiel de la surface par rapport au sein du matériau, k est la constante de Boltzmann et T la température. Notamment deux caractéristiques des matériaux semi-conducteurs peuvent être obtenues à partir des courbes Mott-Schottky : le potentiel de bande plate ( $E_{bp}$ ) et le nombre de porteurs de charge ( $N_D$  : nombre de donneurs d'électrons ou  $N_A$  : nombre d'accepteurs d'électrons). Le potentiel de bande plate est le potentiel pour lequel la charge de l'électrode est nulle. Des potentiels plus positifs que  $E_{bp}$  chargeront l'électrode positivement, et des potentiels plus négatifs que  $E_{bp}$  donneront une charge négative à l'électrode. Ces courbes servent aussi pour déterminer si le semi-conducteur contient majoritairement des atomes donneurs d'électrons (semi-conducteur type n, pente  $1/C^2$  -E positive), ou des atomes accepteurs d'électrons (semi-conducteur type p, pente  $1/C^2$  -E négative).  $N_D$  peut être calculé à partir de la pente de la section droite de la courbe (figure III.22).  $E_{bp}$  est la valeur de potentiel de l'extrapolation de la droite à  $1/C^2 = 0$ . Pour des électrodes conductrices, les courbes Mott-Schottky présentent une capacitance indépendante du potentiel.

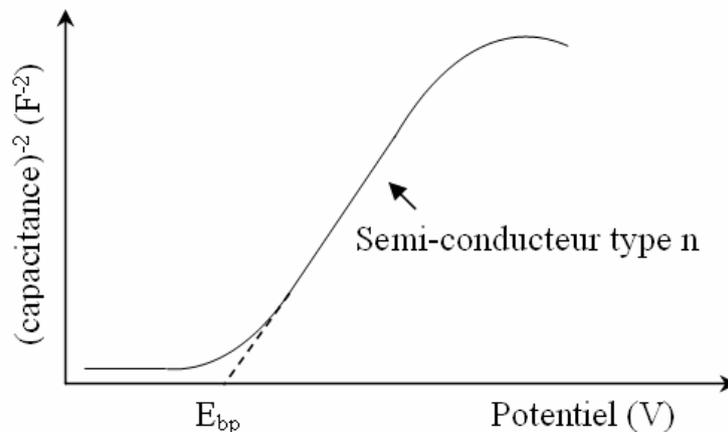


Figure III.22. Illustration schématique des courbes de Mott-Schottky pour un semi-conducteur type n.

#### **III.2.2.1 Matériel et méthodes**

Les composés chimiques qui sont ont été utilisés sont : le dihydrogénophosphate de sodium ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; Prolabo), l'hydroxyde de sodium (KOH; Prolabo), le glucose ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ , Sigma-Aldrich), et de l'eau déionisée (ELGA PURELAB Option-R, 10-15  $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$ ). L'enzyme utilisée a été la glucose oxydase (*Aspergillus niger*, Sigma-Aldrich), et les matériaux utilisés comme électrode de travail ont été l'acier AISI 316L et de l'acier grenailé type 254 SMO<sup>5</sup> (Outokumpu Stainless AB).

Les expériences ont été réalisées dans un réacteur en plexiglas comportant trois compartiments : le compartiment enzymatique, où la solution enzymatique à tester est confinée contre la cathode à l'aide d'une membrane de dialyse (CelluSepT4, 12-14 kDa, Orange Scientific) et les compartiments du catholyte et de l'anolyte dans lesquels les solutions électrolytiques circulent grâce à une pompe péristaltique (Cole-Parmer Instrument) avec deux têtes (MasterFlex 7017-20) (figure III.23). Dans chacun des circuits se trouve un réservoir où la solution qui circule est soumise à une agitation et à un bullage d'oxygène (pour le catholyte) ou d'hydrogène (pour l'anolyte).

La cathode consiste en une plaque d'acier inoxydable de type 316 L ou d'acier grenailé de type 254 SMO. La membrane de dialyse sépare la solution enzymatique du reste du catholyte. Cette membrane assure le passage des ions et de l'oxygène entre la partie du catholyte en circulation et la solution enzymatique, en maintenant l'enzyme confinée près de la cathode. Une membrane Nafion<sup>®</sup> (N115) sépare la zone cathodique de la zone anodique. L'anode consiste en une grille d'un alliage platine-iridium (Ir 10 %) (Platecxis, France). Deux électrodes au calomel saturé (Radiometer), connectées aux compartiments par des capillaires de Luggin, ont été utilisées comme référence pour mesurer le potentiel anodique et cathodique. Les trois potentiels (cellule, anodique et cathodique) et la température ont été enregistrés à l'aide d'une carte d'acquisition (National Instruments USB 6009). Un potentiostat (VSP, Biologic) a été utilisé pour réaliser des études d'impédance sur la cathode. Les courbes de puissance ont été obtenues en utilisant une boîte de résistances avec des valeurs allant de 55700 à 178 ohm en suivant une loi  $R_{i+1} = 55700 * 10^{-0.25*i}$  ( $i = 0, 1, 2 \dots 10$ ). L'activité

---

<sup>5</sup> C: 0,012, Si: 0,3, Mn: 0,34, P: 0,019, S: 0,001, Cr: 20,16, Ni: 18,12, Mo: 5,98, N: 0,21, Cu: 0,6, Ti: 0,001

enzymatique a été mesurée à partir de la solution originale avant l'injection dans le réacteur selon le protocole de la section III.2.1.

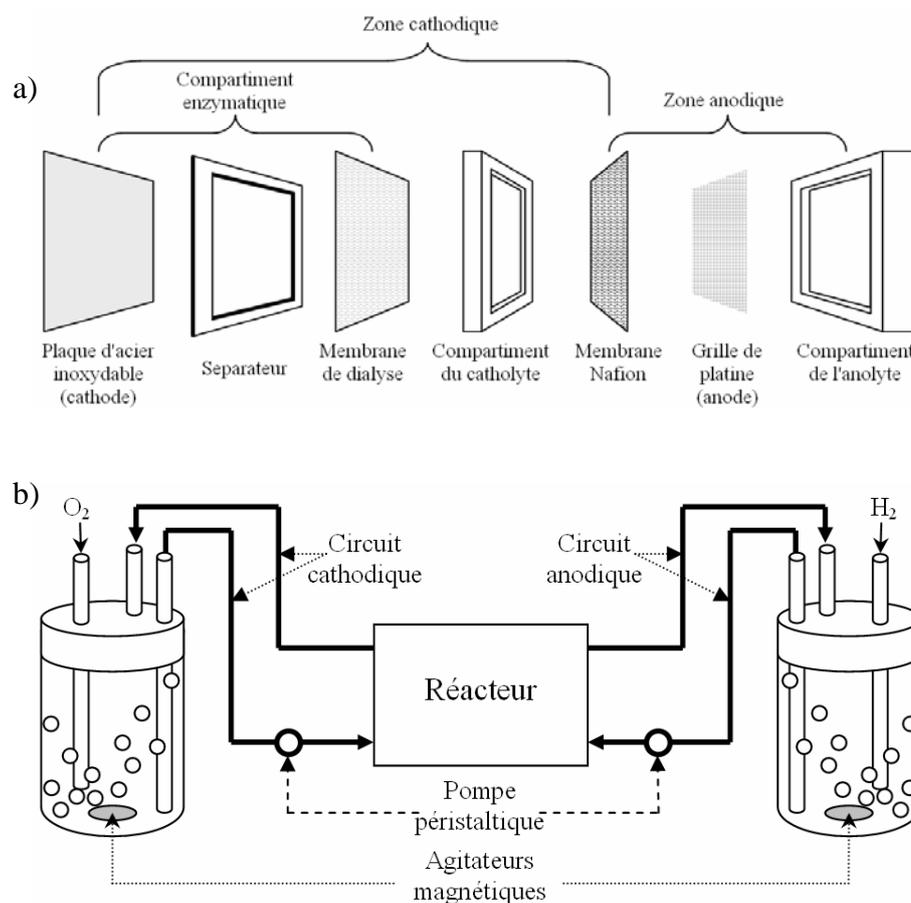


Figure III.23. Schémas des composants du réacteur utilisé (a) et du montage du système de circulation des électrolytes (b).

### III.2.2.2 Résultats

Pour étudier la pile en présence et absence de glucose et de glucose oxydase (GOD), les potentiels anodique, cathodique et de cellule ont été mesurés en faisant travailler la pile avec des résistances de différente valeur. Des études de Mott-Schottky ont été réalisées en parallèle pour étudier l'évolution des propriétés semi-conductrices de la cathode au cours du fonctionnement.

La pile fonctionnant avec une cathode d'acier inoxydable 316L a été capable de fournir une puissance maximale entre 4 et 13  $mW/m^2$  suivant les conditions expérimentales (fig. III.24). La première courbe de puissance a été réalisée en absence de glucose dans le catholyte. Après cette première mesure, du glucose a été introduit dans le circuit cathodique pour avoir une concentration de 0,05 M de glucose. La courbe de puissance en présence de glucose présente

### III. Les enzymes comme catalyseurs dans des piles à combustible.

des valeurs beaucoup moins élevées que celle obtenue en absence de glucose (fig. III.24). L'origine de cette chute est visible sur la figure III.25 où la modification des potentiels anodique et cathodique peut être constatée. Le potentiel anodique, après la première mesure, est déplacé d'environ 60 mV vers des potentiels moins négatifs et le potentiel cathodique de 50 mV vers des potentiels plus négatifs. Suite à l'obtention de la courbe de puissance en présence de glucose, la pile a débité à travers une résistance de 17,4 k $\Omega$ , qui correspond à la puissance maximale, pendant 1 heure. La puissance de la pile s'est stabilisée à 3,7 mW/m<sup>2</sup> (fig. III.26). L'introduction de 0,1 U/mL de glucose oxydase entre la membrane de dialyse et la cathode, a produit une augmentation de la puissance de la pile que l'on peut attribuer au déplacement de la courbe Intensité-Potentiel cathodique (fig. III.25). C'est l'effet catalytique qui est mis en évidence. Toutefois, cet effet reste faible; la courbe de puissance reste en dessous de celle réalisée en absence de glucose (fig. III.24). Après la réalisation de la courbe de puissance avec la GOD, la pile a travaillé, encore une fois, avec une résistance de 17,4 k $\Omega$  pendant 5 heures. La puissance de la pile s'est stabilisée à une valeur voisine de 5 mW/m<sup>2</sup> (fig. III.26). Une deuxième réalisation de la courbe de puissance en présence de GOD à la suite de ces 5 heures de fonctionnement à puissance constante a montré une petite chute des performances de la pile (fig. III.24) qui correspond à la stabilisation du système après l'injection de l'enzyme.

En résumé, les résultats montrent :

- le comportement de l'anode a évolué après une première utilisation. La courbe I-E anodique a été déplacée vers des potentiels moins négatifs probablement à cause d'un empoisonnement de la grille de platine par les ions phosphate présents dans l'anolyte.
- le glucose, apparemment, a un effet négatif sur le fonctionnement de la cathode. Une adsorption de la molécule sur la cathode aurait pu diminuer la réactivité de cette dernière.
- la glucose oxydase catalyse la réaction cathodique. Cette catalyse est relativement stable.

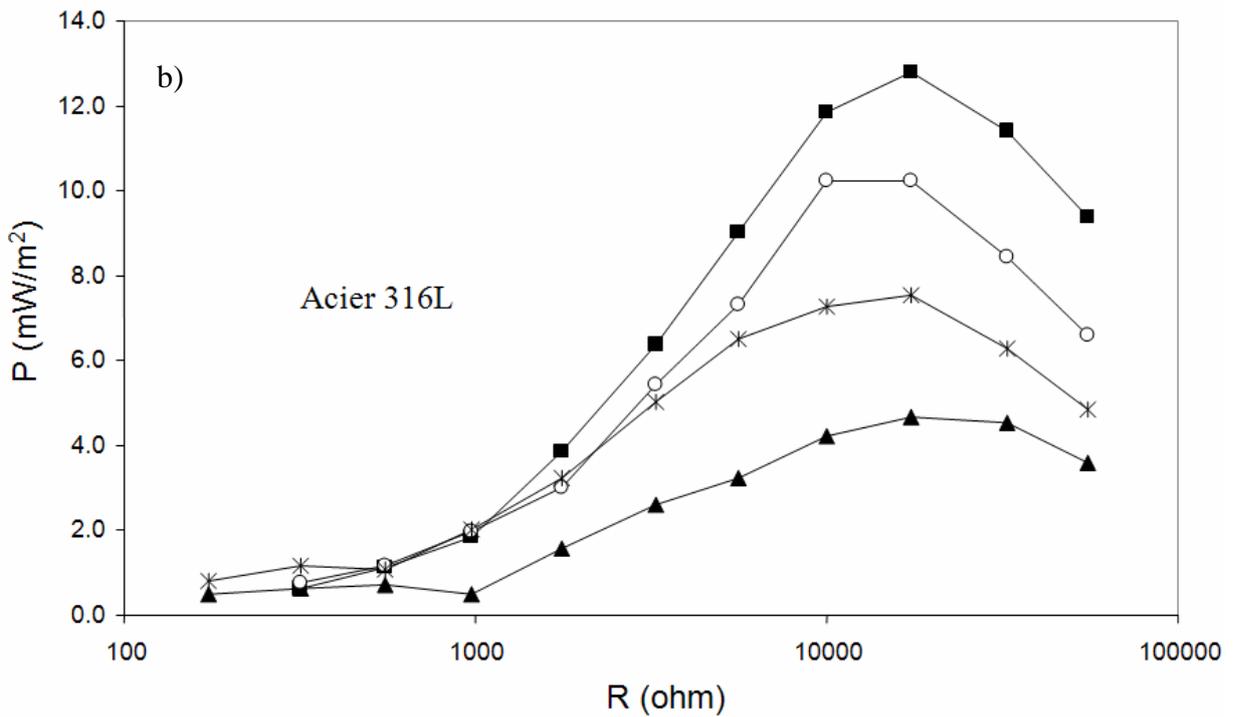
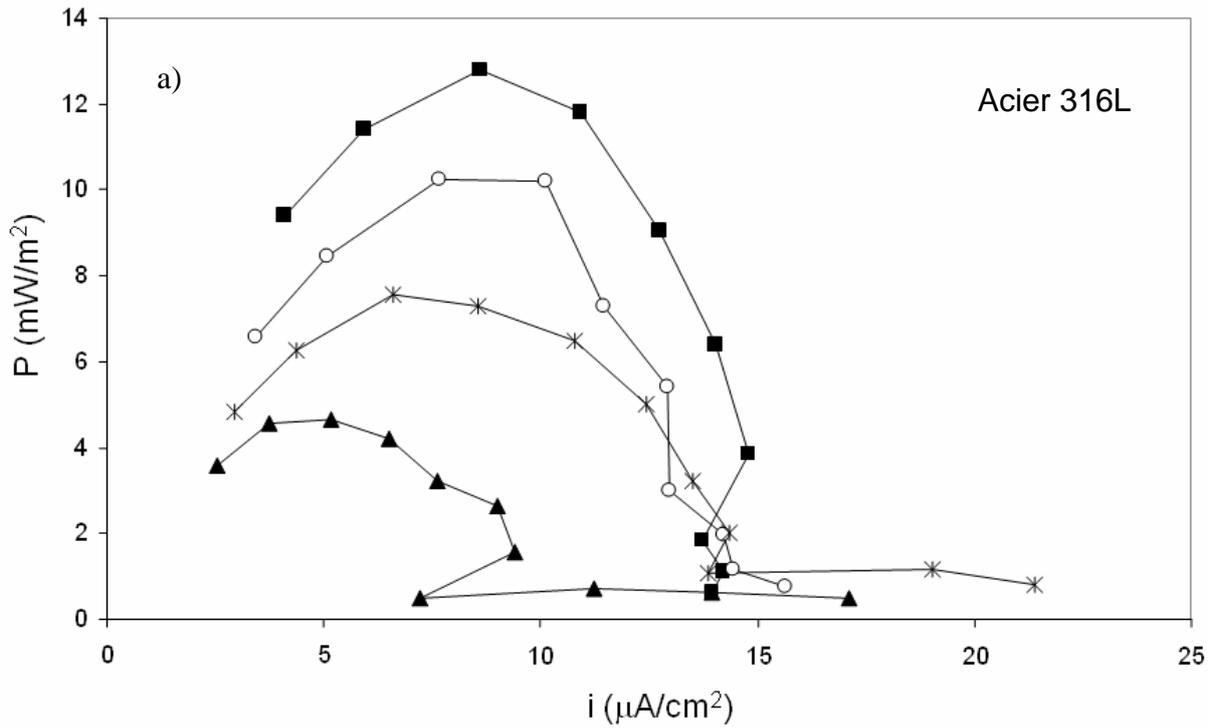


Figure III.24. Courbes de puissance en fonction du courant (a) et de la résistance (b) obtenues dans la pile avec une cathode d'acier 316L et différentes conditions : avant l'injection du glucose (■), avec glucose (▲), avec glucose en présence de 0,1 U/mL de glucose oxydase initiale (○) et après 5 heures de fonctionnement à puissance maximale ( $R=17360$  Ohm) (\*).

### III. Les enzymes comme catalyseurs dans des piles à combustible.

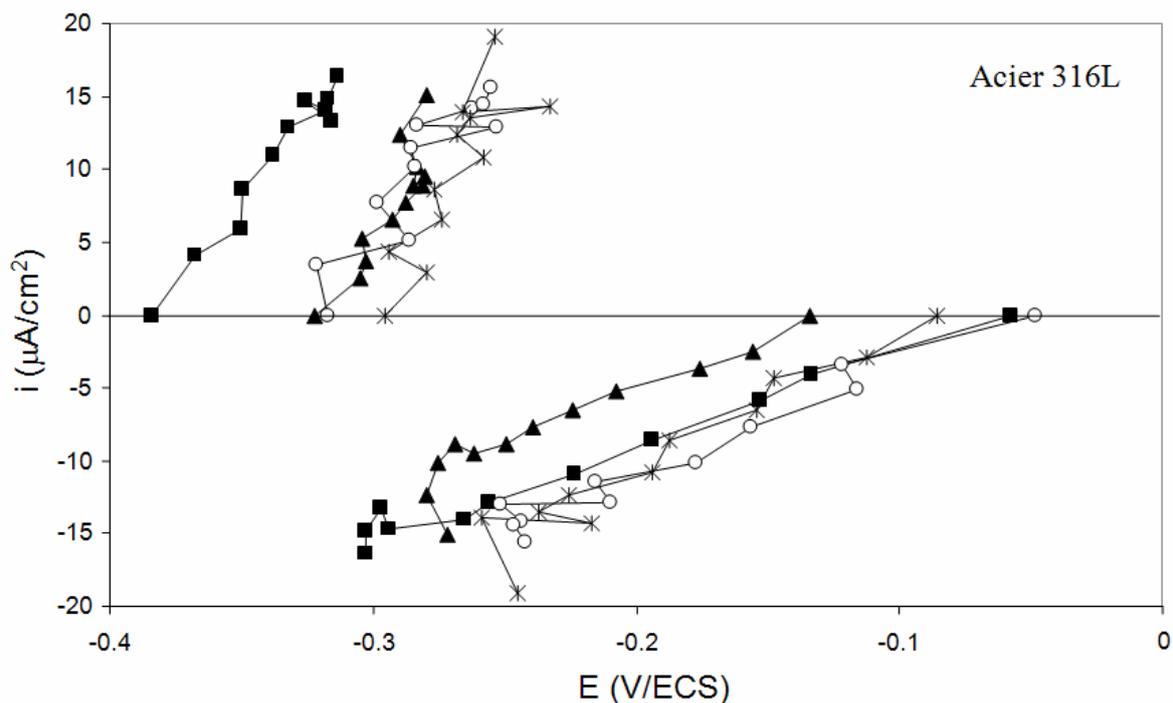


Figure III.25. Courbes Intensité-Potential obtenues dans la pile avec une cathode d'acier 316L et différentes conditions : avant l'injection du glucose (■), avec glucose (▲), avec glucose en présence de 0,1 U/mL de glucose oxydase initiale (○) et après 5 heures de fonctionnement à puissance maximale ( $R= 17360 \text{ Ohm}$ ) (\*).

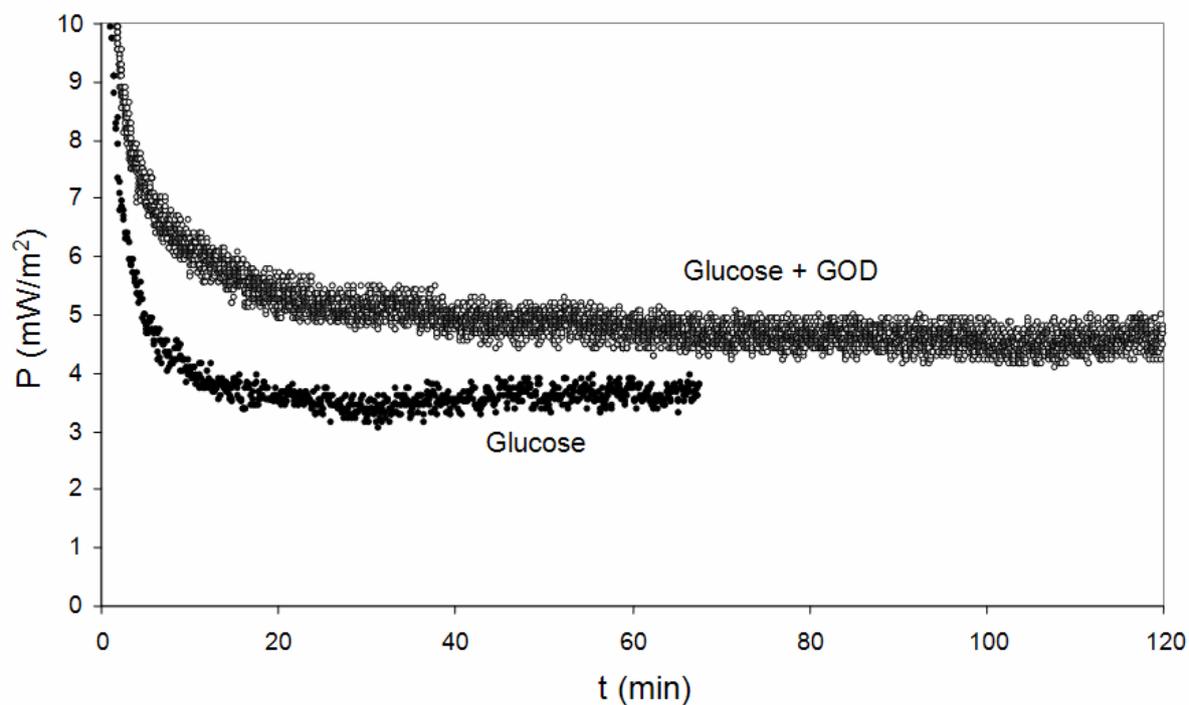


Figure III.26. Puissance de la pile en présence (0,1 U/mL) (○) et en absence (●) de glucose oxydase au cours du temps en travaillant avec une résistance de 17,4  $\text{k}\Omega$ .

Les diagrammes de Mott-Schottky réalisés à différents moments lors du fonctionnement de la pile aqueuse, n'ont pas montré de modification du comportement semi-conducteur de la cathode (fig. III.27). Cela indique que l'augmentation du courant cathodique en présence de la glucose oxydase n'est pas liée aux modifications des propriétés semi-conductrices de la cathode. Cette augmentation est sûrement due à la réduction du peroxyde d'hydrogène produit par l'enzyme comme cela a été expliqué dans la bibliographie (L'Hostis, Dagbert et al., 2003).

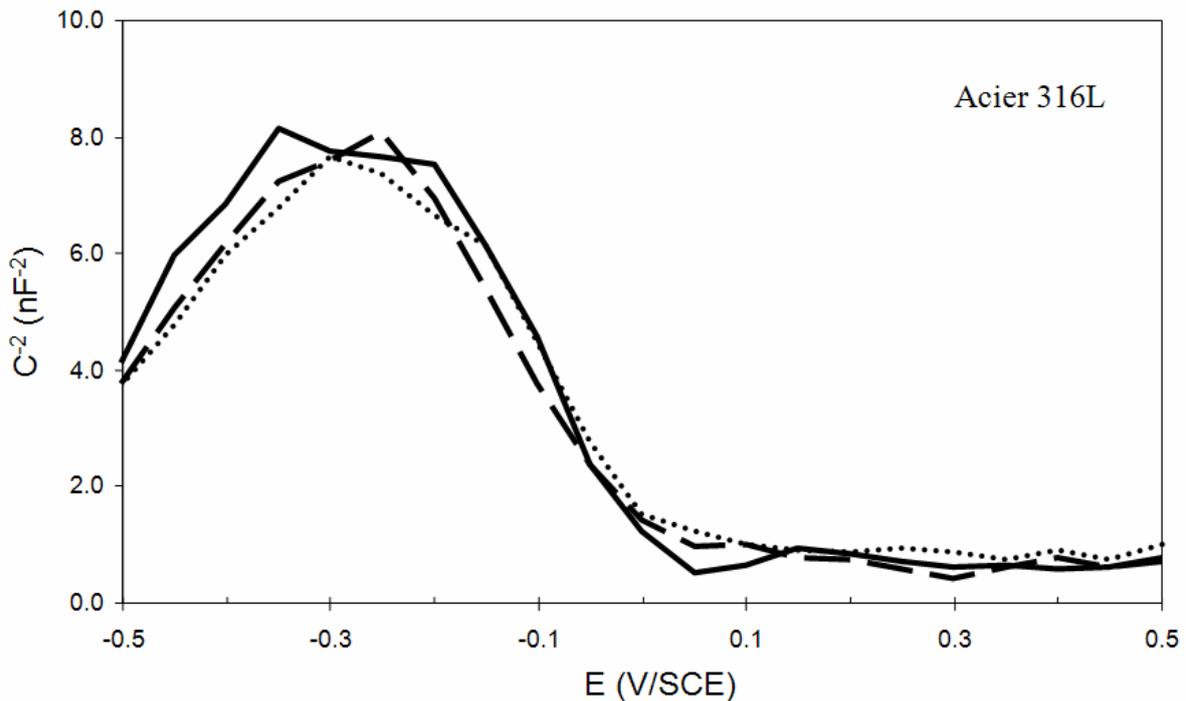


Figure III.27. Courbes de Mott-Schottky réalisées avec la cathode en acier 316L avant l'injection de la glucose oxydase (GOD 0,1 U/mL) dans la pile (—), après la construction de la courbe de puissance avec GOD (— —) et après 5 heures de fonctionnement de la pile à la puissance maximale ( $R = 17360 \text{ Ohm}$ ) (.....).

La pile fonctionnant avec une cathode d'acier grenailé (254 SMO) a été capable de fournir une puissance maximale entre 10 et 30  $\text{mW/m}^2$  (fig. III.28) soit à peu près deux fois plus que la cathode en acier 316L. Néanmoins le comportement de cette pile a été un peu plus difficile à interpréter. La première courbe a été réalisée en absence de glucose dans le catholyte. Sa puissance a atteint les 33  $\text{mW/m}^2$  et les courbes Intensité-Potentiel associées présentent des allures particulières avec un pic dont le maximum se situe à 31,7  $\mu\text{A/cm}^2$  et a été obtenu pour une résistance de  $R = 5,6 \text{ k}\Omega$  qui est plus faible que celle correspondant à la puissance maximale ( $R = 10 \text{ k}\Omega$ ). Suite à cette mesure et après avoir laissé stabiliser le potentiel libre de la pile, une deuxième mesure de la puissance a montré une diminution importante de celle-ci

### III. Les enzymes comme catalyseurs dans des piles à combustible.

( $P_{max} = 22 \text{ mW/m}^2$ ). Cette variation est liée au déplacement du potentiel anodique d'environ 90 mV vers des potentiels moins négatifs (fig. III.29). Après la réalisation de cette deuxième courbe, du glucose a été introduit dans le circuit cathodique de façon à avoir une concentration de 0.05 M. En présence du glucose, la puissance maximale a encore baissé essentiellement à cause d'un nouveau déplacement du potentiel anodique (fig. III.29). Les courbes Intensité-Potentiel associées à ces deux dernières mesures présentent aussi un pic d'intensité pour  $R < 5,6 \text{ k}\Omega$ . Après avoir laissé reposer la cellule une nuit, des courbes de puissance ont été tracées avant et après l'introduction de la glucose oxydase entre la cathode et la membrane de dialyse (fig. III.28). La puissance maximale de la pile en absence de GOD a atteint les  $32 \text{ mW/m}^2$ , ce qui est près de la puissance obtenue dans la première utilisation de la pile. Cette modification de la puissance n'est plus liée au potentiel anodique mais au potentiel cathodique qui a été déplacé de 250 mV vers des potentiels plus positifs. Ce grand déplacement du potentiel cathodique a compensé le décalage qui a eu lieu sur le potentiel anodique vers des valeurs moins négatives. Il faut cependant signaler que la cathode n'est pas capable de fournir de gros courants. L'introduction de GOD dans la pile n'a pas eu d'effet positif sur la puissance de la pile. Au contraire, la puissance maximale a diminuée ( $22 \text{ mW/m}^2$ ). Cette chute est liée au décalage des potentiels anodique et cathodique. Le décalage du potentiel anodique des deux dernières mesures par rapport à celles réalisées la veille, pourrait être causé par la pollution en continu de la grille de platine par le phosphate. Côté cathodique, il semblerait qu'il s'agisse d'une modification de l'état de la surface de la cathode qui soit à l'origine du déplacement vers des potentiels plus positifs, la présence d'enzyme n'ayant que très peu d'influence.

La modification des propriétés de la cathode au cours de la caractérisation de la pile donne d'une part, une augmentation de la réactivité de l'acier qui provoque le déplacement des courbes cathodiques vers des potentiels plus positifs, et d'autre part, une diminution de la surface active de l'électrode qui génère des densités de courant plus faibles. La réactivité élevée de l'électrode grenillée a pu induire la formation de peroxyde d'hydrogène lors de la réduction de l'oxygène, ce qui a pu générer une nouvelle augmentation de la réactivité. Les pics et les faibles courants sont le reflet de la diminution de la surface active, laquelle peut être causée par une forte réactivité de l'électrode. En effet, une électrode plus réactive aura une probabilité plus grande d'être polluée par l'adsorption des espèces telles que les phosphates et le glucose.

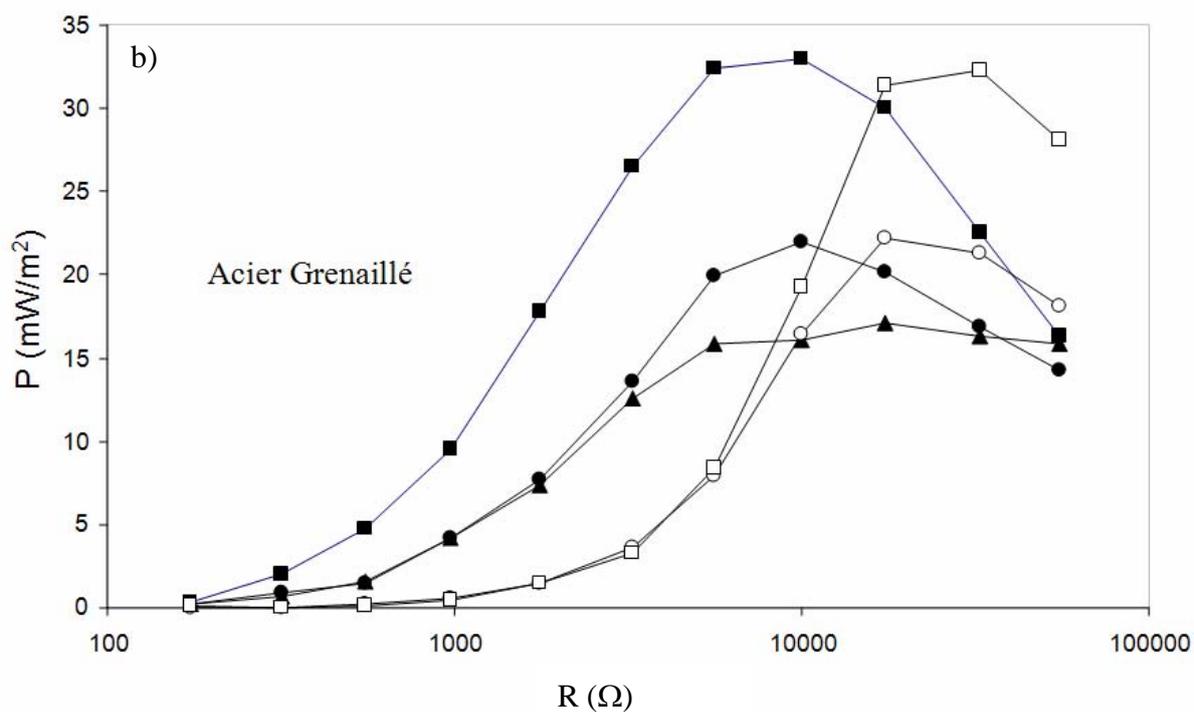
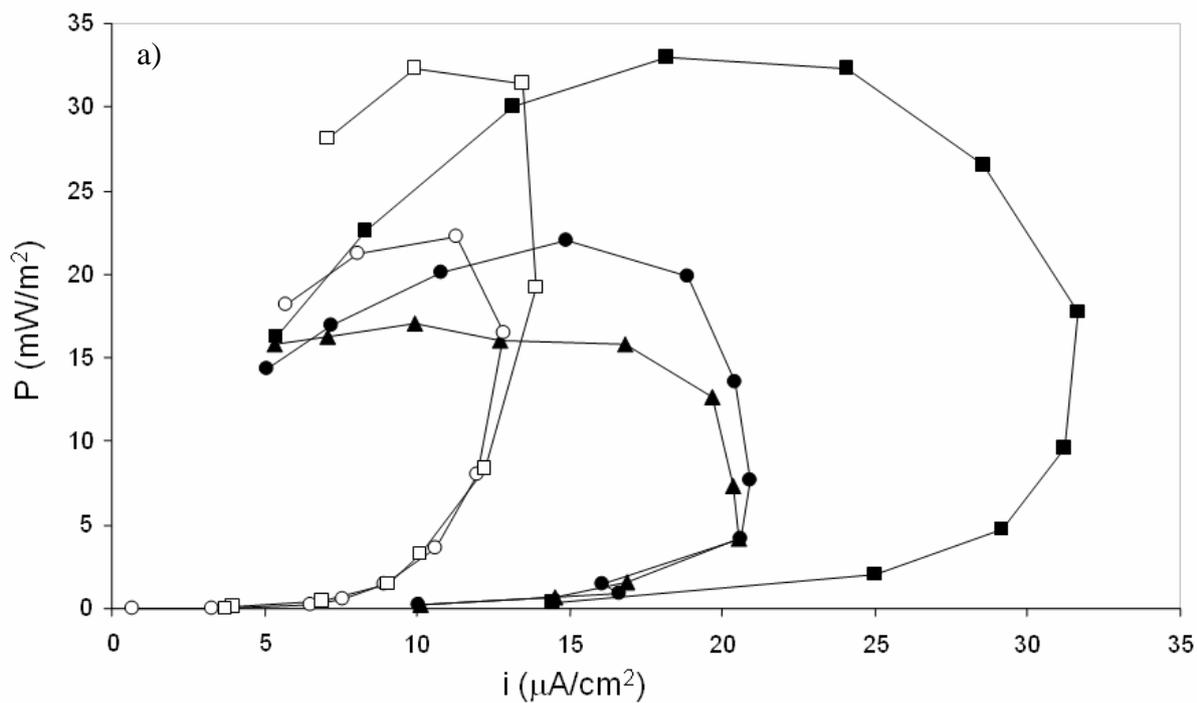


Figure III.28. Courbes de puissance en fonction du courant (a) et en fonction de la résistance (b) réalisées dans la pile avec une cathode en acier grenailé (254 SMO) avant l'injection de glucose dans la pile (—■—, première mesure) et (—●—, deuxième mesure), après l'injection de glucose (—▲—) et (—□—, le lendemain), et après l'injection de la glucose oxydase (—○—).

### III. Les enzymes comme catalyseurs dans des piles à combustible.

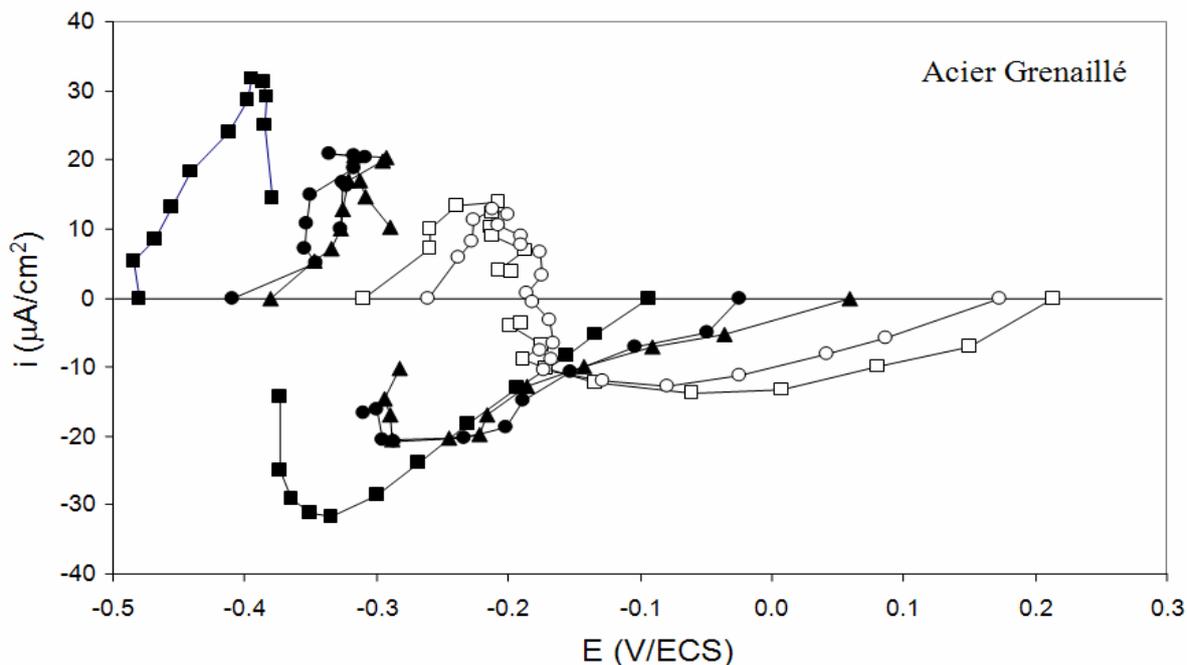


Figure III.29. Courbes Intensité-Potentiel réalisées dans la pile avec une cathode en acier grenailé (254 SMO) avant l'injection du glucose dans la pile (—■—, première mesure) et (—●—, deuxième mesure), après l'injection du glucose (—▲—) et (—□—, le lendemain), et après l'injection de la glucose oxydase (—○—).

Les courbes de Mott-Schottky réalisées pendant l'utilisation de la pile avec l'acier grenailé, montrent un comportement d'un semi-conducteur type p. Les premiers essais en présence et absence de glucose n'ont pas montré une évolution des courbes (fig. III.30), mais les expériences faites le lendemain révèlent une évolution au cours de l'utilisation de la pile (fig. III.31) avec une diminution du maximum de la courbe  $C^{-2} - E$  et un déplacement en potentiel par rapport aux valeurs de la figure III.30 (de -0,3 V/ECS à -0,4 V/ECS).

Les courbes de Mott-Schottky effectuées sur les deux aciers utilisés ont une forme correspondant à des semi-conducteurs type p. Cela signifie que les porteurs de charge des électrodes étaient majoritairement des accepteurs d'électrons. Cela signifie que l'état de la surface de l'électrode n'était pas optimal pour son utilisation comme cathode.

L'évolution des courbes de Mott-Schottky effectuées sur l'acier grenailé confirme que l'état de surface de la cathode est modifié au cours de l'utilisation de la pile. Les porteurs de charge étaient majoritairement des accepteurs d'électrons. Une diminution de la pente de la courbe  $C^{-2} - E$  de la cathode signifie un nombre de porteurs de charge plus grand et que le

comportement de la cathode devient de plus en plus celui d'un conducteur. Elle devient donc, une meilleure cathode.

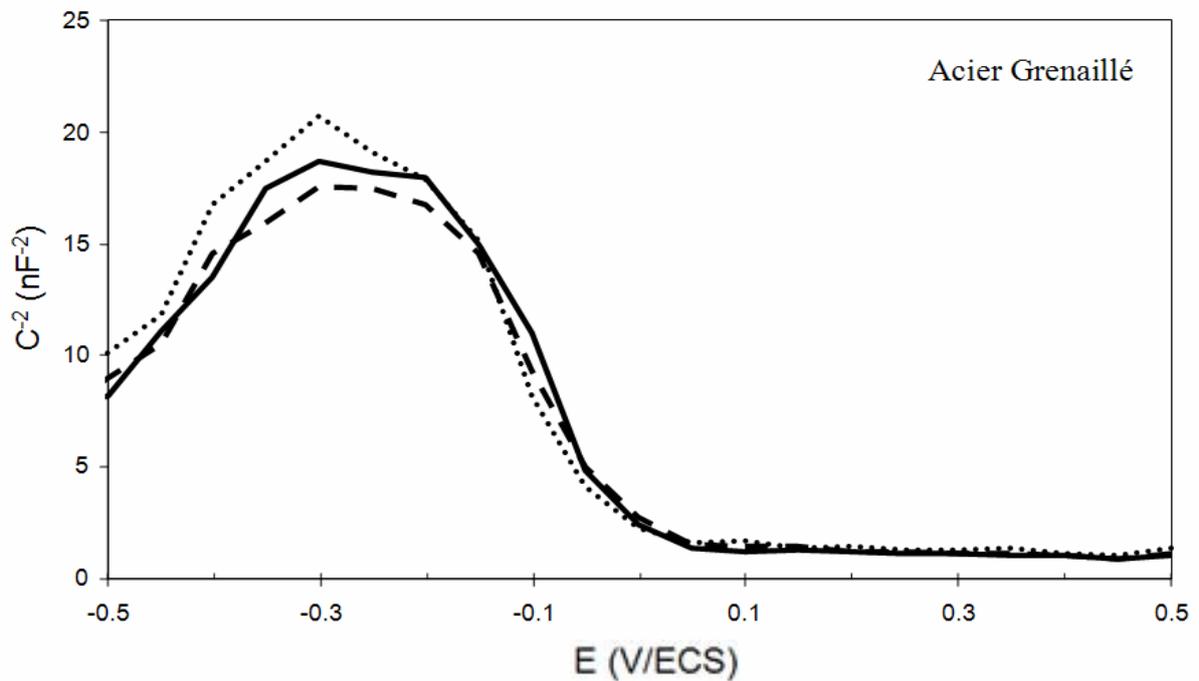


Figure III.30. Courbes de Mott-Schottky réalisés avec la cathode en acier grenailé (254 SMO) après la caractérisation de la pile sans glucose (—) et après la première (— —) et deuxième (.....) caractérisation en présence du glucose.

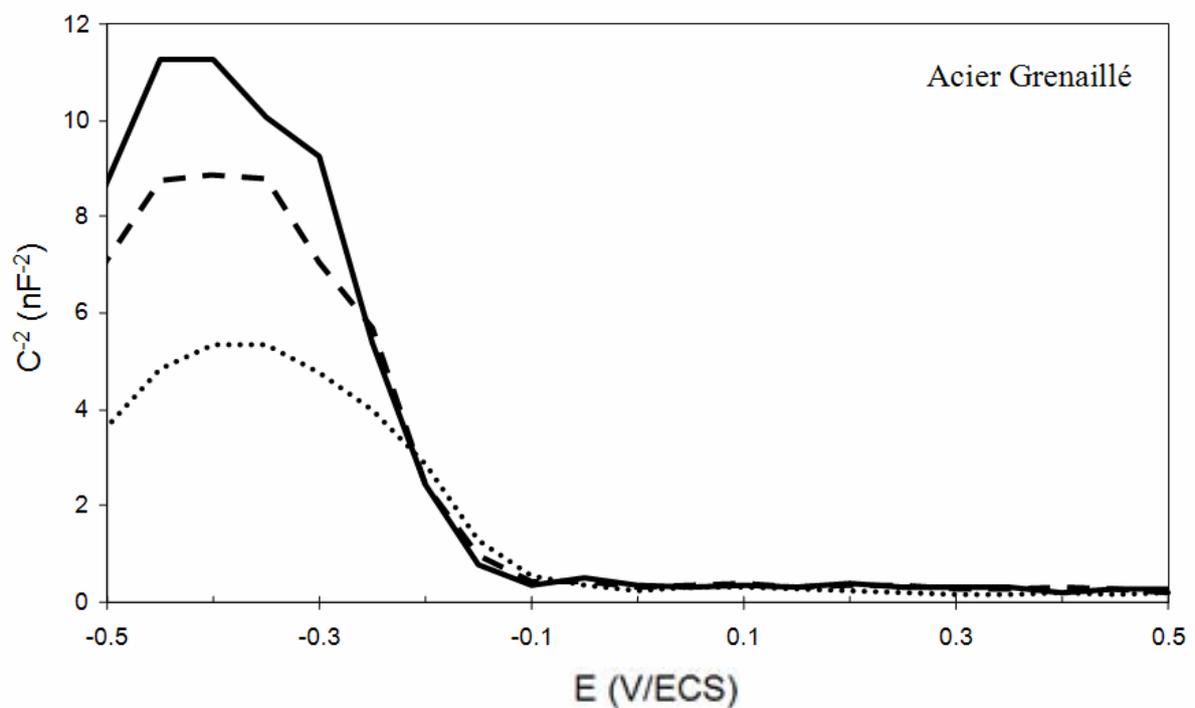


Figure III.31. Courbes de Mott-Schottky réalisés avec la cathode en acier grenailé (254 SMO) le lendemain des premières essais avant une nouvelle caractérisation de la pile avec glucose (—), après cette caractérisation de la pile avec glucose (— —) et après la caractérisation de la pile en présence du glucose oxydase (.....).

### **III.3. Conclusion**

L'étude sur les couples enzyme/électrode a montré que toutes les électrodes (à base de carbone, en acier inoxydable et en titane) présentent une meilleure réponse électrochimique en présence d'enzyme ou d'hémine. Les électrodes à base de carbone, modifiées avec l'hémine, ont montré des comportements électrochimiques qui approchent beaucoup celui du platine massif. Les effets catalytiques sur les autres électrodes sont certes présents mais ils apparaissent soit pour de grandes surtensions soit avec des faibles courants; ces comportements ne sont pas idéaux pour une utilisation dans des piles à combustible mais ils pourraient être suffisamment bons pour des biocapteurs ou des microsystèmes. La technique de confinement utilisée peut donner des pistes sur de nouveaux systèmes matériau/catalyseur car c'est une méthode simple et rapide. Mais des approfondissements et des ajustements sont souvent nécessaires pour prendre en compte la complexité des interactions enzymes/matériaux.

L'utilisation du système glucose oxydase/glucose dans une pile à combustible aqueuse dont la cathode est en acier inoxydable permet d'améliorer les performances de la pile grâce à la production du peroxyde d'hydrogène qui est très facile à réduire. Par ailleurs, la présence de ce peroxyde d'hydrogène peut modifier l'état de surface de l'électrode d'acier en la rendant plus réactive. Entre autre, l'utilisation de matériaux avec des microstructures, comme les aciers grenailés, mériterait d'être approfondie pour exploiter la remarquable réactivité qu'ils présentent par rapport aux électrodes lisses.



## **Conclusion générale et perspectives**



## Conclusion générale

Dans ce travail, la possible participation de mécanismes catalytiques induits par les acides faibles dans la biocorrosion anaérobie a été étudiée. Les résultats ont montré que les acides faibles et les acides aminés pourraient avoir un rôle majeur sur la biocorrosion des aciers. Ces composés catalysent la réduction de l'eau via un mécanisme réversible qui pourrait occasionner une accélération supplémentaire de la corrosion lors de la consommation de l'hydrogène produit par les réactions de réduction.

Egalement, les potentialités de l'utilisation des acides faibles comme catalyseurs de la réduction de l'eau pour produire de l'hydrogène ont été démontrées. Une telle utilisation des acides faibles permet de produire de l'hydrogène avec des matériaux moins nobles, et donc moins chers, tel que l'acier inoxydable dans des conditions de pH moins agressives que celles rencontrées lors de l'électrolyse en milieu acide ou alcalin.

Un autre objectif de la thèse a été d'exploiter les phénomènes catalytiques mis en évidence dans les recherches en biocorrosion pour concevoir des électrodes modifiées avec des enzymes pour les intégrer dans des piles à combustible. Des études sur différents couples enzyme/électrode ont montré que, tant pour des électrodes à base de carbone que pour celles en acier inoxydable et titane, une meilleure réponse électrochimique peut être obtenue grâce à la catalyse par des enzymes ou l'hémine. Les électrodes à base de carbone modifiées avec l'hémine ont montré des comportements électrochimiques qui approchent beaucoup celui du platine massif. Les autres électrodes montrent des effets catalytiques soit à des surtensions élevées, soit avec des faibles courants ; comportements qui ne sont pas idéaux pour une utilisation dans des piles à combustibles mais qui pourraient être suffisamment bons pour les appliquer dans des biocapteurs et des microsystèmes. L'utilisation d'une membrane pour confiner les enzymes près de l'électrode est une technique simple et rapide pour donner des pistes sur des nouveaux systèmes matériau/catalyseur et être utilisée de manière systématique. Cependant il paraît utile d'approfondir plus les travaux sur les interactions matériaux/enzyme car, d'une manière générale, ce sont des systèmes assez complexes.

Enfin, une étude sur l'influence du système glucose oxydase/glucose sur des cathodes en acier inoxydable dans une pile aqueuse a été aussi réalisée. Les résultats ont montré qu'effectivement la présence de la glucose oxydase peut améliorer la puissance de la pile grâce à la production de peroxyde d'hydrogène lors de la transformation enzymatique du glucose et de l'oxygène. En effet, la présence du peroxyde d'hydrogène peut modifier l'état de

surface de l'électrode d'acier en la rendant plus réactive, ou peut faire augmenter le courant grâce à la réduction de ce peroxyde d'hydrogène. L'étude a également permis de mettre en évidence que les aciers avec des microstructures peuvent présenter une meilleure réactivité que les électrodes lisses. L'acier inoxydable grenailé présente un comportement électrochimique qui évolue facilement selon les conditions opératoires. Son utilisation en tant que cathode dans une pile à combustible reste intéressante mais requiert encore beaucoup de travaux de recherche.

## Perspectives et recommandations

- Des études sur l'influence des acides faibles sur le potentiel d'abandon et sur la résistance de polarisation des aciers, avec un protocole de prétraitement des électrodes plus rigoureux et avec des conditions hydrodynamiques contrôlées (électrode tournante), pourraient être effectuées pour approfondir la compréhension des mécanismes liés au rôle des acides faibles dans la biocorrosion des aciers. Dans une telle étude, l'influence de la présence de l'hydrogène sur le comportement électrochimique du système pourrait être également réexaminée.
- Des expériences de production d'hydrogène pourraient être effectuées en utilisant d'autres acides faibles que les phosphates pour catalyser les réactions cathodiques. Des acides miscibles à l'eau tel que l'acide lactique ( $pK_a = 3,85$ , intéressant pour travailler à pH 3) peuvent être utilisés à de fortes concentrations, ce qui permettrait une augmentation de la vitesse de la réaction de réduction et donc de la production d'hydrogène. Egalement, l'utilisation des anodes en DSA<sup>®</sup> en lieu du platine pourrait améliorer les performances du côté anodique qui, dans ce travail, ont été affectées par la pollution de l'anode par les phosphates.
- L'utilisation des aciers avec des surfaces microstructurées, tel que l'acier grenailé utilisé dans ce travail, en tant que cathodes dans des expériences de production d'hydrogène pourrait être un sujet de recherche intéressant.
- Continuer les essais de couplage des enzymes avec des matériaux industriels promet de donner des alternatives intéressantes pour des électrodes dans des piles à combustible. Encore une fois, l'utilisation des aciers grenailés est recommandée.

## Références bibliographiques

- "Dissociation Constants of Inorganic Species", in CRC Handbook of Chemistry and Physics, Internet Version 2007, (87th Edition), David R. Lide, ed., Taylor and Francis, Boca Raton, FL.
- Albery, W. J. (1975). Electrode Kinetics. Oxford, Clarendon Press.
- Angell, P. and K. Urbanic, Corrosion Science 42 (2000) 897
- Armstrong, F. A. and G. S. Wilson, Electrochimica Acta 45 (2000) 2623
- BASSEGUY, R., J. IDRAC, C. JACQUES, A. BERGEL, M.-L. DELIA and L. - ETCHEVERRY (2007). Local analysis by SVET of the involvement of biological systems in aerobic biocorrosion. Local probe techniques for corrosion research. R. Oltra, V. Maurice, R. Akid and P. Marcus, Woodhead Publishing Limited CRC Press LLC.
- Beech, I. B. and J. Sunner, Current Opinion in Biotechnology 15 (2004) 181
- Beech, I. B., International Biodeterioration and Biodegradation 35 (1995) 59
- Belay, N., L. Daniels, Antonie van Leeuwenhoek 57 (1990) 1
- Berezin, I. V., V. A. Bogdanovskaya, S. D. Varfolomeev, M. R. Tarasevich and A. I. Yaropolov, Dokl. Akad. Nauk SSSR 225 (1978) 105
- Bergel, A., D. Feron and A. Mollica, Electrochem. Commun. 7 (2005) 900
- Bogdanovskaya, V. A., E. F. Gavrilova and M. R. Tarasevich, Elektrokimiya 22 (1986) 105
- Brennenstuhl, A. M., Gendron, T.S., Cleland, R. Corrosion Science 35, (1993) 699
- Bruijn, F. d., Green Chemistry 7 (2005) 132
- Brunel, L., J. Denele, K. Servat, K. B. Kokoh, C. Jolival, C. Innocent, M. Cretin, M. Rolland and S. Tingry, Electrochemistry Communications 9 (2007) 331
- Bryant, R. and E. Laishley, Applied Microbiology and Biotechnology 38 (1993) 824
- Bullen, R. A., T. C. Arnot, J. B. Lakeman and F. C. Walsh, Biosensors and Bioelectronics 21 (2006) 2015
- Canhoto, C. M. Matos, A. Rodrigues, M.D. Geraldo, M.F. Bento, Journal of Electroanalytical Chemistry 570 (2004) 63
- Chan, K. Y., L. C. Xu, H. H. P. Fang, Environmental Science & Technology 36, (2002) 1720
- Chen, E. (2003). Thermodynamics and Electrochemical Kinetics. Fuel Cell Technology Handbook. G. Hoogers. Boca Raton, CRC Press.
- Chen, G., C. R. Clayton, Journal of Electrochemical Society 145, (1998) 1914

- Ciszkowska, M., Z. Stojck, S. E. Morris, J. G. Osteryoung, *Analytical Chemistry* 64 (1992) 2372
- Crolet, J. L. and M. Magot, *Materials Performance* 35 (1996) 60
- Crolet, J. L., *Matériaux et Techniques, Spécial Biocorrosion* (1990) 9
- Da Silva, S., R. Basséguy, A. Bergel., *Electrochimica Acta* 49 (2004) 4553.
- Da Silva, S., R. Basséguy, A. Bergel, *Electrochimica Acta* 49 (2004) 2097
- Da Silva, S., R. Basseguy, A. Bergel, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 561 (2004) 93
- Damien, A. (1992). Hydrogène par électrolyse de l'eau (J 6 366). *Techniques de l'Ingenieur, traité Génie des Procédés*.
- Daniele, S., C. Bragato, M. A. Baldo *Electrochimica Acta* 52 (2006) 54
- Daniele, S., C. Bragato, M. A. Baldo, G. Mori, M. Giannetto, *Analytica Chimica Acta* 432 (2001) 27
- Daniele, S., I. Lavagnini, M. A. Baldo, F. Magno, *Analytical Chemistry*, 70 (1998) 285
- Daniele, S., I. Lavagnini, M. A. Baldo, F. Magno, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 404 (1996) 105
- Daniele, S., M. A. Baldo, F. Simonetto, *Analytica Chimica Acta* 331 (1996) 117
- Davis, F., S. P. J. Higson, *Biosensors and Bioelectronics* 22 (2007) 1224
- Du, Z., H. Li and T. Gu, *Biotechnology Advances* 25 (2007) 464
- Farneth, W. E. and M. B. D'Amore, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 581 (2005) 197
- Fonseca, I. T. E., M. J. Feio, A. R. Lino, M. A. Reis and V. L. Rainha, *Electrochimica Acta* 43 (1998) 213
- Gao, Y. and J. Chen, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 583 (2005) 286
- Ghangrekar, M. M. and V. B. Shinde, *Bioresource Technology* 98 (2007) 2879
- Gianfreda, L., F. Xu and J.-M. Bollag, *Bioremediat. J.* 3 (1999) 1
- Gilardi, G., A. Fantuzzi and S. J. Sadeghi, *Current Opinion in Structural Biology* 11 (2001) 491
- Hamilton, W. A., W. Lee (1995). *Biocorrosion. Sulfate Reducing Bacteria*. L. L. Barton. New York, Plenum Press: 243–264.
- Hamilton, W.A. *Biofouling*, 19 (2003) (1) 65
- Harms,Hauke, Hans-Peter Volkland, Gernot Repphun, Andreas Hiltolt, Oskar Wanner and Alexander J. B. Zehnder *Corrosion Science* 45 (2003) 1717
- He, Z. and L. T. Angenent, *Electroanalysis* 18 (2006) 2009

- Heitz, E., H.-C. Flemming and W. Sand (1996). Microbially Influenced Corrosion of Materials. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag.
- Hernandez Gayosso, M. J., G. Zavala Olivares, N. Ruiz Ordaz, C. Juarez Ramirez, R. Garcia Esquivel and A. Padilla Viveros, *Electrochimica Acta* 49 (2004) 4295
- Heyrovsky, J. and J. Kuta (1966). Principles of Polarography. New York, Academic Press.
- Hoogers, G. (2003). Introduction. Fuel Cell Technology Handbook. G. Hoogers. Boca Raton, CRC Press.
- Hoogers, G. (2003). Outlook: The Next Five Years. Fuel Cell Technology Handbook. G. Hoogers. Boca Raton, CRC Press.
- Iverson, W. P., *Nature* 217 (1968) 1265
- Ivnitski, D., B. Branch, P. Atanassov and C. Apblett, *Electrochemistry Communications* 8 (2006) 1204
- Johnson, D. L., S. Norman, R. C. Tuckey and L. L. Martin, *Bioelectrochemistry* 29 (2003) 41
- Karyakin, A. A., S. V. Morozov, E. E. Karyakina, S. D. Varfolomeyev, N. A. Zorin and S. Cosnier, *Electrochemistry Communications* 4 (2002) 417
- Katz, E. and I. Willner, *J. AM. CHEM. SOC.* 125 (2003) 6803
- Katz, E., A. N. Shipway and I. Willner (2003). Biochemical fuel cells. Handbook of Fuel Cells – Fundamentals, Technology and Applications. W. Vielstich, H. A. Gasteiger and A. Lamm, John Wiley & Sons. 1.
- Kibria, M. F., M. S. Mridha and A. H. Khan, *International Journal of Hydrogen Energy* 20 (1995) 435
- King, R. A. and J. D. A. Miller, *British Corrosion Journal* 8 (1973) 137
- King, R. A. and J. D. A. Miller, *Nature* 233 (1971) 491
- Kothari, R., D. Buddhi and R. L. Sawhney, *Renewable and Sustainable Energy Reviews* In Press, Corrected Proof (2006)
- Krishna, S. H., *Biotechnology Advances* 20 (2002) 239
- Kühn, C. A. H. V. W. and S. V. D. Vlugt, *Water* 18 (1934) 147
- Kuznetsov, B. A., G. P. Shumakovich, O. V. Koroleva and A. I. Yaropolov, *Biosensors & Bioelectronics* 16 (2001) 73
- L'Hostis, V. (2002). Rôle enzymatique d'un biofilm sur la corrosion d'aciers inoxydables immergés en eau de mer naturelle., Université Paris 6.
- L'Hostis, V., C. Dagbert and D. Féron, *Electrochimica Acta* 48 (2003) 1451
- Lee, W. Z., Lewandowski, S. Okabe, W. G. Characklis, R. Avci, *Biofouling* 7 (1993a) 197

- Lee, W. Z., Lewandowski, M. Morrison, W. G. Characklis, R. Avci, P. H. Nielsen, *Biofouling* 7 (1993b) 217
- Lee, W., Z., Lewandowski, P.H. Nielsen, W.A. Hamilton, *Biofouling* 8, (1995) 165
- Liu, H., L. Zhang, J. Zhang, D. Ghosha, J. Jung, B. W. Downing and E. Whittemore, *Journal of Power Sources* 161 (2006) 743
- Marinovic, V. and A. R. Despic, *Electrochimica Acta* 44 (1999) 4073
- Marinovic, V. and A. R. Despic, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 431 (1997) 127
- McLeod, E. S. Z. Dawood, R. Mac Donald, M. C. Oosthuizen, J. Graf, P. L. Steyn, V. S. Brozel, *Systematic and Applied Microbiology* 21, (1998) 297
- Molina, A. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 583 (2005) 193
- Nedoluzhko, A. I., I. A. Shumilin, L. E. Mazhorova, V. O. Popov and V. V. Nikandrov, *Bioelectrochemistry* 53 (2000) 61
- Nielsen, P. H., W. Lee, Z. Lewandowski, M. Morrison, W.G. Characklis, *Biofouling* 7 (1993) 267
- O'Neil, P., F. Busi, V. Concialini, O. Tubertini, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 284 (1990) 59
- Pankhania, I. P., *Biofouling* 1 (1988) 27
- Piontek, K., M. Antorini and T. Choinowski, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 37663
- Podesta, J. J., R. C. V. Piatti and A. J. Arvia, *International Journal of Hydrogen Energy* 20 (1995) 111
- Rajagopal, B. and J. LeGall, *Applied Microbiology and Biotechnology* 31 (1989) 406
- Ramanavicius, A., A. Kausaite and A. Ramanaviciene, *Biosensors and Bioelectronics* 20 (2005) 1962
- Rao, T. S., T. N. Sairam, B. Viswanathan and K. V. K. Nair, *Corrosion Science* 42 (2000) 1417
- Reinhammar, B. R. M., *Biochim. Biophys. Acta* 275 (1972) 245
- Sand, W. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 40 (1997) 183
- Santana Rodriguez, J. J., F. J. Santana Hernandez and J. E. Gonzalez Gonzalez, *Corrosion Science* 48 (2006) 1265
- Scheller, F. W., U. Wollenberger, A. Warsinke and F. Lisdar, *Current Opinion in Biotechnology* 12 (2001) 35
- Shleeva, S., A. Jarosz-Wilkolazka, A. Khalunina, O. Morozova, A. Yaropolov, T. Ruzgas and L. Gorton, *Bioelectrochemistry* 67 (2005) 115
- Smutok, O., B. Ngounou, H. Pavlishko, G. Gayda, M. Gonchar and W. Schuhmann, *Sensors and Actuators B* 113 (2006) 590

- Solomon, E. I., U. M. Sundaram and T. E. Machonkin, *Chem. Rev.* 96 (1996) 2563
- Solomon, E. I., U. M. Sundaram and T. E. Machonkin, *Chem. Rev.* 96 (1996) 2577
- Stojek, Z., Clszkowskat, M., Osteryoung, J. G., *Analytical Chemistry* 66 (1994) 1507
- Stone, R. (2003). *Competing Technologies for Transportation. Fuel Cell Technology Handbook*. G. Hoogers. Boca Raton, CRC Press.
- Takehara, K., Y. Ide, T. Nakatazato and N. Yora. *Journal of electroanalytical chemistry* 293 (1990) 285
- Tarasevich, M. R., V. A. Bogdanovskaya and A. V. Kapustin, *Electrochemistry Communications* 5 (2003) 491
- Tarasevich, M. R., V. A. Bogdanovskaya and L. N. Kuznetsova, *Russian Journal of Electrochemistry* 37 (2001) 833
- Videla, H. A., *Corrosion Science* 9 (1988) 585
- Von Wolzogen Kühr, C. A. H., S. Van Der Vlugt, *Water* 18, (1934) 147
- Wang, G., N. M. Thai and S.-T. Yau, *Electrochemistry Communications* 8 (2006) 987
- Wohlfahrt, G., S. Witt, J. Hendle, D. Schomburg, H. M. Kalisz and H.-J. Hecht, *Acta Crystallographica D* 55 (1999) 969
- Wong, T. S. and U. Schwaneberg, *Current Opinion in Biotechnology* 14 (2003) 590
- Woodward, J., K. A. Cordray, R. J. Edmonston, M. Blanco-Rivera, S. M. Mattingly and B. R. Evans, *Energy & Fuels* 14 (2000) 197
- Yang, Q., J.L. Luo, *Thin Solid Films* 371 (2000) 132
- Yaropolov, A. I., A. N. Kharybin, J. Emnéus, G. Marko-Varga and L. Gorton, *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 40 (1996) 49
- Yaropolov, A. I., O. V. Skorobogat'ko, S. S. Vartanov and S. D. Varfolomeyev, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 49 (1994) 257
- Yashiro, H., B. Pound, N. Kumagai, K. Tanno, *Corrosion Science*, 40 (1998) 781
- Ye, J.-S., Y. Wen, W. D. Zhang, H.-F. Cui, L. M. Gan, G. Q. Xu and F.-S. Sheu, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 562 (2004) 241
- Yu, J.G., J.L. Luo, P.R. Norton, *Electrochimica Acta* 47 (2002) 1527
- Yu, J.G., J.L. Luo, P.R. Norton, *Electrochimica Acta* 47 (2002) 401
- Zhao, S., K. Zhang, Y. Bai, W. Yang and C. Sun, *Bioelectrochemistry* () 69 (2006) 158
- ZHENG, N., Y. ZENG, P. G. OSBORNE, Y. LI, W. CHANG and Z. WANG, *Journal of Applied Electrochemistry* 32 (2002) 129

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE TOULOUSE

Mécanique Energétique Génie Civil et Procédés

DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE TOULOUSE

spécialité: Génie des Procédés et de l'Environnement.

05/12/2007

Leonardo DE SILVA MUÑOZ

**Des aspects positifs issus des recherches en biocorrosion : de la production d'hydrogène aux biopiles à combustible.**

**Résumé**

La corrosion induite par des microorganismes ou biocorrosion est un problème qui génère de lourdes pertes économiques mondiales (plusieurs milliards d'euros par an). Malgré de nombreux progrès dans la compréhension des mécanismes, la complexité du phénomène a empêché de trouver des solutions définitives au problème et inspire encore beaucoup de travaux de recherche. La participation dans le phénomène de biocorrosion de mécanismes catalytiques induits par les acides faibles a été étudiée dans ce travail. Un autre objectif de la thèse a été d'exploiter les phénomènes catalytiques mis en évidence dans les recherches en biocorrosion pour réaliser d'autres applications : production d'énergie dans des biopiles à combustible ou production d'hydrogène par voie électrochimique dans des conditions douces.

Les travaux ont montré que la présence des acides faibles et des acides aminés dans des biofilms pourrait jouer un rôle important dans la biocorrosion des aciers en accélérant le phénomène par la catalyse de la réduction de l'eau. La réversibilité de ce mécanisme, pressentie et prouvée, pourrait expliquer l'augmentation de la corrosion lorsque l'hydrogène produit est évacué (consommation, agitation, ...). Par ailleurs, les phosphates permettent la production d'hydrogène par électrolyse dans des conditions douces de pH (pH 4,0 - 8,0) avec une performance égale ou meilleure que celle de l'électrolyse alcaline. Enfin, les matériaux industriels, tels que l'acier et le titane, pourraient être utilisés pour la fabrication d'électrodes enzymatiques en vue d'une utilisation dans des biocapteurs ou des microsystèmes. L'utilisation du système glucose oxydase/glucose dans une pile à combustible aqueuse dont la cathode est en acier inoxydable, permet d'améliorer les performances de la pile grâce à la production du peroxyde d'hydrogène qui est très facile à réduire. En outre, l'utilisation de matériaux avec des microstructures comme les aciers grenailés mériteraient d'être approfondie pour exploiter la remarquable réactivité qu'ils présentent par rapport aux électrodes lisses.

**Mot clés:** Biocorrosion, hydrogène, piles à combustible, acides faibles, enzymes

Laboratoire de Génie Chimique, 5 rue Paulin Talabot, 31106 Toulouse France

**Positive aspects issued from biocorrosion studies: from hydrogen production to biofuel cells**

**Summary**

Microbially influenced corrosion or biocorrosion is a problem that generates heavy global economic losses (several billion euros per year). In spite of the progress made on the understanding of the underlying mechanisms, the complexity of the phenomenon has prevented finding definitive solutions to the problem and continues to inspire many research works. The participation in biocorrosion of catalytic mechanisms induced by weak acids was studied in this work. Another objective of the thesis has been to take advantage from catalytic phenomena found in biocorrosion research to apply them in other areas: energy production with biofuel cells or electrochemical hydrogen production in mild conditions.

This work has shown that the presence of weak acids and amino acids inside biofilms could play a major role in steel biocorrosion accelerating the phenomenon through the catalysis of the water reduction reaction. The reversibility of this mechanism, discerned and proved here, could explain the corrosion increase when hydrogen is removed (bacterial consumption, agitation ...). In addition, phosphates allow the production of hydrogen by electrolysis in mild pH conditions (pH 4.0 - 8.0) with an equal or better performance than those found in alkaline electrolysis. Finally, industrial materials like stainless steel and titanium could be used in the fabrication of enzymatic electrodes for biosensors or microsystems. The use of the glucose oxidase/glucose system in an aqueous fuel cell with a stainless steel cathode, allows the improvement of the cell performance thanks to the production of hydrogen peroxide that is easily reduced. Moreover, the use of materials with microstructured surfaces like sandblasted steels deserve to be studied in detail to exploit the remarkable reactivity they present compared to smooth electrodes.

**Key words:** Biocorrosion, hydrogen, fuel cells, weak acids, enzymes

Laboratory of Chemical Engineering, 5 rue Paulin Talabot, 31106 Toulouse France