

Thèse

Présentée pour obtenir le titre de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE TOULOUSE

**École doctorale : Transferts Dynamiques Fluides et Procédés
Spécialité : Génie des Procédés et de l'Environnement.**

Par :

Claire DUMAS

Ingénieur en génie des procédés et de l'environnement de l'I.N.S.A. de Toulouse

Catalyse électro-microbienne dans les piles à combustible

Soutenue le 4 Décembre 2007 devant le jury composé de :

M.	BLOCK Jean-Claude	Rapporteur
M.	LEGRAND Jack	Rapporteur
M.	COGNET Patrick	Examineur
M.	FERON Damien	Examineur
M ^{me}	BASSEGUY Régine	Co-directeur de thèse
M.	BERGEL Alain	Directeur de thèse

Remerciements

Au terme de ces trois années de recherche, je souhaite adresser mes remerciements à tous celles et ceux qui ont participé, de près ou de loin, à cette aventure.

Les travaux présentés dans ce mémoire ont été réalisés au sein du Laboratoire de Génie Chimique de l'Institut National Polytechnique de Toulouse. Je tiens donc à remercier M. Joël Bertrand, directeur du LGC, de m'avoir accueillie au sein du laboratoire.

Ces travaux de recherche ont été menés sous la direction d'Alain Bergel et Régine Basséguy. Je les remercie pour m'avoir permis de travailler sur un thème de recherche aussi novateur, riche et passionnant. L'intérêt qu'ils ont manifesté pour ce travail, leurs conseils, leur patience et leur disponibilité n'ont jamais cessé durant ces années. Je tiens ici à leur exprimer ma profonde gratitude et toute ma sympathie.

J'adresse également tous mes remerciements aux Professeurs Jack Legrand et Jean-Claude Block d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail, ainsi que pour leur lecture attentive et pertinente de ce mémoire. Je remercie très sincèrement M. Damien Féron de m'avoir fait l'honneur d'être le président du jury. Je tiens aussi à le remercier d'avoir pris le temps de me faire partager ses connaissances scientifiques au cours des nombreuses rencontres du projet européen EA-Biofilms, du contrat CEA ou de l'ANR Bactériopile. Mes remerciements vont ensuite à M. Pascal Floquet pour avoir étudié minutieusement ce mémoire et pour avoir accepté d'être membre de ce jury.

Je souhaite remercier M. Patrice Bacchin pour sa disponibilité et ses conseils lors des mesures d'angles de contact, et M. Philippe Schmitz pour ses recommandations au cours de la conception de la cellule à écoulement. Je tiens également à remercier M. Bernard Tribollet pour ses remarques constructives sur les résultats de spectroscopie d'impédance.

Parmi ces remerciements, une mention spéciale au Professeur Alfonso Mollica avec qui j'ai pris un immense plaisir à travailler. Merci pour sa disponibilité, l'enthousiasme qu'il a manifesté au cours des mesures sur notre pilote à Gênes et surtout je le remercie pour sa gentillesse. Je voudrais aussi adresser un grand merci à tous les membres du projet européen EA-Biofilms qui m'ont beaucoup appris au cours de ces trois ans.

Merci à tous les membres de l'équipe Biosym qui ont contribué à rendre ces trois ans agréables. Un grand merci à Luc Etcheverry pour son enthousiasme, sa volonté et son aide « électronique ». Je te souhaite toute la réussite que tu mérites.

Bien évidemment, je souhaite remercier tous ceux du laboratoire avec qui j'ai partagé ces trois dernières années. Tout d'abord les gens du bureau : Sandrine, avec qui nous avons fait parcours commun. Merci pour ta bonne humeur, tes coups de gueule, ta joie de vivre... et tant d'autres choses. Les Libanais, Nancy, Maha et Dominique, pour leur gentillesse, pour leur amour sans relâche en leur pays, pour leur immense générosité. Mention particulière à Dominique qui a subi les émotions de trois filles dans le bureau au cours des derniers mois.

Pascal pour sa créativité, sa bonne humeur, sa touche exotique ...bonne chance Pascal pour la suite. Les Mexicains : Claudia, Léo. Un grand merci à Romuald avec qui nous avons passé de très bon moment au bureau mais aussi à Tournefeuille. Merci aux doctorants et post-doctorants de l'équipe Biosym : Benjamin, Caroline, Huberson, Luis, Alain...et aux habitués de la cafet' : Nathalie, Cécile, Rachel, Mouna, Greg, Franck...

Je ne m'étendrai pas sur cette page de remerciements mais j'aimerais juste que vous sachiez la grande amitié que je vous porte.

Je ne saurais oublier ma mère qui m'a toujours soutenue dans mon désir de poursuivre mes études, et dans les diverses difficultés que j'ai rencontrées.

Enfin, merci à Fabrice, pour avoir partagé tant de choses avec moi, pour m'avoir soutenue et pour avoir participé activement à cette aventure.

Catalyse électro-microbienne dans les piles à combustible

Résumé:

Les piles à combustible microbiennes (PACM) sont des systèmes qui assurent la conversion directe de matières organiques en énergie électrique en utilisant des biofilms bactériens comme catalyseur des réactions électrochimiques. Cette étude vise à améliorer la compréhension des mécanismes de transfert électronique entre les bactéries adhérentes et les électrodes, ainsi qu'à optimiser la production électrique des PACMs en explorant et caractérisant différents matériaux d'électrodes.

Les expériences effectuées en réacteur d'électrolyse sur la souche *Geobacter sulfurreducens* portent sur la catalyse électro-microbienne de l'oxydation de l'acétate, d'une part et de la réduction du fumarate d'autre part. Du côté anodique, des différences de densités de courant apparaissent sur graphite, DSA® et acier inoxydable (8A/m², 5A/m² et 0,7A/m² respectivement). Ces écarts sont attribués aux différences de rugosité des matériaux plutôt qu'à leur nature. Une étude par spectroscopie d'impédance montre que le biofilm électroactif qui se développe sur l'acier inoxydable ne semble pas modifier les couches d'oxydes du matériau, seul le potentiel imposé reste déterminant. Du côté cathodique, l'acier inoxydable a permis d'obtenir des densités de courant plus de vingt fois supérieures à celles obtenues avec des électrodes de graphite.

L'étude de l'adhésion de *G.sulfurreducens* sur les différents types de matériaux en cellule à écoulement cisailé, suggère que les biofilms résistent bien aux contraintes hydrodynamiques et ne se détachent pas en-dessous d'une valeur seuil du taux de cisaillement.

L'installation de deux prototypes de PACM, l'un en station marine et l'autre directement dans le port de Gênes (Italie) confirme certains résultats obtenus en laboratoire et s'avère prometteur pour l'extrapolation des PACMs à l'échelle pilote.

Mots clés :

Pile à combustible microbienne, *Geobacter sulfurreducens*, acier inoxydable, DSA®, bioélectrochimie, spectroscopie d'impédance, cellule à écoulement cisailé.

Microbial electro-catalysis in fuel cell

Abstract:

Microbial fuel cells (MFC) are devices that ensure the direct conversion of organic matter into electricity using bacterial biofilms as the catalysts of the electrochemical reactions. This study aims at improving the comprehension of the mechanisms involved in electron transfer pathways between the adhered bacteria and the electrodes. This optimization of the MFC power output could be done, for example, in exploring and characterizing various electrode materials.

The electrolysis experiments carried out on *Geobacter sulfurreducens* deal with the microbial catalysis of the acetate oxidation, on the one hand, and the catalysis of the fumarate reduction on the other hand. On the anodic side, differences in current densities appeared on graphite, DSA® and stainless steel (8A/m², 5A/m² and 0.7A/m² respectively). These variations were explained more by materials roughness differences rather than their nature. Impedance spectroscopy study shows that the electroactive biofilm developed on stainless steel does not seem to modify the evolution of the stainless steel oxide layer, only the imposed potential remains determining. On the cathodic side, stainless steel sustained current densities more than twenty times higher than those obtained with graphite electrodes.

The adhesion study of *G.sulfurreducens* on various materials in a flow cell, suggests that the biofilms resist to the hydrodynamic constraints and are not detached under a shear stress threshold value.

The installation of two MFC prototypes, one in a sea station and the other directly in Genoa harbour (Italy) confirms some results obtained in laboratory and were promising for a MFC scale-up.

Keywords: Microbial fuel cell, *Geobacter sulfurreducens*, stainless steel, DSA®, bioelectrochemistry, impedance spectroscopy, flow cell

Sommaire

Sommaire

<u>Sommaire</u>	<u>5</u>
-----------------------	----------

<u>Introduction générale.....</u>	<u>9</u>
-----------------------------------	----------

<u>Chapitre 1 : Des énergies renouvelables à la pile à combustible...microbienne</u>	<u>13</u>
--	-----------

1. Contexte énergétique	14
2. Pile à combustible	15
3. Biofilms	19
3.1. Formation et développement du biofilm	19
3.2. Propriétés du biofilm	20
3.3. Aspects négatifs/positifs	21
4. Pile à combustible microbienne.....	23
4.1. Historique	23
4.2. Mécanismes dans les PACMs	24
4.3. Design	36
4.4. Matériaux d'électrodes.....	42
4.5. Applications	43
4.6. Les biocathodes	46
5. Caractérisation des PACMs : thermodynamique et fondamentaux électrochimiques	53
5.1. Thermodynamique.....	53
5.2. Potentiels standards	54
5.3. Surtensions et pertes de puissance dans les piles à combustible microbiennes.....	56
5.4. Calculs et procédures de caractérisations de la PACM	60
6. Conclusions	62

<u>Chapitre 2 : Matériel et Méthodes.....</u>	<u>63</u>
---	-----------

1. Réacteurs d'électrolyse.....	64
1.1. Milieu et conditions de croissance	64
1.2. Réacteurs électrochimiques	65
1.3. Electrodes : matériaux et prétraitement	66
2. Techniques électrochimiques	67
2.1. Chronoampérométrie.....	68
2.2. Voltammétrie cyclique.....	68
3. Caractérisation des matériaux d'électrodes.....	69
3.1. Techniques de microscopie	69
3.2. Mesure d'angle de contact	72
3.3. Spectroscopie d'impédance	73
4. Cellule à écoulement	83
4.1. Préparation des échantillons.....	83
4.2. Pré-requis.....	83
4.3. Matériel.....	85
4.4. Déroulement des essais	87
5. Piles à combustible microbiennes marines installées à Gênes.....	87
5.1. Pile en mer.....	87

5.2. Pile en laboratoire	88
--------------------------------	----

Chapitre 3 : *Transfert électronique entre Geobacter sulfurreducens et une électrode*
..... 91

1. Justification du choix du système	93
1.1. La souche <i>Geobacter sulfurreducens</i>	93
1.2. Le choix des matériaux.....	95
1.3. Le choix du milieu.....	97
1.4. Le choix du potentiel	97
2. Comparaison des matériaux d’anodes pour le transfert d’électrons avec G. sulfurreducens	98
2.1. Comparaison entre DSA et graphite.....	98
2.2. Acier inoxydable (254SMO)	113
2.3. Perspectives	141
3. Étude des propriétés semi-conductrices des couches passives sur acier inoxydable en présence de biofilm électroactif.....	142
3.1. État de l’art	142
3.2. Résultats	146
3.3. Conclusions et perspectives.....	158
4. Comparaison des matériaux de cathode pour le transfert d’électrons avec G. sulfurreducens.....	161
4.1. Acier inoxydable et graphite	161
4.2. Perspectives	174
5. Conclusions	174

Chapitre 4 : *Étude de l’adhésion de Geobacter sulfurreducens à l’aide d’une cellule à écoulement*
..... 177

1. Paramètres qui influencent l’adhésion des bactéries.....	178
1.1. Facteurs pouvant modifier l’adhésion : influence du matériau.....	179
1.2. Paramètres influençant l’adhésion : influence de la cellule bactérienne.....	180
2. Les différentes cellules à écoulement cisailé	183
3. Caractérisation des paramètres des matériaux qui influencent l’adhésion des bactéries.....	186
3.1. Rugosité et topographie des matériaux	187
3.2. Mesures du caractère hydrophile/hydrophobe par la méthode de dépôt d’une goutte sur support.....	192
4. Comparaison du détachement de biofilm sur différents matériaux d’électrode à l’aide de la cellule à écoulement cisailé.....	193
4.1. Méthodologie et déroulement des essais	194
4.2. Détachement du biofilm dans la cellule à écoulement cisailé.....	195
5. Conclusions et perspectives sur les tests de détachement.....	209

Chapitre 5: *Prototypes de pile à combustible microbienne marine (PACMM).....*
..... 211

1. Le développement des PACMMs.....	212
2. Les PACMMs de Gênes, nées de la collaboration entre l’ISMAR-CNR de Gênes, le CEA-Saclay et le CNRS-LGC de Toulouse.....	216
2.1. Installation	216

2.2. Résultats	218
3. Conclusions	247
<i><u>Conclusion générale</u></i>	<i><u>249</u></i>
<i><u>Table des illustrations.....</u></i>	<i><u>253</u></i>
<i><u>Références</u></i>	<i><u>259</u></i>
<i><u>Annexes</u></i>	<i><u>271</u></i>

Introduction générale

Introduction générale

Les énergies renouvelables sont de nos jours au cœur de l'actualité et considérées comme une solution pour favoriser l'indépendance énergétique de la France et diminuer les émissions de gaz à effet de serre. Les piles à combustibles ont souvent été présentées comme le système énergétique de la voiture de demain. Toutefois, le développement des piles à combustible dans le domaine automobile tarde à venir. Le platine, catalyseur nécessaire pour que les réactions électrochimiques aient lieu est rare et donc très coûteux. Les réserves terrestres de platine ne seraient pas suffisantes pour convertir le parc automobile mondial à ce modèle énergétique. L'utilisation des piles à combustibles est pour le moment réservée à d'autres applications telles les batteries de téléphones cellulaires ou d'ordinateurs, où le platine est présent en plus faible quantité. De nombreuses recherches se focalisent sur le remplacement du platine par un matériau moins noble, et moins coûteux.

C'est dans ce contexte que ce travail de thèse s'inscrit. Le but est d'utiliser les biofilms, présents sur toutes surfaces humides, comme catalyseur dans les piles à combustible. En effet, la respiration des bactéries qui constituent le biofilm, par exemple, est gouvernée par des transferts électroniques. Le but ici est de tirer bénéfice de ces transferts électroniques et de favoriser leur adhésion à la surface des électrodes de la pile. Habituellement, les biofilms sont dénoncés pour les modifications de surfaces qu'ils entraînent dans les installations industrielles, maritimes et leurs contributions significatives dans la biodétérioration des matériaux, les maladies nosocomiales etc.

Ce manuscrit fait appel d'une part à la microbiologie, afin de déterminer et comprendre les phénomènes biologiques qui rentrent en jeu au sein du biofilm et, d'autre part, à l'électrochimie pour la compréhension des phénomènes de transfert électronique entre l'électrode et les bactéries. Cette étude s'effectue sans perdre de vue un objectif énergétique, le développement d'un système de production d'énergie à partir de bactéries : la pile à combustible microbienne.

Les piles à combustible microbiennes (PACMs) sont des systèmes qui assurent la conversion directe de matières organiques en énergie électrique en utilisant des biofilms bactériens comme catalyseur des réactions électrochimiques. Les PACMs offrent ainsi une solution innovante à deux préoccupations contemporaines majeures: développer des systèmes de production d'énergie durable et intensifier les procédés de traitement des déchets et effluents.

Les objectifs de cette étude portent sur l'amélioration de la compréhension des mécanismes de transfert électronique entre les bactéries adhérentes et les électrodes, ainsi que sur l'optimisation de la production électrique des PACMs. L'une des pistes d'étude sera l'exploration et la caractérisation de différents matériaux d'électrodes.

Une partie de ce travail a été réalisée au sein du projet européen « *Electrochemically Active Biofilms* » regroupant sept partenaires européens issus de cinq pays différents : Consiglio Nazionale delle Ricerche-Istituto di Scienze Marine (CNR-ISMAR ; Italie), University Duisburg-Essen - Biofilm Center (UDE-BC ; Allemagne), University Gent (UGent ; Belgique), Química Faculdade de Ciências e Tecnologia-Universidade Nova de Lisboa (CQFB-UNL ; Portugal), Commissariat à l’Energie Atomique (CEA ; France), Centro Elettrotecnico Sperimentale Italiano (CESI; Italie) et nous même (CNRS-LGC ; France). Ce projet a pour objectif de trouver des bactéries électroactives, capables de transférer des électrons à des matériaux conducteurs et de comprendre les mécanismes qui rentrent en jeu au cours de ces transferts. L’autre grande partie de cette étude s’inscrit dans le contrat « Biopile », entre le CEA de Saclay et le CNRS-LGC de Toulouse, et en collaboration avec le CNR-ISMAR de Gênes. Le but est de développer une alternative à l’utilisation du platine dans les piles à combustible, aussi bien pour la cathode que pour l’anode. Enfin, ce travail est aussi intégré au projet « Bactériopile » regroupant le CEA de Saclay, Ugine & Alz d’Isbergues et le CNRS-LGC de Toulouse. Il s’agit ici de mettre en place un prototype autonome de pile à combustible microbienne marine. Ce travail de thèse est donc le fruit de nombreux échanges et collaborations effectués au sein de ces différents projets.

Le premier chapitre de ce manuscrit présente le contexte et une revue bibliographique sur les piles à combustible microbiennes. La première partie du chapitre décrit le contexte dans lequel s’inscrit les énergies renouvelables. Dans la deuxième partie, l’accent est porté sur les piles à combustibles, l’exemple de la pile à combustible à hydrogène est détaillé. La troisième partie s’attarde sur les biofilms et leurs conséquences négatives et positives. La quatrième partie concerne les piles à combustible microbiennes, leur définition, leur historique, les différents modes de fonctionnement, leurs applications... La dernière partie présente quelques méthodes de caractérisation des PACMs.

Le deuxième chapitre présente les dispositifs expérimentaux et les techniques électrochimiques et de caractérisation des matériaux utilisés. La cellule à écoulement cisailé utilisée pour les tests de détachement est décrite. Enfin, le matériel et les prototypes de PACM mis en place dans le port de Gênes sont détaillés.

Le chapitre 3 est consacré à l’étude du transfert électronique entre la bactérie *Geobacter sulfurreducens* et différentes électrodes. La première partie justifie le choix du système et des divers paramètres opératoires. La deuxième partie, l’étude se focalise sur l’exploration des matériaux

d'anode, avec une comparaison entre le graphite, les anodes stables en dimension (DSA) et l'acier inoxydable. Dans la suite du chapitre, l'intérêt se porte sur l'étude de l'interface bactérie/électrode par spectroscopie d'impédance et en particulier sur l'évolution des couches d'oxydes de l'acier inoxydable au cours du développement du biofilm électroactif de *G. sulfurreducens* sous polarisation anodique. La comparaison des matériaux de cathode est effectuée dans la dernière partie de ce chapitre.

Toujours en vue d'une compréhension des interactions bactéries/électrode, le quatrième chapitre s'intéresse au détachement d'un biofilm de *G. sulfurreducens* sur les matériaux d'électrodes étudiés dans le chapitre 3.

Le dernier chapitre de ce manuscrit est consacré à la mise en place de prototypes de PACM dans le port de Gênes en Italie.

Chapitre 1 :

*Des énergies renouvelables à la pile
à combustible...microbienne*

Chapitre 1 :

Des énergies renouvelables à la pile à combustible...microbienne

1. Contexte énergétique

De nos jours l'intérêt pour les énergies renouvelables ne cesse de se développer. Plusieurs facteurs rentrent en jeu comme le réchauffement climatique, la hausse des prix de l'énergie ...

Le réchauffement climatique est un constat étayé par des rapports scientifiques de plus de 600 climatologues. Les causes du réchauffement sont attribuées à l'activité humaine et essentiellement aux émissions de gaz à effet de serre. Selon le groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat (GIEC) l'activité humaine serait impliquée pour plus de 90% dans le réchauffement. Les objectifs du protocole de Kyoto (1997), ratifié par l'Union Européenne et la France en 2002, sont de développer des énergies renouvelables pour la production d'électricité et de limiter les gaz à effets de serre (diminuer de 5,2% les émissions en 2010 par rapport à celles de 1990).

Les prix du pétrole ont connu, quant à eux, une forte hausse entre 2002 et 2006, sous l'effet d'une forte demande, non anticipée, en provenance de Chine et d'un épuisement des réserves. Les réserves prouvées de pétrole s'élevaient en 2003 à 140Gtep alors que la consommation depuis le début de l'ère pétrolière s'élevait elle à 120Gtep, soit une estimation des réserves à 50 ans, sans tenir compte de l'augmentation de la consommation dans les années à venir. Cette augmentation de prix s'explique aussi par des inquiétudes géopolitiques (tension au Moyen-Orient, troubles passagers au Venezuela...) mais aussi par des dégâts industriels causés lors de catastrophes naturelles (ouragan Katrina).

L'enjeu énergétique est double : trouver une source d'énergie capable de remplacer le pétrole et ne dégageant pas ou peu de gaz à effet de serre. C'est dans ce contexte que se développent les énergies renouvelables. Il est important de noter que pour répondre à nos besoins croissants en énergie de la façon la plus durable possible, il est nécessaire de développer toutes les énergies renouvelables et ce malgré leurs coûts élevés, leur répartition géographique non uniforme sur le globe et le caractère aléatoire de leur production d'énergie.

L'Union Européenne a favorisé le développement des énergies renouvelables dès 1997, en imposant dans son livre blanc, un objectif de 12% d'énergie renouvelable dans chaque pays d'ici 2010¹. Les pays leaders dans ce domaine sont la Suède, la Lettonie, la Finlande et l'Autriche avec, dès 2004, une proportion de 20% de leur énergie consacrée aux énergies renouvelables. En

¹<http://europa.eu/scadplus/leg/fr/lvb/l27023.htm>

France cette part s'élève à 6%, provenant essentiellement de la biomasse avec la filière bois-énergie (environ 4%) : chauffages collectifs ou individuels à base de bois ou copeaux de bois couplé ou non à des dispositifs de cogénération. L'autre énergie renouvelable majoritaire en France provient de l'hydraulique avec les nombreux barrages (447 barrages). Le développement du parc éolien en France est important, depuis 2004, la puissance électrique provenant de l'éolien double chaque année. En 2006, la puissance cumulée s'élevait à 1 427 MW. Même si le taux de croissance annuel est important, le développement de l'éolien en France reste faible par rapport à des pays comme l'Allemagne et l'Espagne qui possèdent des parcs éoliens de 19000 et 11000 MW respectivement. De même, la France n'est pas très bonne élève en terme de surface solaire installée par habitant. Cependant de nombreuses aides sont désormais mises en place et devraient favoriser le développement des énergies renouvelables. En effet, un particulier peut déduire de ces impôts 50% du coût du matériel utilisé pour l'installation d'un dispositif d'énergie renouvelable.

Le combustible de synthèse majoritairement envisagé en remplacement du pétrole est l'hydrogène. Il permet de stocker et distribuer de façon souple l'énergie tout en étant peu polluant. L'hydrogène est l'élément le plus abondant sur notre planète sous forme d'eau. Au cours de sa réaction avec l'oxygène, il ne forme ni dioxyde de carbone (CO_2), ni polluants tels que les oxydes d'azote (NO_x), monoxyde de carbone (CO)... Il n'est cependant pas directement disponible dans la nature et est produit par vaporéformage du gaz naturel ou au cours de l'électrolyse de l'eau par apport d'énergie électrique issues des centrales nucléaires, éoliennes, solaires, hydrauliques. Il peut aussi être produit à partir de la biomasse par la production de biogaz. Pour que le développement de la filière hydrogène soit viable et écologique, il est nécessaire de développer toutes les étapes de la filière allant de la production à l'utilisation finale en passant par le stockage et la distribution. La pile à combustible s'inscrit alors comme un élément clé du développement de la filière hydrogène.

2. Pile à combustible

La pile à combustible (PAC) est un système de production d'énergie renouvelable qui possède de nombreux atouts. Par exemple, une pile à combustible à membrane échangeuse de proton (PEMFC) ou pile à hydrogène utilise de l'hydrogène comme combustible, et de l'oxygène comme comburant, le « déchet » obtenu est ... de l'eau. Il existe actuellement six types de piles à combustible :

- Pile à combustible alcaline: AFC (*Alkaline Fuel Cell*),

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

Ces PACs se différencient par la nature de leur combustible, de leur électrolyte, leur température de fonctionnement, leurs domaines d'application. A l'heure actuelle les PACs les plus développées sont les PEMFCs, les AFCs, les DMFCs. Le Tableau 1 présente les différents types d'applications et les gammes de puissances des piles à combustible.

Nous nous intéresserons plus particulièrement aux PEMFC, autrement appelées pile à combustible à hydrogène. Les PEMFCs fonctionnent à basses températures, c'est-à-dire entre 60 et 100°C et sont utilisées pour des applications portables (téléphones, ordinateurs...), automobiles ou éventuellement stationnaires (applications domestiques).

Types d'applications	Équipement électronique portable			Voitures, Bateaux, Cogénération domestique			Production d'électricité distribuée, Cogénération, Autobus	
	1	10	100	1 k	10 k	100 k	1 M	10 M
Puissance en Watt								
Principaux avantages	Plus grande densité d'énergie que les batteries, recharge plus rapide			Aucune émission, grande efficacité			Grande efficacité, peu de pollution, silencieux	
Gamme d'applications des piles à combustible	DMFC			AFC		MCFC		
	PEMFC						SOFC	
							PAFC	

Tableau 1 : Applications et principaux avantages des différents types de piles à combustibles (Larminie et al. 2003)

Principe de fonctionnement des PEMFC

Une PAC à hydrogène fonctionne à l'inverse d'un électrolyseur et transforme directement l'énergie chimique en énergie électrique. La Figure 1 représente le schéma de principe de la pile à

combustible à hydrogène. Elle possède deux compartiments : anodique et cathodique séparés par une membrane échangeuse de protons (PEM : *Proton exchange membrane*) qui assure le transfert des protons de l'anode vers la cathode tout en empêchant le transfert de gaz (*gas cross over*).

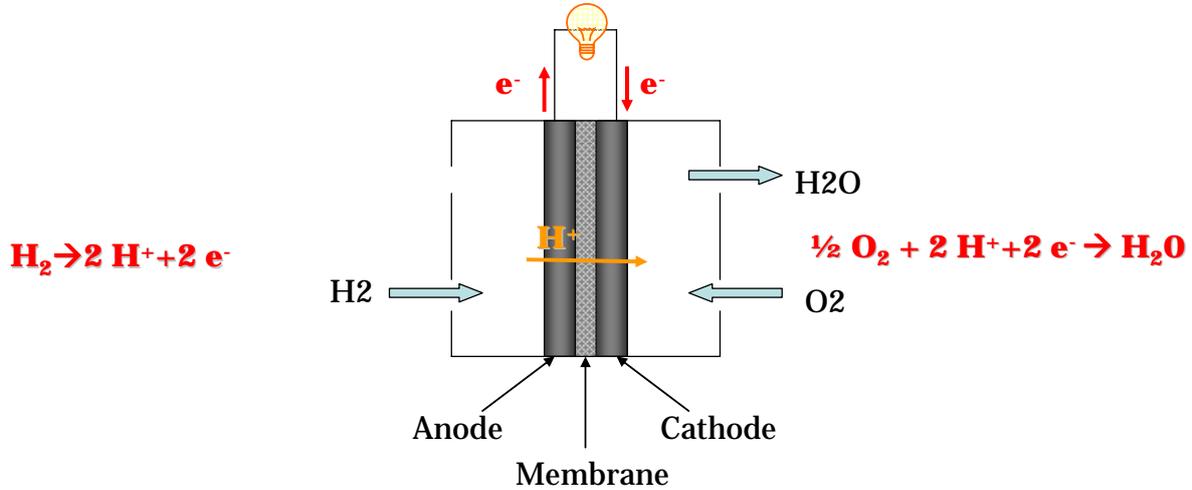


Figure 1 : Schéma de principe de la pile à combustible à hydrogène

Sur l'anode a lieu la réaction d'oxydation de l'hydrogène $H_2 \rightarrow 2H^+ + 2e^-$. Il y a production de deux électrons et deux protons par molécule d'hydrogène. Les électrons circulent du côté anodique vers le compartiment cathodique via le circuit électrique, il y a ainsi production de courant. Les ions H^+ , sont transférés de l'anode à la cathode au travers de la PEM. Sur la cathode se produit la réduction de l'oxygène $\frac{1}{2}O_2 + 2H^+ + 2e^- \rightarrow H_2O$ qui consomme les ions H^+ et les électrons libérés au cours de la réaction précédente. Pour accélérer les réactions de réduction de l'oxygène et d'oxydation de l'hydrogène aux électrodes, et augmenter les performances au démarrage des piles, il est nécessaire d'utiliser un catalyseur sur les électrodes. Dans les PEMFC, ce catalyseur est à base de platine. En effet, chaque électrode est un assemblage successif d'électrode – membrane - électrode appelée MEA (*Membrane Electrode Assembly*) à base de carbone contenant entre 0,1 et 1 mg/cm² de platine. Les densités de courant obtenues avec de telles piles varient entre 200 et 400A/cm² pour une tension d'environ 0,7V (Hottinen et al. 2004).

La pile à combustible pourrait être la meilleure alternative face aux installations lourdes de production d'électricité/chauffage, mais aussi augmenter l'autonomie des appareils portables électriques (téléphones cellulaires, ordinateurs etc.) ainsi que celle des voitures électriques ou des bus. L'intérêt qui leur est porté provient des nombreux avantages qu'elles présentent. Elles possèdent des rendements énergétiques élevés et de faibles émissions sonores (facteur important dans le domaine automobile). De plus, leur construction est présentée sous forme de modules pouvant être mis en parallèle ou en série, formant ainsi un *stack* mis en assemblage « filtre-pressé » afin d'augmenter la tension de la pile et de s'adapter aux valeurs de puissance désirée. Elles

peuvent fonctionner à différentes températures, et ne possèdent pas de parties rotatives. L'intérêt essentiel des PEMFCs réside dans l'utilisation de l'hydrogène, combustible dont les avantages écologiques ont été détaillés plus haut.

Cependant, le développement des PEMFCs tarde. Le premier obstacle est l'utilisation de la membrane Nafion®, membrane la plus employée dans les PEMFCs. Cette membrane de type perfluorée (Figure 2), est produite par Dupont de Nemours. Bien que d'autres compagnies concurrentes (Asahi Chemicals, Gore, Dow Chemicals) commercialisent des membranes échangeuse d'ions, la complexité et la sélectivité de la membrane Nafion®, la rendent coûteuse (800\$/m²).

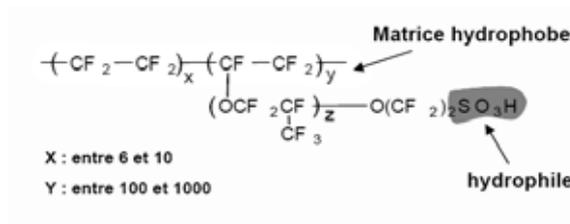


Figure 2 : Composition de la membrane Nafion®

L'autre obstacle majeur est la nécessité d'utiliser du platine comme catalyseur des réactions électrochimiques qui se produisent sur les électrodes. Un des principaux défis technologiques pour la commercialisation des PEMFCs, réside dans la recherche de catalyseurs anodiques et cathodiques pouvant remplacer le platine. Celui-ci présente, en effet, quelques inconvénients, notamment sa sensibilité au monoxyde de carbone, souvent présent sous forme de traces dans l'hydrogène produit par reformage. Le platine est un élément rare et onéreux sur notre planète. En effet, les réserves terrestres ne permettraient pas d'équiper le parc automobile mondial en PEMFC. De plus, bien que l'hydrogène représente un vecteur énergétique idéal du point de vue écologique, il présente quelques défauts : d'une part son inflammabilité, engendrant des contraintes réglementaires, et d'autre part sa volatilité qui le rend difficile à stocker.

Afin de remplacer le catalyseur onéreux qu'est le platine, certaines recherches se tournent vers les piles à combustible microbiennes (PACMs), pile à combustible utilisant des bactéries organisées sous forme de biofilm pour catalyser les réactions aux électrodes. Avant de s'intéresser aux piles à combustibles microbiennes, une description des caractéristiques, propriétés et avantages ou inconvénients des biofilms est présentée dans les prochains paragraphes.

3. Biofilms

Au cours des vingt dernières années, les microbiologistes ont pris conscience que le mode de croissance bactérienne utilisé en laboratoire n'était pas le reflet de la réalité.

Les études étaient principalement faites avec des bactéries en suspension, bactéries dites planctoniques, alors que les bactéries, dans leur environnement naturel, sont organisées en biofilm. Les biofilms sont des films biologiques constitués de bactéries adhérentes sur une surface, qui produisent une matrice d'exopolymères. Les techniques actuelles d'analyses locales ont permis de découvrir la structure complexe des biofilms. Ces techniques peuvent fournir des informations de nature physique, chimique et biochimique ou biologique. Nous citerons, par exemple, la microscopie confocale laser, la microscopie à balayage électronique, le microscope à force atomique, la cytométrie de flux, les sondes FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*), etc.

Les biofilms sont présents partout. Toutes les installations industrielles possédant une certaine humidité sont exposées à la formation de biofilms. Tout équipement non stérilisé abrite des micro-organismes qui peuvent démarrer un processus de colonisation entre deux procédures de nettoyage-désinfection. Un biofilm peut se mettre en place en quelques heures, et permettre ainsi aux bactéries qui le constituent, de devenir résistantes aux agents extérieurs. Afin de lutter contre les dégradations et infections qui peuvent être provoquées par la présence de biofilms, de nombreuses études se sont développées sur ce sujet.

Dans le paragraphe suivant, les étapes du développement du biofilm (sa formation, sa maturation) sont détaillées. Par la suite, les propriétés des biofilms sont abordées et plus particulièrement leurs effets, qu'ils soient négatifs ou positifs.

3.1. Formation et développement du biofilm

Le développement d'un biofilm se déroule en plusieurs étapes (Figure 3). La première consiste en l'adhésion primaire (réversible) des bactéries sur une surface, principalement par liaisons chimiques non covalentes, qui sont des liaisons fragiles. Pour pouvoir approcher et adhérer sur un support, les bactéries font intervenir des appendices de mobilité appelés pili. Lors de la deuxième étape, les bactéries sécrètent des polysaccharides et des protéines possédant des propriétés adhésives, pouvant empêcher (Busscher et al. 1997) (Kisugi 1992) ou favoriser la colonisation par d'autres micro-organismes (Wimpenny et al. 1993). En effet, certaines espèces sont incapables de s'ancrer elles-mêmes et s'attachent au biofilm formé par d'autres espèces déjà installées. Au cours de la troisième étape, les micro-organismes se divisent et forment des micro-

colonies dont la structuration implique l'expression de gènes liés au *quorum sensing*², et à la production d'exopolymères qui englobent la bactérie. Ces exopolymères constituent entre 50 et 95% du poids sec du biofilm. Cette matrice renforce la structure du biofilm tout en lui conservant une grande plasticité. Le biofilm grandit et s'épaissit jusqu'à devenir macroscopique. La dernière étape est la phase de dispersion induite par le vieillissement du biofilm, des carences ou le stress lié à l'environnement. Les bactéries se détachent de la matrice, retournent à l'état planctonique, et peuvent ainsi coloniser une autre surface.

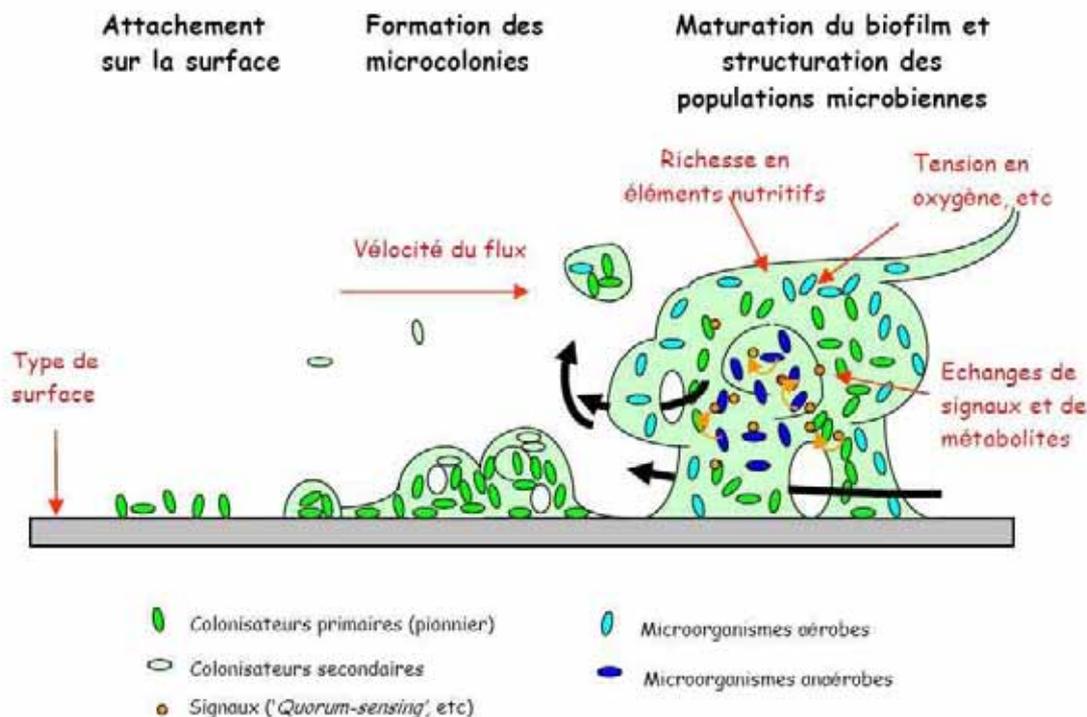


Figure 3 : Représentation schématique du développement d'un biofilm (Prigent-Combaret 2005). En rouge sont indiqués les principaux paramètres qui influencent l'architecture du biofilm mature.

3.2. Propriétés du biofilm

Le biofilm mature possède une structure bien établie. Les micro-colonies sont séparées par des canaux qui forment un réseau de circulation permettant d'acheminer l'oxygène et les nutriments dans les régions profondes du biofilm, mais aussi d'évacuer les déchets. Un gradient d'oxygène et de nutriments est observable depuis le sommet jusqu'au cœur du biofilm. Au sein de cette

² Le *quorum sensing* est la capacité qu'a une bactérie à communiquer et à coordonner son comportement avec les autres bactéries d'une même colonie en utilisant des molécules de signalisation. Grâce au *quorum sensing*, les bactéries d'une même espèce coordonnent certains comportements ou actions entre elles, en fonction de leurs nombres. Par exemple, les bactéries opportunistes comme *Pseudomonas aeruginosa* peuvent croître dans l'organisme hôte sans effets pathogènes jusqu'à ce qu'elles atteignent une certaine concentration. Ces bactéries deviennent alors agressives et leur nombre suffit à dépasser le système immunitaire hôte et à former un biofilm, entraînant la maladie.

structure, les bactéries modifient leurs caractéristiques phénotypiques : modification de la morphologie, des caractéristiques énergétiques, disparition de flagelles, (Flemming 1990; Costerton et al. 1995; Briandet et al. 2001). Il a été démontré qu'en les comparant avec des bactéries planctoniques, 38% des gènes de *E. coli* étaient modifiés au cours de la phase de colonisation (Prigent-Combaret 1999).

L'éradication des biofilms bactériens pose de nombreux problèmes, car si les antibiotiques ou biocides sont probants sur les bactéries planctoniques, ils le sont beaucoup moins sur un biofilm. Les raisons de cette résistance sont encore discutées et plusieurs hypothèses sont avancées. La concentration en nutriments à l'intérieur du biofilm étant faible, les bactéries situées à l'intérieur de celui-ci auraient un métabolisme et une croissance ralentis rendant les antibiotiques inefficaces. La seconde hypothèse serait que la matrice d'exopolymères ralentirait la pénétration d'antibiotiques et de biocides. Ainsi, l'alginate, exopolymère sécrété par la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*, capture le peroxyde d'hydrogène qui n'atteint alors pas la cellule bactérienne (Filloux et al. 2003).

3.3. Aspects négatifs/positifs

3.3.1. Aspects négatifs

Les biofilms sont souvent dénoncés aux vues des conséquences qu'ils engendrent. Lutter contre le développement biofilms est, par exemple dans le domaine médical, un enjeu important. Les biofilms sont responsables de certains problèmes de santé publique. En effet, 65% des infections bactériennes chez l'homme impliquent des biofilms. Les biofilms peuvent se former au niveau de cathéters ou d'implants (valves cardiaques, prothèses de hanches), et attaquer des tissus corporels comme les dents, les yeux, les poumons, les oreilles ou le tractus urogénital (Costerton et al. 1999). Ces infections dans les hôpitaux sont connues sous le terme d'infections nosocomiales.

Le biofouling, la biocorrosion, l'endommagement des matériaux ainsi que la contamination lors de la fabrication de produits alimentaires sont des problèmes industriels constants et coûteux. Par exemple, les biofilms peuvent dégrader les propriétés organoleptiques de produits alimentaires. De plus, en se développant dans les circuits de refroidissement ils peuvent engendrer une diminution des capacités d'échange thermique. Les activités marines et portuaires font face à de graves problèmes liés aux biofilms marins. La corrosion induite par les micro-organismes (*Microbiologically Influenced Corrosion : MIC*) ou biocorrosion est estimée chaque année à 5 milliards d'euros en France (Rubio et al. 2006) et a fait l'objet de nombreuses études (Heitz et al. 1996; Videla et al. 1996).

3.3.2. Aspects positifs

Dans les eaux, sur et sous terre, les biofilms sont des composants essentiels des environnements naturels. Les micro-organismes constituent la majeure partie de la biomasse vivante terrestre et en tant que tel ont un rôle majeur dans le recyclage des éléments essentiels à la vie³. Les bactéries ont été associées à la formation de plusieurs types de rocs sédimentaires et de minéraux. D'autre part, les biofilms ont été utilisés depuis des siècles avec succès dans le traitement des eaux et des eaux usées. Des ingénieurs anglais ont développé le premier filtre à sable pour traiter les eaux dans les années 1860. Dans ce type de filtration, la surface du filtre joue le rôle de support pour l'adhésion des bactéries, qui forment ainsi un biofilm apte à dégrader la matière organique de l'eau. La biomasse immobilisée sur le filtre est évacuée durant le cycle de rétrolavage.

Dans les sols, la morphologie des biofilms peut être très variable, allant de quelques colonies à d'épais biofilms, selon les conditions environnementales. Quand des contaminants toxiques (tel que le gasoil, l'essence, ou les solvants chlorés) sont accidentellement rejetés dans le sol, la population bactérienne doit s'adapter à la nouvelle composition du milieu afin d'utiliser ces contaminants comme substrat. Ce procédé est appelé bioremédiation et s'il fonctionne bien, il a la capacité de transformer les matières organiques toxiques en sous-produits inoffensifs.

La biolixiviation est l'utilisation de micro-organismes pour extraire des métaux d'un minerai. La lixiviation consiste à séparer une substance soluble d'une structure solide. Pour cela, le solide est incorporé à une préparation liquide qui facilite son extraction. En ce qui concerne la biolixiviation, on utilise une solution bactérienne. La biolixiviation est un procédé utilisé actuellement à grande échelle, à des fins commerciales comme par exemple dans le cas de la biolixiviation du cuivre, ou d'une pyrite cobaltifère (Usine du Bureau de Recherches Géologiques et Minières en Ouganda). De nos jours, environ 10 à 20% des cuivres miniers des USA sont extraits par des procédés faisant intervenir des bactéries. Il existe un investissement considérable dans l'extension des procédés de biolixiviation aux métaux tels que l'uranium, l'argent, l'or et enfin le molybdène. Les micro-organismes sont aussi utilisés pour la biooxydation, non pour extraire les métaux mais pour les préparer en vue de cette opération. La biooxydation est principalement employée lors de l'extraction de l'or. Des micro-organismes capables de dégrader l'enrobage minéral des minerais d'or par oxydation avant le procédé d'extraction.

Ces interactions bactérie/éléments métalliques sont un point clé des piles à combustible microbiennes (PACMs). En effet, la plupart des bactéries isolées des PACMs sont des bactéries métallos-réductrices.

³ Rapport « Global environmental change : microbial contributions, microbial solutions », [http://www.asm.org/ASM/files/CCPAGECONTENT/DOCFILNAME/0000006005/globalwarming\[1\].pdf](http://www.asm.org/ASM/files/CCPAGECONTENT/DOCFILNAME/0000006005/globalwarming[1].pdf)

4. Pile à combustible microbienne

Les piles à combustible microbiennes sont des piles à combustible qui utilisent les bactéries comme catalyseurs pour oxyder (ou réduire) la matière organique ou inorganique et générer du courant. Il est important de noter que la plupart des articles scientifiques présentent des PACMs avec une anode biologique et une cathode abiotique. Seuls quelques articles rapportent des travaux sur les biocathodes (Gregory et al. 2004; Bergel et al. 2005; Rhoads et al. 2005; He et al. 2006a). Les paragraphes qui vont suivre font l'historique des PACMs à anode biologique et cathode abiotique, détaillent les mécanismes se déroulant dans le compartiment anodique et les applications des PACMs. La présentation des biocathodes est développée dans le paragraphe 4.6.

4.1. Historique

(Shukla et al. 2004) (Katz et al. 2003a) (Davis et al. 2007)

Depuis des siècles, les bactéries capables de transformer de l'énergie chimique (substrat) en électricité, intéressent les scientifiques, cependant, ce n'est qu'aujourd'hui que des applications sont envisagées pour de petits appareils électroniques mais aussi pour des installations pilotes de plusieurs kilowatts⁴. Luigi Galvani en 1790, fut le premier à constater que les pattes d'une grenouille se contractaient lorsque un bref courant les traversait. C'est à partir de ce moment là qu'est apparu le mot « Bioélectricité ». Bien que le concept de pile à combustible ait été découvert en 1839, il faudra attendre 1910, pour que Michael Cresse Potter, professeur en botanique, découvre que des micro-organismes peuvent produire du courant. En 1931, cette propriété est exploitée par Cohen qui en connectant en série des biopiles à combustible obtint des tensions jusqu'à 35V (Cohen 1931). Le développement des biopiles à combustible s'est surtout accentué dans les années 60, lorsque la NASA s'est intéressée à la transformation des déchets organiques en électricité sur les vols spatiaux. En 1963, les premières piles à combustible biologiques furent commercialisées en tant que sources d'énergies dans les radios, signaux lumineux et autres appareils en mer (Shukla et al. 2004). Cependant, le coût des énergies fossiles restant faible, les piles à combustible biologiques ne se sont pas plus développées et furent un échec commercial. Plus tard au cours des crises pétrolières des années 70-80, les piles à combustible biologiques sont réapparues. Une importante amélioration a été apportée par Benetto et al. qui ont prouvé que l'ajout de médiateurs électrochimiques augmentait à la fois l'efficacité du système ainsi que la vitesse des réactions (Benetto et al. 1981; Thurston et al. 1985; Allen et al. 1993). Cependant, les puissances obtenues restaient toujours insuffisantes pour un réel développement des PACMs.

⁴ *LiveScience* - Novembre 2004 Waste Not: Energy from Garbage and Sewage

Récemment, un nouvel intérêt est né pour les PACMs grâce à la découverte du transfert direct d'électrons entre les bactéries et une électrode (Bond et al. 2003; Chaudhuri et al. 2003). Ainsi, les PACMs ne nécessitent plus l'ajout de médiateurs électrochimiques qui rendaient le système plus coûteux, plus polluant et moins durable dans le temps. De plus, ce contact direct entre les bactéries et l'électrode augmente le rendement faradique du système et permet ainsi d'atteindre des puissances de l'ordre du W/m² de surface d'électrode.

4.2. Mécanismes dans les PACMs

La compréhension des mécanismes de transfert électronique entre la bactérie et l'électrode apparaît aujourd'hui comme essentielle dans le développement des PACMs. De nombreux articles de revue s'intéressent à ce sujet (Lovley 2006a; Lovley 2006c; Lovley 2006b; Rabaey et al. 2007; Schröder 2007). Dans les PACMs, la source d'énergie est la matière organique dégradable. En effet, les carburants organiques, seuls, ne peuvent être oxydés électrochimiquement qu'à des potentiels très élevés, contrairement à l'hydrogène, mais constituent de remarquables réservoirs d'électrons (par exemple au cours de son oxydation le glucose libère 24 électrons et l'acétate 8 électrons). Ce sont les bactéries qui permettent d'oxyder la matière organique à des potentiels plus faibles. Ces bactéries peuvent être introduites dans les PACMs sous forme de souches pures ou bien intégrées à leur environnement (eaux usées, boues activées, sédiments...). Elles catalysent l'extraction des électrons de la matière organique et les transfèrent à divers transporteurs d'électrons, qui eux sont actifs électrochimiquement sur l'électrode de la PACM. Ces transporteurs peuvent appartenir ou non à la cellule bactérienne. Le transfert d'électrons entre la bactérie et l'électrode peut se faire de manière directe, via les composants de la membrane cellulaire, ou de façon indirecte, soit par l'oxydation abiotique de produits issus de la fermentation biologique soit par l'intermédiaire de médiateurs électrochimiques, sécrétés par les bactéries elles-mêmes ou ajoutés à l'électrolyte. Quatre mécanismes peuvent être évoqués pour le transfert électronique bactérie-électrode (Lovley 2006a).

4.2.1. Oxydation à l'anode d'un produit du métabolisme bactérien

Les premières études sur les PACMs présentaient la production d'électricité par l'oxydation, à la surface de l'anode, de produits issus de la fermentation bactérienne. Ces produits tels que l'hydrogène, les alcools, l'ammonium ou encore le sulfure d'hydrogène ou l'ion sulfure, s'oxydent à l'anode (Figure 4).

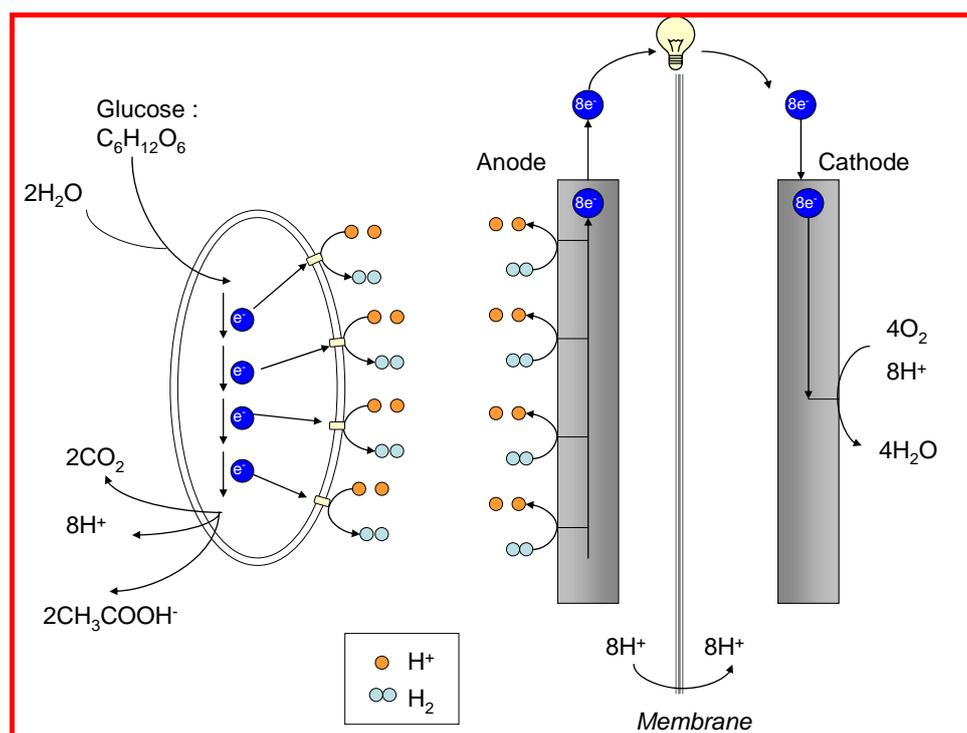


Figure 4 : Représentation d'une pile à combustible microbienne mettant en jeu l'oxydation à l'anode d'un produit du métabolisme bactérien. Par exemple, l'hydrogène est produit par les bactéries à partir du glucose. Cet hydrogène s'oxyde de façon abiotique à l'anode en ions H^+ qui traversent la membrane pour rejoindre le compartiment cathodique. Les électrons sont transmis à l'anode et circulent jusqu'à la cathode où a lieu la réduction de l'oxygène. Ce procédé ne permet de récupérer qu'une partie des électrons disponibles dans le substrat (glucose) et résulte en l'accumulation de produits organiques dans le compartiment anodique. Adapté de (Lovley 2006a).

Le Tableau 2 extrait d'une revue bibliographique regroupe les valeurs de densités de courants obtenues avec de telles PACMs. Cependant, certaines valeurs méritaient un éclaircissement, c'est pourquoi certains articles ont été examinés plus profondément et ont fait l'objet de corrections. Les valeurs vérifiées et le cas échéant modifiées apparaissent en gras dans le tableau.

Chapitre 1 : Des énergies renouvelables à la pile à combustible ... microbienne

Micro-organismes	Substrat	Produit de fermentation	Tension de la PACM ou potentiel appliqué en chronoampérométrie	Courant ou densité de courant de la PACM	Anode	Ref.
<i>Clostridium butyricum</i>	Eaux usées	H ₂	2.2V <i>Tension aux bornes des 5 PACMs en série</i>	0.8 A (2Ω)	Noir de platine, surface d'une anode : 165 cm ²	(Karube et al. 1981)
<i>Clostridium butyricum</i>	Molasses	H ₂	1,4V (à 2Ω)	41A/m² (à 2Ω)	Noir de platine Ni, 85 cm ²	(Suzuki et al. 1980)
<i>Clostridium butyricum</i>	Lactate	H ₂	0,6V (circuit ouvert CO)	1,2A/m ² (court-circuit CC)	Noir de platine, 50 cm ²	(Karube et al. 1977)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Glucose	H ₂	1,04V (CO)	0,6A/m ² (CC)	Acier inoxydable avec du noir de platine, 25 cm ²	(Tanisho et al. 1989)
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	Dextrose	H ₂ S	2,80 V (CO) <i>3 PACMs en série</i>	1A	Graphite imprégné de Co(OH) ₂	(Habermann et al. 1991)
<i>Escherichia coli</i>	Glucose	H ₂	0,20 V vs. Ag/AgCl	15A/m ²	Platine modifié avec du polyaniline	(Schröder et al. 2003)
<i>Escherichia coli</i>	Glucose	H ₂	0,20 V vs. Ag/AgCl	13,5A/m ²	Platine modifié avec du polytetrafluoroaniline (Pt/TFPA)	(Niessen et al. 2004a)
<i>Clostridium butyricum</i>	Amidon	H ₂	0,20 V vs. Ag/AgCl	13A/m ²	Pt/TFPA	(Niessen et al. 2004b)
<i>Clostridium beijerinckii</i>	Glucose			13,3A/m ²		

Tableau 2 : Tableau récapitulatif des densités de courant obtenues dans des piles à combustible microbiennes mettant en jeu l'oxydation à l'anode d'un produit du métabolisme bactérien du type H₂ ou H₂S. Inspiré de (Katz et al. 2003a) puis complété. Les valeurs en gras ont été vérifiées et recalculées.

L'utilisation de l'hydrogène produit par les bactéries a été mis au point pour la première fois dans les années soixante (Del Duca et al. 1963), mais les courants obtenus restaient faibles. Le but des études menées dans les années 70-80 a été d'augmenter l'échelle des pilotes, notamment par la mise en séries de plusieurs cellules, en vue d'une production d'énergie plus importante. Prenons l'exemple de l'équipe de Karube et al.. Leur installation met en jeu un réacteur de 5 L dans lequel 1kg de bactéries immobilisées sur un gel d'agar est introduit. L'hydrogène produit par les bactéries est stocké dans un réservoir puis envoyé vers un 'stack' de PACMs, chacune constituée d'un compartiment anodique et cathodique de 14,5 cm de diamètre (Suzuki et al. 1980). Contrairement aux études actuelles, l'effort n'était pas mis sur l'optimisation des matériaux d'électrodes. A cause de la « susceptibilité » des électrodes de platine à l'empoisonnement et la désactivation, les densités de puissances présentées restent faibles (Schröder 2007).

De nos jours, l'équipe de Niessen utilise des souches de *Clostridia* (*C. beijerinckii*, *C. butyricum*) ou d'autres bactéries fermentaires (*E. coli* K12, ...) pour produire de l'hydrogène qui réagit électrochimiquement sur l'anode (Niessen et al. 2004a; Niessen et al. 2004b), (Niessen et al. 2006). Ces études indiquent de très hautes densités de courant allant jusqu'à 30A/m² (à +0,20 V vs. Ag/AgCl) avec des sols (terreau de jardinage et engrais à base de fumier et de feuilles) soumis à un traitement thermique et des anodes en carbure de tungstène. L'accent est mis sur la recherche de matériaux d'anode et de cathode toujours plus performants. En combinant une anode en carbure de tungstène et une cathode à base de phtalocyanine de Fe(III) pyrolysée (pyr-FePc), les puissances obtenues s'élèvent à 5,85W/m² pour une densité de courant de 16A/m². Ces valeurs sont des densités de courant et de puissance les plus hautes reportés à l'heure actuelle dans le domaine des PACMs.

Des composés, autres que l'hydrogène, sont aussi exploités dans les PACMs. Par exemple les bactéries sulfato-réductrices, présentes dans les sédiments marins réduisent le sulfate en HS⁻ ou S²⁻(selon le pH) qui réagit directement à l'anode en s'oxydant en S⁰ (Ryckelincx et al. 2005), (Lovley 2006a) (Reimers et al. 2006).

4.2.2. Transfert électronique par médiateurs électrochimiques artificiels

Certaines bactéries non fermentaires peuvent utiliser l'électrode pour réaliser la conversion voulue mais nécessite l'utilisation de médiateurs pour le transfert électronique. Les médiateurs électrochimiques sont des molécules qui peuvent s'oxyder puis se réduire et se recycler ainsi de manières successives. Sous leur forme oxydée, ils sont capables de traverser la membrane cellulaire, d'accepter des électrons d'un ou plusieurs porteurs d'électrons à l'intérieur de la cellule puis de sortir de cette dernière sous forme réduite pour s'oxyder et transférer des électrons à l'anode (Shukla et al. 2004) (Figure 5).

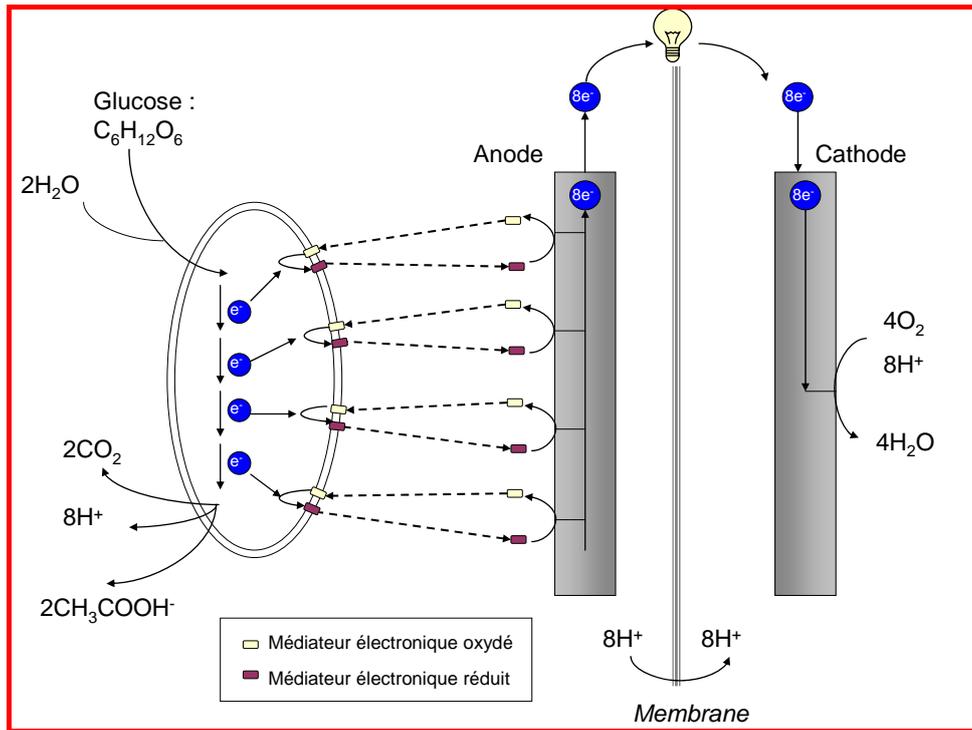


Figure 5: Représentation d'une pile à combustible microbienne mettant en jeu des médiateurs électrochimiques artificiels. Un médiateur électrochimique accepte les électrons de composants réduits de la cellule et s'oxyde de façon abiotique à l'anode à laquelle il transmet les électrons. Le médiateur effectue plusieurs cycles successifs de réduction-oxydation. Dans la plupart des cas, les cellules qui utilisent des médiateurs électrochimiques n'oxydent pas le substrat (glucose) complètement en CO_2 . Adapté de (Lovley 2006a).

Le Tableau 3 donne quelques exemples de PACMs qui utilisent des médiateurs électrochimiques et les valeurs de densités de courant obtenues. Comme pour le Tableau 2 certaines valeurs n'ont pas pu être vérifiées, cependant elles donnent une information sur le type de système mis en place.

Les médiateurs électrochimiques sont souvent utilisés avec les bactéries des espèces *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, *Protens* et des *Bacillus*, qui sont incapables de transférer les électrons provenant de leur métabolisme interne à l'extérieur de leur cellule. Les médiateurs les plus utilisés sont la thionine, le rouge neutre, le 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone (HNQ), différentes sortes de phénazines, etc. De nombreux inconvénients sont à noter quant à l'utilisation de ces médiateurs. Tout d'abord, il n'a pas été démontré que les micro-organismes étaient capables de maintenir leur croissance en présence de ces médiateurs électrochimiques. Ceci est important, lors d'utilisations à long terme, les micro-organismes qui catalysent l'oxydation de la matière organique ont besoin d'énergie pour leur entretien et leur croissance. D'autre part, les applications des PACMs se font souvent en continu, et nécessitent un renouvellement permanent ou discontinu de médiateurs qui augmenterait le coût d'utilisation de la PACM. Enfin, ces médiateurs électrochimiques sont souvent toxiques pour les humains et ne peuvent être rejetés dans l'environnement sans traitement.

Chapitre 1 : Des énergies renouvelables à la pile à combustible ... microbienne

Micro-organismes	Substrat	Médiateur	Tension de la PACM	Courant ou densité de courant	Anode	Ref.
<i>Pseudomonas methanica</i>	CH ₄	1-Naphthol-2-sulfonate indo-2,6-dichrophenol	5-6 (CO) 0,35 V	2,8.10 ⁻² A/m ² (à 10kΩ)	Noir de platine, 12,6cm ²	(Allen 1966)
<i>Escherichia coli</i>	Glucose	Bleu de méthylène	0,63V (CO)	-	Platine, 390cm² 193cm²	(Davis et al. 1962)
<i>Proteus vulgaris, Bacillus subtilis, Escherichia coli</i>	Glucose	Thionine	0,64V (CO) 0,45V (à 560Ω)	0,8 .10⁻³ A (à 560Ω) soit 1.10⁻²A/m²	Carbone vitreux réticulé, 800cm²	(Delaney et al. 1984)
<i>Proteus vulgaris</i>	Glucose	Thionine	0,35 V (à 100Ω)	3,5.10 ⁻³ A (à 100Ω) 4,4.10 ⁻² A/m ²	Carbone vitreux réticulé, 800cm ²	(Thurston et al. 1985)
<i>Proteus vulgaris</i>	Glucose	Thionine	0,30V (250Ω)	1,2.10⁻³ A 15A/m²	Papier tissé de carbone ou Carbone vitreux réticulé (0,78cm²)	(Bennetto et al. 1987)
<i>Proteus vulgaris</i>	Sucrose	Thionine	0,35 V (à 100Ω)	3,5.10 ⁻³ A (à 100Ω)	Carbone	(Bennetto et al. 1985)
<i>Escherichia coli</i>	Glucose	Thionine	0,390 V (à 560Ω)	0,7.10 ⁻³ A (à 560Ω)	-	(Lithgow et al. 1986)
<i>Lactobacillus plantarum, Streptococcus lactis</i>	Glucose	Fe(III)EDTA	0,20V (CO) 0,05V	9.10 ⁻⁵ A (à 560Ω)	-	(Vega et al. 1987)
<i>Erwinia dissolvens</i>			0,50V (CO) 0,39V	7.10 ⁻⁴ A (à 560Ω)	-	
<i>Proteus vulgaris</i>	Glucose	2-Hydroxy-1,4-naphtaquinone	0,75V (CO) 0,40V	4,5.10 ⁻⁴ A (à 1kΩ)	Feutre de graphite, 1g (0,47m ² g ⁻¹)	(Park et al. 1997)
<i>Escherichia coli</i>	Acétate	Rouge neutre	0,25V (CO)	1,4.10 ⁻² A/m ² (CC)	Graphite, 100cm ²	
<i>Escherichia coli</i>	Glucose	Rouge neutre	0,62V (120Ω)	4,8 .10⁻³ A	Feutre de graphite, 12g (0,47m²g⁻¹)	(Park et al. 2000b)
<i>Escherichia coli</i>	Glucose	2-Hydroxy-1,4-naphtaquinone	0,53V (à 10kΩ)	1,8 A/m ² (CC)	Carbone graphite, 12,5cm ²	(Park et al. 2000a)
<i>Culture mixte</i>	Lactate	Rouge neutre (lié de manière covalente)	0,58V	11mA 1,37A/m²	Graphite tissé (80cm² surface géométrique)	(Park et al. 2003)
<i>Escherichia coli</i>			0,35	3,3mA 0,41A/m²		

Tableau 3 : Tableau récapitulatif des densités de courant obtenues dans des piles à combustible microbiennes mettant en jeu des médiateurs électrochimiques au cours de l'oxydation de la matière organique (Katz et al. 2003a). Les valeurs en gras ont été vérifiées et recalculées.

L'objectif des premières études (dans les années 60-70) n'était pas encore d'optimiser la production de courant mais bien de comprendre comment l'on pouvait obtenir de l'énergie à partir de bactéries : « *Can microbes which ordinarily oxidize hydrocarbons release measurable quantities of electrical energy ?* » (Davis et al. 1962).

Par la suite, vers les années 2000, les auteurs s'intéressent aux matériaux d'électrodes. Afin d'optimiser les performances du système, des méthodes d'immobilisation de médiateurs électrochimiques sont mises en œuvre directement sur l'électrode. Par exemple, Park et al. (Park et al. 2003) liaient de manière covalente du rouge neutre sur une anode en graphite tissé, et mélangeaient du Fe^{3+} avec de la poudre de graphite pour former la cathode. Ils ont ainsi pu atteindre des puissances de l'ordre de $0,8\text{W}/\text{m}^2$.

Les deux précédents modes de transfert ont été découverts très tôt et mis en œuvre entre les années 60 et 80. Les PACMs utilisant ces modes de transfert exigeaient souvent les mêmes catalyseurs coûteux que les piles à combustible classiques (Tableau 2 et Tableau 3). Il est intéressant de noter que les progrès en terme de densité de courant ont eu lieu grâce au perfectionnement des matériaux d'électrodes. Depuis peu, d'importantes densités de courant ($30\text{A}/\text{m}^2$) ont été obtenues, par l'oxydation d' H_2 fermentaire, grâce à l'utilisation de carbure de tungstène en tant qu'anode (Rosenbaum et al. 2006). De même, Park et al. (Park et al. 2003) ont réussi à atteindre des densités de courant de l'ordre de l'ampère par mètre en carré, en immobilisant les médiateurs électrochimiques sur l'électrode.

Depuis le début du XXI^{ème} siècle, de nouveaux modes de transfert électronique ont été découverts mettant en jeu le même phénomène : le transfert électronique via un composé biologique à l'anode. Ce composé peut être excrété par la bactérie (médiateurs biologiques) ou faire partie intégrante de la bactérie. Dans ce dernier cas, ce peut être des cytochromes ou protéines qui sont présents sur la membrane extérieure de la cellule ou encore des pilis conducteurs. Comme montré sur la Figure 6, le nombre de publications scientifiques a nettement augmenté depuis 2002. Les articles de vulgarisation et les *news* foisonnent, des exemples d'articles de presse sont repris en annexe 3. Les puissances délivrées ne cessent d'augmenter sous l'action parallèle des études en génétique sur les micro-organismes et de l'ingénierie sur les matériaux d'électrodes et les systèmes de pile (traités dans les paragraphes 4.3 et 4.4). La Figure 7, qui reporte l'évolution des puissances maximales relevées dans la bibliographie, confirme la rupture survenue au début du XXI^{ème} siècle.

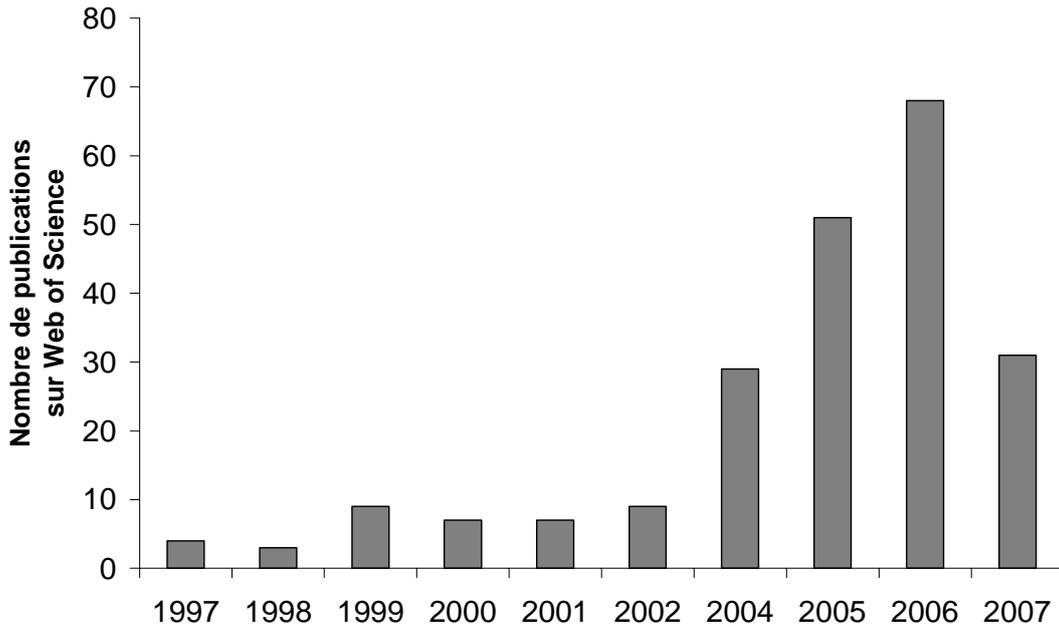


Figure 6 : Évolution du nombre d'articles traitant de pile à combustible microbienne sur Web of Science⁵

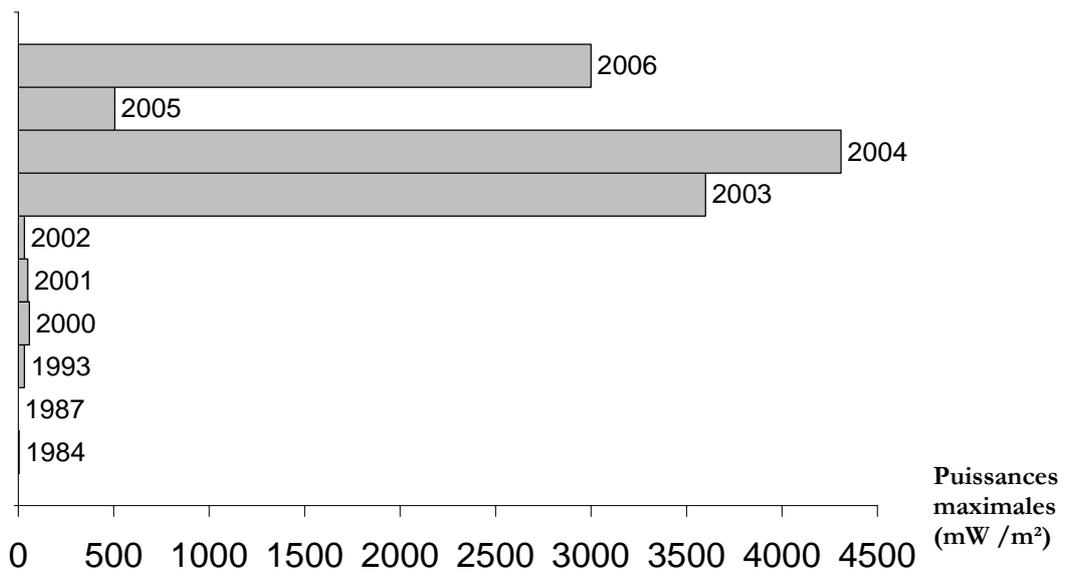


Figure 7: Évolution des puissances maximales délivrées par les piles à combustible microbiennes (mW/m²) (m² de surface géométrique d'électrode)

4.2.3. *Bactéries qui produisent leurs propres médiateurs*

Les transferts d'électrons sont essentiels au métabolisme. Que les micro-organismes soient autotrophes ou hétérotrophes, chaque cellule doit résoudre le problème de la production d'énergie afin de survivre (Hernandez et al. 2001). Au cours du transfert électronique extracellulaire chez les bactéries qui respirent les minerais insolubles, les médiateurs produits par

⁵ <http://portal.isiknowledge.com/portal.cgi>

les bactéries ont une grande importance. (Newman et al. 2000; Nevin et al. 2002). Le mécanisme de transfert électronique reste identique à celui qui utilise des médiateurs artificiels (Figure 5). Certains micro-organismes, tels que des espèces de *Pseudomonas* (Rabaey et al. 2005a), *Shewanella putrefaciens* (Kim et al. 1999; Newman et al. 2000; Kim et al. 2002) ou *Geothrix fermentans* (Bond et al. 2005), sont capables de produire eux-mêmes des médiateurs électrochimiques afin d'augmenter le transfert électronique extracellulaire (Hernandez et al. 2004). La synthèse biologique de médiateurs électrochimiques est coûteuse en énergie pour les micro-organismes, c'est pourquoi le médiateur doit être utilisé plusieurs fois pour que les bactéries récupèrent leur « investissement » énergétique. Cette stratégie a déjà été observée au sein de PACMs. La bactérie *Pseudomonas aeruginosa* produit des phénazines qui augmentent le transfert électronique à l'électrode (puissance obtenue de $116\mu\text{W}/\text{m}^2$) (Rabaey et al. 2004). Au contraire, des souches mutantes de *Pseudomonas aeruginosa*, ne pouvant synthétiser des médiateurs électrochimiques ont permis d'atteindre seulement $6\mu\text{W}/\text{m}^2$ soit 5% de la puissance obtenue avec la souche non déficiente (Rabaey et al. 2005a).

De telles bactéries dans des PACMs en mode continu ne seraient pas compétitives car le médiateur serait rapidement rejeté, ce qui affecterait les performances de la PACM. Par exemple, en renouvelant le milieu de culture d'une PACM utilisant une bactérie de type *Geothrix*, la puissance produite a chuté de 50% (Bond et al. 2005) montrant l'importance de ces médiateurs présents en solution. De plus, les bactéries synthétisant leurs propres médiateurs n'oxydent que partiellement les substrats organiques. Ainsi, en anaérobiose, *Shewanella putrefaciens* ne peut oxyder que partiellement certains substrats tels que le lactate, le pyruvate et l'acétate, même lorsqu'une électrode joue le rôle d'accepteur d'électrons (puissance obtenue autour de $0,6\text{mW}/\text{m}^2$) (Kim et al. 2002).

4.2.4. Transfert direct

L'élément clé dans le transfert direct est la capacité des bactéries à basculer d'un accepteur d'électrons soluble (oxygène, fumarate...) ou donneur (hydrogène, acétate...) à un accepteur ou donneur d'électrons insoluble, comme une électrode de pile à combustible (Figure 8). Cette découverte a été faite très récemment, en 2002 (Bond et al. 2002; Tender et al. 2002).

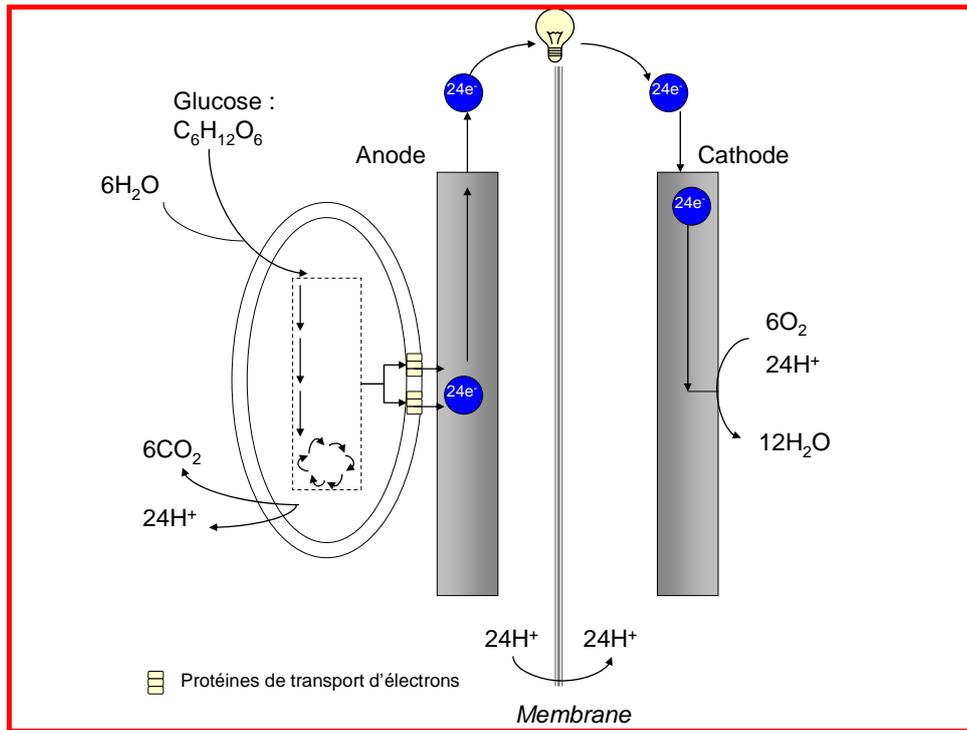


Figure 8 : Représentation d'une pile à combustible microbienne mettant en jeu des bactéries capables de transférer directement leurs électrons à une électrode. Le glucose est assimilé dans la cellule où il est oxydé en dioxyde de carbone via des voies classiques du métabolisme tel que le cycle d'acide tricarboxylique. Les électrons issus de cette oxydation sont transférés à travers la membrane cellulaire par des protéines transporteuses d'électrons tels que des cytochromes. Dans ce système le substrat (glucose) est totalement oxydé en CO_2 . Adapté de (Lovley 2006a).

Le Tableau 4 regroupe les résultats obtenus avec des souches pures procédant par transfert direct. Dans la bibliographie, certaines bactéries sont décrites comme pouvant transférer les électrons directement à une électrode : *Geobacter sulfurreducens* (Bond et al. 2003), *Geobacter metallireducens*, *Rhodospirillum rubrum* (Chaudhuri et al. 2003), *Desulfuromonas acetoxidans* (Bond et al. 2002), *Desulfobulbus propionicus* (Holmes et al. 2004a), *Enterococcus gallinarum* (Kim et al. 2005). Cependant, le transfert direct d'électrons de la bactérie à l'électrode est controversé pour les bactéries suivantes : *Aeromonas hydrophila* (Pham et al. 2003), *Clostridium butyricum* (Park et al. 2001) *Shewanella putrefaciens* (Kim et al. 1999), *Shewanella oneidensis* (Ringeisen et al. 2006). Il semble que le courant obtenu soit une combinaison entre un transfert direct entre la bactérie et l'électrode et un transfert indirect via des médiateurs sécrétés par la bactérie. Moins de 0,04% des électrons disponibles dans le substrat sont transformés en électricité par ces micro-organismes (Lovley 2006a). Ceci prouve que le transfert d'électrons s'effectue tout de même, mais dans des proportions négligeables par rapport à la quantité d'électrons disponibles dans le substrat. Ceci permet de conclure que des médiateurs sont impliqués dans le transfert d'électrons.

Chapitre 1 : Des énergies renouvelables à la pile à combustible ... microbienne

Micro-organismes	Anode	Taille (cm ²)	Cathode ou contre-électrode/milieu	Substrat	Fonctionnement pile	Résistance (Ohm)	Densité de courant (mA/m ²)	Tension ou potentiel imposé (V)	Densité de puissance maximum (mW/m ²)	Références
<i>Geobacter sulfurreducens</i>	Graphite	19,4	graphite/ tampon Tris HCl	Acétate	Non	500	163 à 1143	0,20 V vs. Ag/AgCl	15	(Bond et al. 2003)
		61,2			Oui		74			
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	Feutre de graphite	200	Feutre de graphite / Tampon Tris	Glucose	Oui	1000	31	0,27 V	8	(Chaudhuri et al. 2003)
	Barreau de graphite	65	Barreau de graphite/ Tampon Tris				28	0,62 V	17	
	Mousse de graphite	61	Mousse de graphite/ Tampon Tris				74	0,45 V	33	
<i>Geobacter metallireducens</i> <i>Desulfuromonas acetoxidans</i>	Graphite	25,4	Graphite	Benzoate	Non	500	250	0,20 V	13	(Bond et al. 2002)
	Graphite		Graphite / Tampon marin	Acétate	Oui		102	0,13 V		
<i>Shewanella putrefaciens</i>	Graphite	25			Oui	1000	16		6,4.10 ⁻¹	(Kim et al. 2002)
<i>Shewanella putrefaciens</i>	Graphite	1400	Pt Cathode: 140cm ²	Lactate	Non		2,2.10 ⁻²	1V vs Ag/AgCl		(Kim et al. 1999)
<i>Shewanella putrefaciens</i>	Graphite tissé	12700	Graphite cathode Fe ³⁺ /50cm ²	Lactate	Oui		1,4.10 ⁻¹		2.10 ⁻²	(Park et al. 2002)
	Graphite tissé avec du rouge neutre - liée de manière covalente	12700					0,8		9,1	
	Mn ⁴⁺ graphite	80					153		10,2	
<i>Geopsychrobacter electrodiphilus A1T</i> <i>Geopsychrobacter electrodiphilus A2</i>	Graphite	19,35		Fumarate	Non		88,9 1214,3.10 ³	0,52 V vs. ESH		(Holmes et al. 2004c)

Tableau 4 : Ce tableau regroupe les différentes caractéristiques des PACMs mettant en jeu des bactéries qui transfèrent directement les électrons à l'électrode.

Suite à la découverte du transfert électronique direct entre la bactérie et l'électrode en 2002, les densités de courants ont augmenté de manière significative. Dans la bibliographie sur le transfert direct, la densité de courant maximale obtenue en imposant un potentiel de 0,20V vs Ag/AgCl sur l'anode, s'élève à 1 214,3A/m² (Holmes et al. 2004c) avec *Geopsychrobacter electrodiphilus* A2. Cependant, ces densités de courant sont exceptionnelles et peuvent même apparaître surprenantes, aucune recherche supplémentaire sur cette souche n'ayant été effectuée depuis.

Plus généralement, des valeurs de l'ordre de 1A/m² sont obtenues. Des densités de courant de 0,10A/m² ont été obtenues avec un biofilm de *Rhodospirillum rubrum* (Chaudhuri et al. 2003), 0,25A/m² avec *Geobacter metallireducens*, 0,15A/m² avec *Desulfuromonas acetoxidans* (Bond et al. 2002) et 1,14A./m² avec *G. sulfurreducens* (Bond et al. 2003).

Récemment, de nombreuses recherches s'intéressent à la compréhension du mécanisme de transfert direct, notamment sur la souche *G. sulfurreducens*. La compréhension des mécanismes de transfert électronique entre les bactéries adhérentes et l'électrode s'est faite peu à peu, grâce à des études préliminaires réalisées sur les mécanismes de transfert électronique qui rentrent en jeu au cours de la réduction d'oxydes de métal comme les oxydes de fer ou de manganèse (Lovley et al. 1987; Myers et al. 1988; Lovley et al. 1996). En effet, ces oxydes étant insolubles, ils ne peuvent pénétrer dans la cellule, le transfert électronique, de la même façon qu'en présence d'une électrode, est donc extracellulaire. Dans ce cas précis de transfert électronique, l'implication de cytochromes membranaires de type *c* et de pili conducteurs a été prouvée (Holmes et al. 2006). De même, la présence de pili conducteurs a été mise en évidence chez *Shewanella oneidensis* MR-1, *Synechocystis* PCC6803, et *Pelotomaculum thermopropionicum*. Les pilis chez ces deux dernières souches révèlent que les appendices conducteurs n'existent pas uniquement chez les bactéries metallo-réductrices et en conséquence pourraient être une stratégie commune de transfert électronique (Gorby et al. 2006). Le mécanisme de transfert direct sera étudié pour le cas particulier de *G. sulfurreducens* dans le chapitre 3.

A l'heure actuelle ce sont les deux derniers types de transferts électroniques entre les bactéries et une électrode, comme unique accepteur (ou donneur) d'électrons, qui sont exploités en majorité dans les PACMs.

Les paragraphes qui suivent présentent les différents types de PACMs rencontrés dans la littérature : les designs, les types d'électrodes et pour quelles applications.

4.3. Design

Il existe deux types de PACMs : les PACMs à deux compartiments, et les PACMs à un seul compartiment, appelées aussi PACMs à cathode à air. Chaque type peut se présenter sous différentes formes, ou *designs*. Selon les systèmes les PACMs fonctionnent en *batch* ou en continu. La plupart des PACMs rencontrées dans la bibliographie sont composées d'un compartiment anodique et d'un compartiment cathodique tous deux séparés par une membrane échangeuse de protons (PEM). Les PACMs présentées ici ne mettent en jeu des micro-organismes uniquement du côté anodique.

Il est aussi possible de générer du courant en plaçant les électrodes directement dans le milieu naturel ou dans des conditions similaires à celui-ci. C'est ainsi que des PACMs en milieu marin ont été développées : une anode dans les sédiments marins (en présence de matière organique) et une cathode en eau de mer aérée (en présence d'oxygène). Cette approche sera développée dans le chapitre 5.

4.3.1. PACMs à deux compartiments

Les PACMs constituées de deux compartiments fonctionnent pour la plupart en mode *batch*. Elles sont actuellement utilisées en laboratoire. Elles sont équipées d'un pont salin ou plus communément d'une membrane échangeuse de cations telle la membrane Nafion® (Dupont de Nemours Figure 2), ou Ultrex® (Membrane International Inc.). Cette membrane possède un rôle identique à celui qu'elle joue dans une PAC à hydrogène, c'est-à-dire assurer le transfert ionique (passage des protons du compartiment anodique au cathodique) tout en évitant le mélange des différents constituants (oxygène, substrat...) d'un compartiment à l'autre.

Ces PACMs à deux compartiments se retrouvent sous différentes formes. La première consiste en deux bouteilles reliées par un tube. Au milieu de ce tube une membrane sépare les deux compartiments (Figure 9).

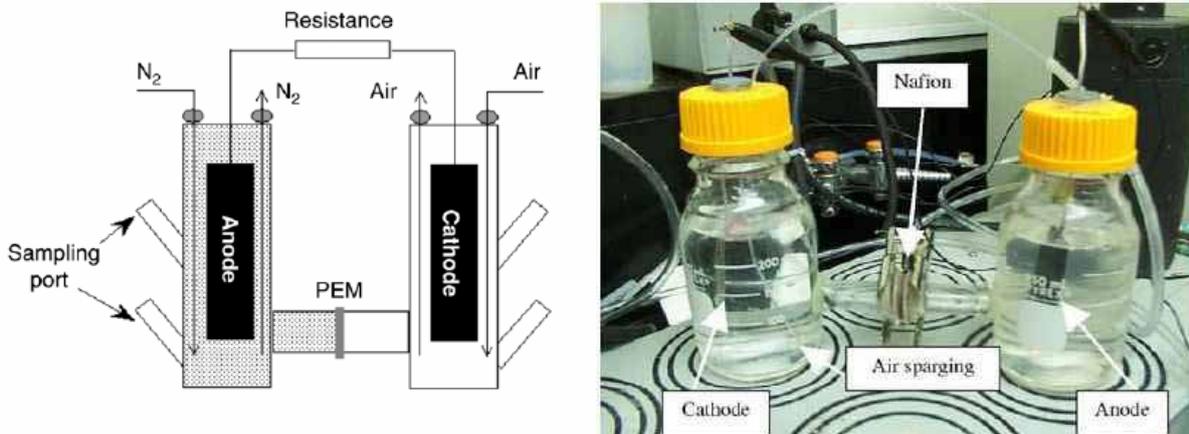


Figure 9 : PACM à deux compartiments en forme de 'H' (Logan et al. 2005).

Ces types de PACMs fonctionnent en solution aqueuse, dans les deux compartiments. Elles génèrent des densités de puissances faibles, car limitées par la résistance interne élevée et des pertes aux électrodes. L'utilisation de ferricyanure ($K_3Fe(CN)_6^{3-}$) dans le compartiment cathodique permet d'obtenir des puissances entre 1,5 et 1,8 fois supérieures à celles d'une cathode en platine sur laquelle se déroule la réduction de l'oxygène dissous ($[O_2]_{max}$ dissous dans l'eau = 0,24mM). Par exemple, une PACM comme celle présentée en Figure 9, constituée d'une cathode en platine, avec une PEM de 3,5 cm² et une résistance externe de 1000Ω, a fourni une puissance de 0,1 mW avec de l'oxygène dissous contre 0,17 mW avec du ferricyanure dans le compartiment cathodique (Oh et al. 2006). Comme l'illustre la Figure 10, la réduction du ferricyanure est une réaction de cinétique rapide, ainsi le ferricyanure permet de créer une surtension faible tout en ayant un potentiel d'oxydo-réduction élevé (+0,36 V vs. ESH). Cependant, la réduction du ferricyanure forme du ferrocyanure, très difficile à réoxyder par l'oxygène. Il est donc nécessaire de renouveler l'ajout de ferricyanure régulièrement et d'éliminer le ferrocyanure. Ces produits sont toxiques pour l'environnement. Leur utilisation ne constitue qu'une solution de laboratoire.

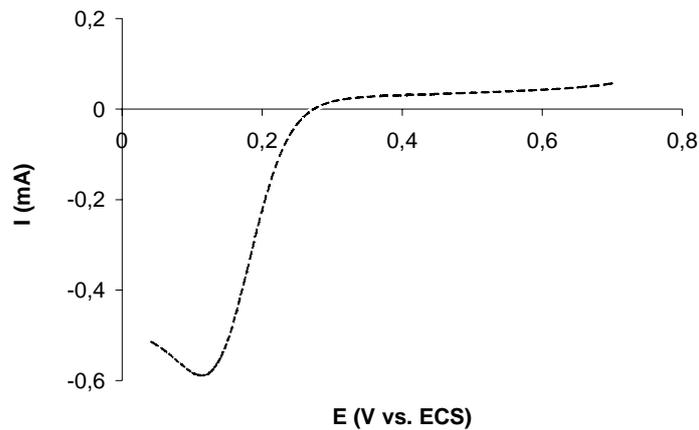


Figure 10 : Réduction du ferricyanure de potassium sur une électrode en platine vitesse de balayage : 5mV/s, 10mM de ferricyanure, pH=7, sous bullage N₂.

Un second type de PACM utilisé dans l'équipe de B. Logan est appelé PACM plate (*Flat Plate Microbial Fuel Cell*: FPMFC)(Min et al. 2004). Cette configuration est inspirée des conceptions des PAC à hydrogène (Figure 11). La cathode en tissu de carbone qui a été « *hot pressed* » à la membrane Nafion® est mise en contact d'une feuille de papier carbone qui sert d'anode, et forme ainsi un assemblage électrode/membrane. Le principal avantage réside dans la grande surface d'électrode disponible par rapport au volume. De plus, comme les électrodes sont toutes deux liées à la membrane, la résistance au transfert de matière est la plus faible possible. Cette configuration autorise un assemblage en série, ce module « filtre-pressé » permet d'augmenter la

tension aux bornes de la pile. Le compartiment anodique peut être alimenté en eaux usées ou en matières organiques et de l'air sec peut traverser le compartiment cathodique. Les deux compartiments fonctionnent en mode continu. En effet, afin de ne pas être limité par le côté cathodique, qui ne contient pas de micro-organismes et de se concentrer sur le compartiment anodique, qui lui, fait intervenir les bactéries, il est recommandé de placer la cathode en milieu gazeux. L'utilisation d'air sec est avantageuse puisque la concentration d'oxygène est de 1M en milieu gazeux contre 0,24mM en milieu aqueux.

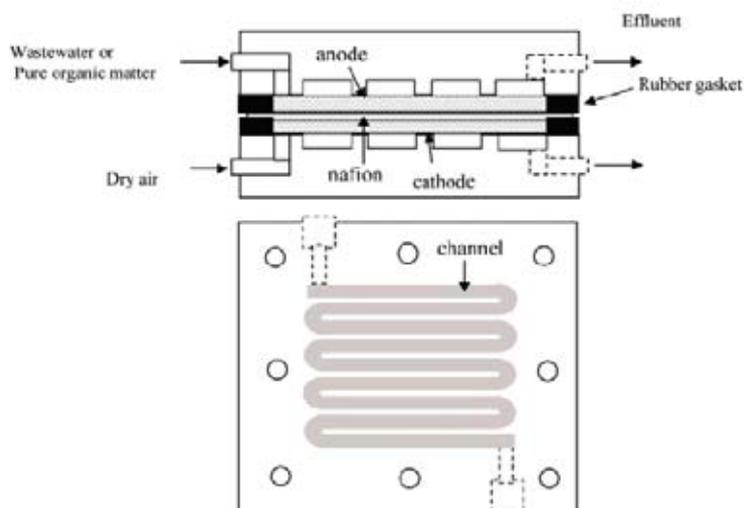


Figure 11: PACM « plate » inspirée des PAC à hydrogène. Les électrodes sont «pressées» contre la membrane et forment ainsi un assemblage électrode/membrane. D'après (Du et al. 2007).

Il existe aussi des systèmes de PACM à flux ascendants (Figure 12). La PACM est de type tubulaire. Dans la première configuration, l'anode et la cathode sont placées de part et d'autre d'une membrane inclinée de 15° afin d'éviter l'accumulation de bulles (He et al. 2005). Dans un système plus récent, le compartiment cathodique est en forme de « U », directement inséré dans le compartiment anodique (He et al. 2006b). Ce dernier système offre une résistance interne faible (4Ω) puisque l'anode et la cathode sont très proches de la membrane. Les compartiments anodiques et cathodiques sont constitués de carbone vitreux réticulé (4 à 8 pores par cm), dans le cas décrit en Figure 12-A, et de granules de carbone « activé » dans le cas décrit en Figure 12-B. Ces deux designs offrent ainsi une grande surface d'électrodes.

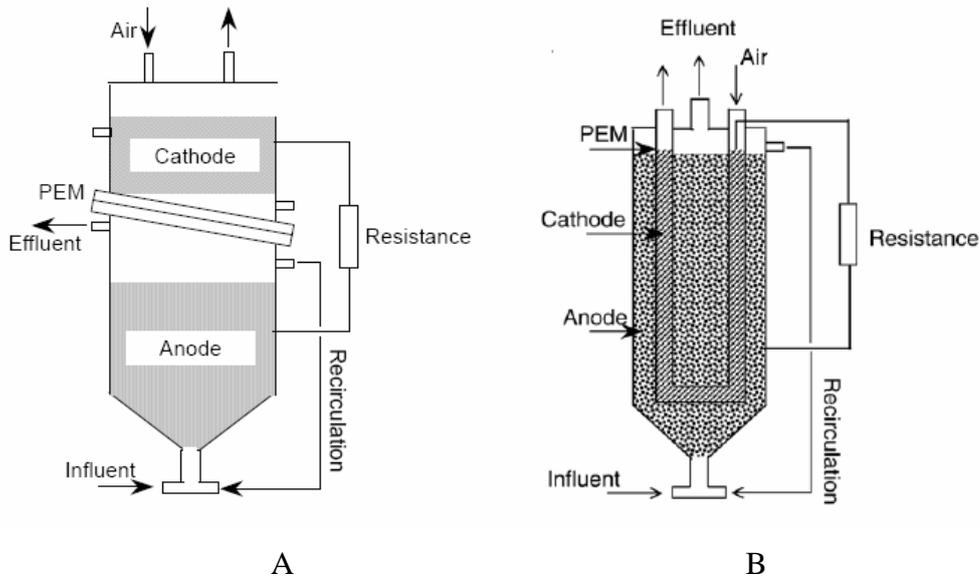


Figure 12 : PACM à deux compartiments à flux ascendant. A (He et al. 2005) B.(He et al. 2006b). D'après (Du et al. 2007).

Ces systèmes sont adéquats pour le traitement d'eaux usées car ils sont plus facilement extrapolables à grande échelle. Toutefois, la recirculation du fluide utilisée dans les deux cas, entraîne des dépenses énergétiques supérieures aux puissances obtenues. En conséquence, la fonction première de tels types de système est bien le traitement des eaux plutôt que la production de courant.

4.3.2. PACMs à cathode à air.

Les PACMs à deux compartiments possèdent des designs complexes et mis à part le système à flux ascendants, sont difficilement extrapolables à grande échelle bien qu'ils fonctionnent en mode *batch* ou continu.

Les PACMs ne possédant qu'un seul compartiment possèdent généralement des configurations plus simples. Typiquement, elles ne sont constituées que d'un compartiment anodique, et ne nécessitent pas d'aération au niveau de la cathode, entraînant ainsi des dépenses plus faibles que les PACMs à deux compartiments. La cathode est directement en contact avec l'air. Dans sa configuration la plus simple, l'anode et la cathode sont placées aux deux extrémités d'un tube, ce dernier constitue le compartiment anodique (Figure 13-A) (Liu et al. 2004). Ce système de laboratoire fonctionne en mode *batch*. L'anode est constituée de papier carbone sans imperméabilisation. La cathode est soit une électrode de carbone assemblée avec une PEM, soit un papier carbone rigide sans PEM. La membrane évite que le compartiment anodique ne fuie, ce qui pourrait « noyer » la cathode, qui serait alors moins efficace. De plus, la PEM empêche l'oxygène de pénétrer du côté anodique. En l'absence de membrane, il a été démontré que la diffusion de l'oxygène du compartiment cathodique vers l'anodique augmentait de 0,05 mg/h

(avec PEM) à 0,187 mg/h (sans PEM) (Liu et al. 2004). En effet, si les bactéries dans le compartiment anodique utilisent l'oxygène au lieu de l'anode, le rendement faradique est diminué. Afin d'augmenter les densités de puissance ou pour assurer un flux continu dans le compartiment anodique, ce type de PACM a été décliné sous différentes formes. La cathode peut se situer par exemple à l'extérieur d'un tube cylindre (Figure 13-B) (Rabaey et al. 2005b). Liu et al. ont mis en place un système où la cathode est placée au centre d'un cylindre en Plexiglas. Huit barreaux de graphite, jouant le rôle d'anode sont placés de manière concentrique autour de la cathode. Une couche de carbone/platine/PEM est fondue sur le tube en plastique afin de former la cathode à air poreuse.

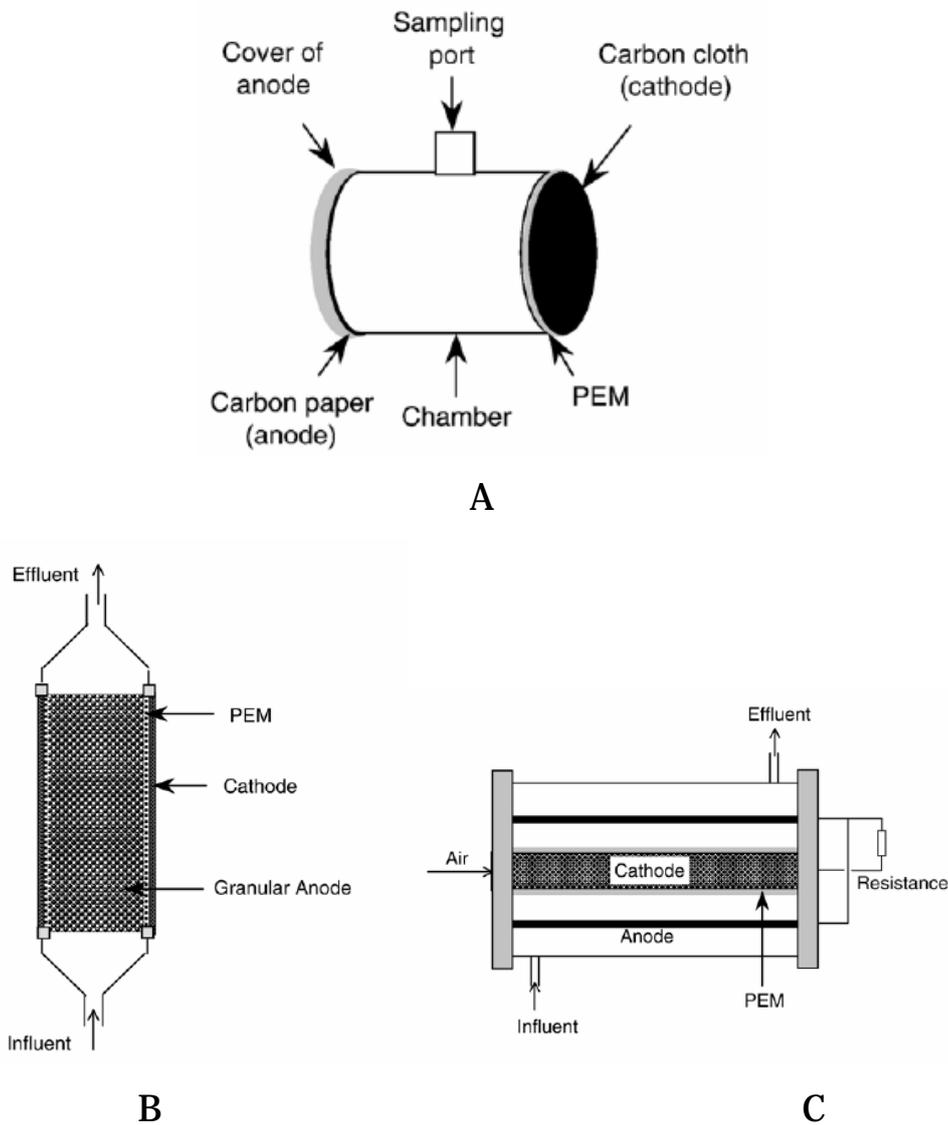


Figure 13 : PACMs constituées d'un seul compartiment avec une cathode à air. A. Configuration la plus simple où l'anode et la cathode sont placées aux extrémités d'un tube. B. PACM où la cathode se situe à l'extérieur d'un tube cylindre. C. PACM où la cathode se situe au centre d'un cylindre. D'après (Du et al. 2007).

Un autre moyen d'accroître les performances est de supprimer toute membrane, qui augmente la résistance interne du système. Toutefois, il vaut veiller à ce que l'oxygène ne diffuse pas trop à l'intérieur du compartiment anodique. Pour cela, Cheng et al. ont mis en place un flux continu d'électrolyte de l'anode vers la cathode (Cheng et al. 2006b). Ce système permet de limiter la diffusion de l'oxygène dans le compartiment anodique et favoriser le transport des protons vers la cathode (Figure 14).

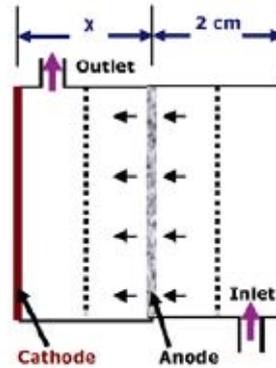


Figure 14 : Représentation d'une PACM constituée d'une anode poreuse et mettant en jeu un flux continu d'électrolyte de l'anode vers la cathode. Les deux électrodes ne sont pas séparées par une membrane. Ce système permet d'accroître les performances et favorise le transport des protons vers la cathode. D'après (Cheng et al. 2006b) .

4.3.3. PACMs en série

Une PACM sous forme *stack* a été mise en œuvre par Aelterman et al. afin d'effectuer des recherches sur les performances obtenues avec des monocellules de PACMs connectées en série ou en parallèle (Aelterman et al. 2006)(Figure 15). Les anodes et cathodes sont toutes deux constituées de granules de carbone. Chaque anode et cathode sont séparées par une membrane Ultrex®. Le raccordement des six unités de PACMs en série et en parallèle a permis d'obtenir des performances plus intéressantes respectivement en terme de tensions de pile (2,02 V sous 228 W/m³) et de courants (255 mA sous 248 W/m³), tout en conservant des puissances élevées. Ce prototype fonctionne en continu et permettrait une augmentation d'échelle aisée. Toutefois, il est dommage de constater que l'électrolyte utilisé du côté cathodique par Aeltermann et al. est de l'hexacyanoferrate, qui pour les mêmes raisons que celles citées en 4.3.1 ne constitue qu'une solution de laboratoire.

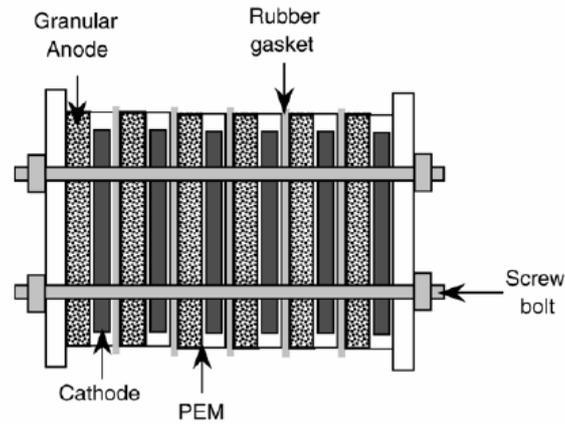


Figure 15 : PACM sous forme de *stack* constituée de six unités individuelles avec des électrodes en granules de graphite.

L'optimisation des PACMs s'est faite sur deux axes : l'aspect biologique avec notamment le transfert direct d'électrons de la bactérie à l'électrode, et l'aspect technologique avec, entre autres, l'optimisation de l'architecture des PACMs comme nous venons de le voir. De nombreuses recherches s'effectuent sur les matériaux d'électrodes, sièges des réactions électrochimiques et supports de développement de l'élément biologique permettant de catalyser de ces réactions.

4.4. Matériaux d'électrodes

4.4.1. Anode

Les matériaux utilisés doivent être stables et surtout biocompatibles. Le cuivre est donc un matériau à proscrire à cause de sa toxicité envers les bactéries. Les anodes actuelles sont principalement à base de carbone, par exemple du graphite ou du carbone vitreux. Il existe diverses formes de graphite : les disques et barreaux sont les plus simples à utiliser et les moins coûteux. Utiliser du feutre à base de graphite permet d'augmenter la surface active de l'électrode (Park et al. 1999; Gil et al. 2003). La fibre, le papier, la mousse et le tissu à base de carbone sont également beaucoup utilisés. Comme montré dans la deuxième ligne du Tableau 4, la densité de courant augmente en fonction du matériau anodique utilisé selon l'ordre : barreau < feutre < mousse de carbone (Chaudhuri et al. 2003). Tout en se servant de matériaux compacts tels que le carbone vitreux, il est possible d'accroître les surfaces actives, en utilisant différentes tailles de pores (par exemple 4 à 8 pores par cm (He et al. 2005)), ou des couches successives de granules de carbone (diamètres entre 1,5 et 5 mm) (Rabaey et al. 2005b). Il faut veiller particulièrement à conserver une grande porosité afin d'assurer le transport et la disponibilité des éléments nutritifs pour les bactéries.

Afin d'accroître les performances de la réaction anodique, des molécules électrocatalytiques sont aussi immobilisées aux matériaux. Ainsi, incorporer Mn(IV) et Fe(III) en les liant au rouge neutre

de manière covalente permet d'augmenter les vitesses de transfert entre les électrons de la bactérie et l'anode (Park et al. 2003). Il faut noter que ces dernières solutions ne peuvent pas être considérées comme mettant en jeu un transfert direct d'électrons entre les bactéries et le matériau d'électrode, car il est nécessaire d'ajouter des médiateurs artificiels aux matériaux. La durée de vie des médiateurs est alors à prendre en compte dans celle des électrodes. L'utilisation de catalyseurs à base de platine/polyaniline permet aussi d'augmenter les performances (Niessen et al. 2004a) (Lowy et al. 2006).

4.4.2. Cathode

Les matériaux de cathode sont eux aussi pour la plupart à base de carbone. Grâce aux propriétés cinétiques avantageuses du ferricyanure ($K_3Fe(CN)_6^{3-}$), ce dernier est souvent utilisé. Toutefois, l'accepteur d'électrons idéal reste l'oxygène du fait de son potentiel d'oxydoréduction très élevé ($E^\circ = +0,818$ V/ESH (Thauer et al. 1977)), de sa gratuité et de sa disponibilité. À cause de la faible cinétique électrochimique de la réaction de réduction de l'oxygène sur le carbone, la présence de catalyseur tel que le platine est nécessaire. Le platine étant coûteux, afin de réduire le coût du système, la charge en platine peut être diminuée jusqu'à $0,1\text{mg}\cdot\text{cm}^{-2}$. En outre, quand la cathode est placée en milieu aqueux (PACM à deux compartiments) le platine est facilement « empoisonné » par les impuretés, du fait de la richesse en minéraux des milieux de culture utilisés. Cette inhibition intervient très rapidement et rend la cathode peu stable dans le temps. Actuellement, des matériaux moins nobles que le platine tel que le fer (II) pyrolytique, ou le cobalt (CoTMPP : cobalt tetramethylphenylporphyrin) sont aussi employés sur la cathode pour la réduction de l'oxygène. Utiliser de tels matériaux à la place du carbone permet de multiplier la densité de puissance entre trois et cinq (Cheng et al. 2006c).

Dans notre équipe de recherche, les études se sont focalisées sur l'acier inoxydable. Il a été prouvé que l'acier inoxydable recouvert d'un biofilm marin permettait de réduire l'oxygène avec des puissances identiques à celles obtenues en présence de platine (Bergel et al. 2005).

4.5. Applications

A court terme, les PACMs pourraient être appliquées au traitement des eaux usées, des déchets ou encore utilisées dans des applications de niche.

4.5.1. Traitement des effluents, des eaux usées

Les eaux usées des industries agro-alimentaires, et les effluents urbains sont des combustibles très avantageux pour les PACMs. En effet, non seulement ils contiennent une grande quantité de matière organique mais également les bactéries nécessaires à leur dégradation. Les eaux usées

peuvent être utilisées comme combustibles, car elles contiennent la matière organique à dégrader (Park et al. 2003; Kim et al. 2004; Liu et al. 2004), ou comme inoculum, car elles renferment des bactéries qui peuvent être utilisées dans les PACMs (Aelterman et al. 2006). Il ne reste alors qu'à ajouter des électrodes...

Aux États-unis, 25 milliards de dollars sont dépensés chaque année pour le traitement des eaux usées. En France, près de 3 milliards d'euros sont investis chaque année pour l'épuration et le traitement des eaux usées. Dans ce contexte, un système de traitement basé sur une PACM, offre des perspectives économiques intéressantes. En effet, il permettrait de traiter les eaux usées tout en produisant de l'électricité et ceci avec un substrat gratuit à haut potentiel énergétique. On estime que les eaux usées contiennent environ dix fois plus d'énergie, sous forme de matière organique, que celle nécessaire à leur traitement (Shizas I. et al. 2004). Actuellement, le procédé de traitement des boues activées aérobies, comprend un bassin d'aération, dans lequel de l'air est injecté de manière à obtenir une teneur en oxygène dissous suffisante pour l'activité biologique aérobie, suivi d'un bassin de décantation secondaire (dit aussi clarificateur). À partir de ce dernier élément, l'eau clarifiée est rejetée (sauf traitement tertiaire) et les boues décantées sont renvoyées en grande partie vers le bassin d'aération, la partie excédentaire étant dirigée vers un circuit ou un stockage spécifique. Les bassins d'aération de la filière actuelle sont consommateurs d'énergie. Ils pourraient être modifiés pour devenir une PACM et ainsi résulter en un système global producteur d'énergie.

Sur ce thème, l'équipe de B. Logan (Penn State University, USA) est pionnière et vise à développer des PACMs à l'échelle industrielle. Selon eux, en considérant les effluents d'une industrie agro-alimentaire (7500 kg/ jour de déchets organiques) la puissance théorique serait égale à 950kW soit 330kW en tenant compte du rendement énergétique de 30% des PACMs (Logan et al. 2006a). Une installation de 350 m³ fournissant une puissance de 1kW/m³ serait donc nécessaire pour assurer les 330kW et coûterait environ 2,6M€. Le coût de l'énergie produite par la PACM s'élèverait donc à environ 0,1€/ kWh soit seulement 1,25 fois plus cher que l'éolien qui à l'heure actuelle coûte environ 0,08€/ kWh. Néanmoins, la puissance de 1kW/m³ n'a pas été atteinte à ce jour et les PACMs nécessitent encore d'importantes améliorations technologiques. Il faut noter que dans le cas de la production électrique grâce au traitement des eaux usées, il est plus intéressant de parler en W/m³ d'eau traitée qu'en W par m² d'électrode. En effet, on s'intéresse à la puissance nécessaire au traitement d'1m³ d'eau usées.

Les principaux enjeux résident dans la résolution des problèmes d'augmentation d'échelle et de matériaux d'électrodes. En effet, aucune étude sur le coût de changement d'échelle et de remplacement des systèmes du procédé de traitement des boues activées n'a encore été réalisée.

4.5.2. Déchets/sols/compost:

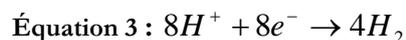
Sur le même principe, certains chercheurs travaillent sur le traitement des déchets de maïs (Logan 2006; Zuo et al. 2006). La production d'électricité grâce à la biomasse extraite du fourrage de maïs a été démontrée en utilisant une PACM à compartiment unique avec une cathode à air. Avec une résistance externe de 250Ω , et des hydrolysats contenant $1000 \text{ mg-DCO}^6/\text{L}$ en tant que solution de PACM à dégrader, des densités de puissance maximales de l'ordre de 370 mW/m^2 ont été atteintes. L'optimisation du matériaux de la cathode sur le côté en contact avec l'air a permis de multiplier les puissances obtenues par 2,2 (810 mW/m^2) (Cheng et al. 2006a). Les performances de la cathode ont été améliorées grâce à la mise en place d'une couche de diffusion à base de PTFE (polytetrafluoroéthylène). L'application successive de couches de diffusion de PTFE augmente le potentiel de la cathode et ce jusqu'à quatre couches. L'addition supplémentaire de couches de PTFE résulte en une baisse de la densité de courant. Ces résultats de laboratoire montrent que des hydrolysats de fourrage de maïs possèdent un excellent potentiel en tant que substrats pour la production d'électricité dans les PACMs.

4.5.3. Production d'hydrogène

Dans le domaine de la production d'hydrogène, B. Logan, par exemple, a proposé un système détourné des PACMs. En appliquant une différence de potentiel supérieure à 250mV aux bornes du réacteur d'électrolyse, de l'hydrogène est formé à la cathode (Liu et al. 2005c) (Figure 16). En théorie, la fermentation du glucose en acétate par les bactéries produit deux moles d'acétate et au maximum 4 moles d'hydrogène (1^{ère} phase : Équation 1), soit en pratique 2 à 3 moles.



Si l'acétate ainsi produit (2 moles d'acétate/mol de glucose) est utilisé par les bactéries dans un compartiment anodique de PACM (2^{ème} phase ; Équation 2), 4 moles supplémentaires d'hydrogène pourraient être produites à la cathode (Équation 3).



En considérant un rendement faradique de transformation de l'acétate en électrons de 78% et un rendement de production d'hydrogène de 92% entre 2 et 3 moles d'hydrogène supplémentaires pourraient ainsi être produites. La combinaison entre la fermentation du glucose et ce système de PACM détournée fournirait alors entre 8 et 9 moles d'hydrogène (3 moles de la fermentation, et deux fois 3 moles par le système d'électrolyse). Ce système permet de dégrader la matière

⁶ Demande Chimique en Oxygène : elle représente le poids d'oxygène nécessaire à la dégradation par voie chimique de la totalité de la matière organique.

organique, et de produire de l'hydrogène. Toutefois, un apport d'énergie extérieur est nécessaire pour imposer un certain potentiel entre les électrodes.

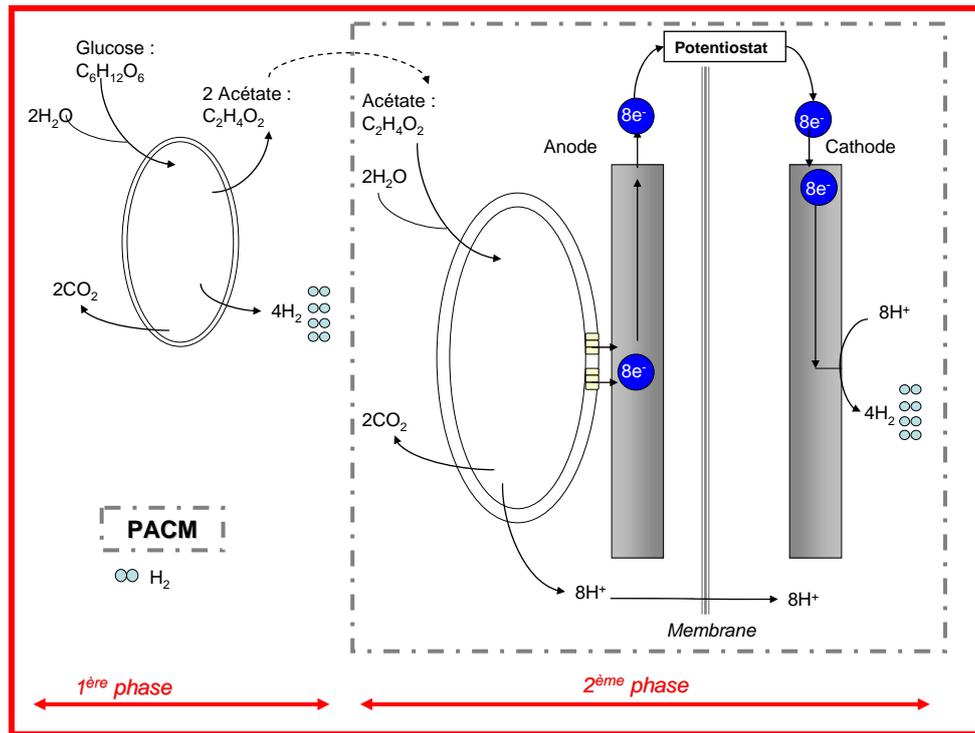


Figure 16 : Schéma du procédé de production d'hydrogène grâce à une PACM détournée, constituée de compartiments séparés par une membrane échangeuse de protons (PEM). L'ensemble est mis sous une tension de 250mV grâce à un générateur de tension.

4.5.4. PACM marine : eau de mer/sédiments

Les PACMs peuvent aussi être utilisées en milieu naturel, comme en mer. Le chapitre 5 est entièrement consacré à ces PACMs marines. Ce type de PACM pourrait alimenter de petites installations électriques comme les balises, bouées, etc.

4.6. Les biocathodes

Afin de développer des PACMs totalement biologiques (compartiment anodique et cathodique) et ainsi diminuer le coût des cathodes, des études ont aussi été faites sur les compartiments cathodiques mettant en jeu des bactéries. Les cathodes sont appelées biocathodes. Ici, les micro-organismes catalysent la réduction d'un composé présent dans le compartiment cathodique. On distingue des biocathodes en milieu aérobie et anaérobie.

4.6.1. Biocathodes en milieu anaérobie

En l'absence d'oxygène, les composés comme le nitrate, le sulfate, le fer, le manganèse, le sélénate, l'arséniate, le fumarate et le dioxyde de carbone peuvent être réduits. Cependant, en

comparant les potentiels d'oxydo-réduction des différents composés, le manganèse, le fer et le nitrate sont les plus avantageux d'un point de vue énergétique (Figure 17).

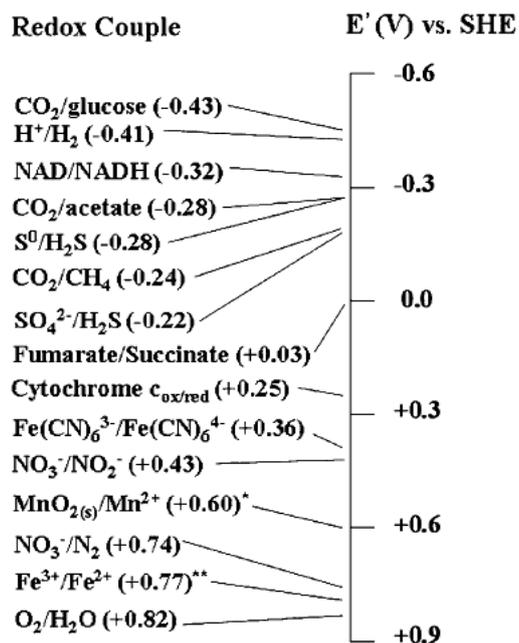


Figure 17 : Tableau des potentiels redox de couple (à pH=7; * à pH=7,2; ** à pH=2). D'après (He et al. 2006a).

Gregory et al. ont étudié la réduction du nitrate par les bactéries présentes dans les sédiments ou encore par la souche *G. metallireducens* et leur capacité à utiliser une électrode comme unique donneur d'électrons (Gregory et al. 2004). Des densités de courant de l'ordre de 0,4A/m² (en valeur absolue) ont été atteintes sous -0,50 V vs. Ag/AgCl. D'autres équipes ont confirmé la réduction de l'azote par les bactéries sur une cathode (Park et al. 2005) (Goel et al. 2005). En imposant une densité de courant de 5A/m², 52% de l'azote était enlevé. Cependant, dans toutes ces études, une puissance électrique est fournie, soit sous forme de potentiel, soit sous forme de courant, afin de promouvoir les réactions biologiques. Une PACM autonome en énergie, afin d'effectuer la dénitrification à la cathode grâce aux électrons libérés au cours de la réaction se produisant à l'anode reste donc à mettre en place.

D'autres composés peuvent être réduits à la cathode comme le dioxyde de carbone, le fumarate ou l'uranium. Park et al. ont démontré que *Actinobacillus succinogenes* et des granules méthanogéniques (constituées de cultures mélangées de bactéries dégradant les acides gras syntrophiques et des bactéries productrices de méthane) pouvaient respectivement réduire le fumarate et le CO₂ en utilisant du rouge neutre comme médiateur d'électrons sur une électrode de graphite (Park et al. 1999). De plus, *G. sulfurreducens* réduit le fumarate en succinate avec une électrode en graphite comme unique donneur d'électrons (Gregory et al. 2004). Des densités de courant de 0,4A/m² ont été obtenues lorsque la cathode était polarisée à -0,50 V vs. Ag/AgCl.

Cette même souche est capable de réduire l'uranium U(VI) qui est soluble en U(IV) qui lui précipite sur l'électrode polarisée à -0,50 V vs. Ag/AgCl (Gregory et al. 2005). 87% de l'uranium réduit par *G. sulfurreducens* est récupéré de la surface de l'électrode.

Dans le cas de *G. metallireducens* ou de *G. sulfurreducens*, il a été prouvé récemment (Gregory et al. 2004) que le transfert électronique entre la bactérie et la cathode était direct et ne mettait en jeu aucun médiateur électrochimique. Lorsque l'électrode, recouverte par le biofilm, est maintenue dans le compartiment cathodique alors que le milieu est remplacé par un milieu identique mais ne contenant plus de bactéries en suspension ou de produits issus de l'activité métabolique des bactéries, le courant n'est pas affecté. Ceci montre que seules les bactéries adhérentes sur l'électrode sont responsables du signal électrique et par conséquent, transfèrent directement les électrons à un donneur d'électrons insoluble tel que l'électrode.

La découverte de bactéries capables de réduire le nitrate directement, sans ajout de médiateurs électrochimiques, comme *G. metallireducens*, permettrait de mettre au point des PACMs totalement biologiques, avec des bactéries du côté anodique et cathodique. Dans chaque compartiment de la PACM aurait lieu la dégradation de matière organique : le traitement des eaux usées par exemple coté anodique et la réduction du nitrate côté cathodique. Ce dispositif est totalement hypothétique, il reste à prouver que la différence de potentiel et la densité de courant produite sont suffisantes pour que le système soit autonome en énergie.

D'autres applications pour les biocathodes en milieu anaérobie apparaissent intéressantes pour l'environnement, telles la réduction de composés comme l'uranium, la dégradation du CO₂. Toutefois, les bactéries présentées ci-dessus, ne sont capables de dégrader le CO₂ qu'en présence du rouge neutre, qui est un médiateur électronique artificiel polluant.

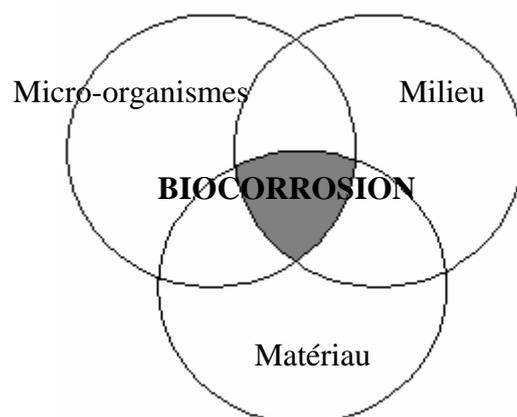
4.6.2. Biocathodes en milieu aérobie

Les biocathodes en milieu aérobie, sont issues des recherches effectuées en biocorrosion. Elles mettent en jeu la réduction de l'oxygène.

La biocorrosion est un phénomène de corrosion qui résulte de la conjonction de trois facteurs :

- un milieu aqueux généralement jugé agressif
- un matériau réputé compatible avec les conditions d'exposition
- des micro-organismes dont la présence est souvent négligée ou inattendue

Dans ce paragraphe, seuls les phénomènes de biocorrosion aérobie seront abordés.

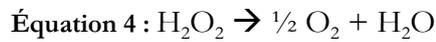


La biocorrosion ou biodétérioration des matériaux métalliques, encore appelée corrosion microbienne, bactérienne ou corrosion influencée/induite par les micro-organismes CIM (traduction *Microbially Influenced Corrosion MIC*) est un phénomène qui par la présence de micro-organismes résulte en une augmentation du potentiel libre du matériau. Cette augmentation accentue les risques de corrosion. Différentes bactéries sont dénoncées comme étant responsables de cette augmentation de potentiel : les MOB (*manganese oxidizing bacteria*) (Rhoads et al. 2005; Linhardt 2006), les bactéries ferro-oxydantes (*Thiobacillus ferrooxidans*) (Lopez-Lopez et al. 1999) ou encore les biofilms marins (Mollica et al. 1989), (Scotto et al. 1998). Dans ce dernier cas, les auteurs attribuent ce phénomène à l'augmentation de la cinétique d'une réaction cathodique (la réduction de l'oxygène) qui accélère alors le processus global de corrosion. Les électrons consommés par l'accélération des réactions cathodiques sont extraits au niveau de sites anodiques du matériau où se déroule l'oxydation du Fe^0 en Fe^{2+} . Le métal se dissout au niveau de ces sites anodiques et des piqûres apparaissent alors (Figure 18 à Figure 21). Les mécanismes expliquant l'augmentation du potentiel libre du matériau sont variés mais tous impliquent la réduction de l'oxygène par l'intervention de micro-organismes.

Le premier mécanisme attribue l'augmentation de potentiel libre à l'activité des MOB. En effet, ces dernières oxydent les ions manganèse Mn^{2+} en MnO_2 ($\text{Mn}^{2+} + \text{O}_2 \rightarrow \text{MnO}_2$; Figure 18). Le MnO_2 produit se dépose sur le métal et peut être réduit en MnOOH , qui lui-même se réduit en Mn^{2+} . Les électrons nécessaires à ces réactions sont puisés dans le métal (Dickinson et al. 1996) (Figure 18). Un mécanisme similaire au précédent est l'oxydation du Fe^{2+} en Fe^{3+} par des bactéries aérobies, qui par la suite se réduit sur le matériau en Fe^{2+} (Lopez-Lopez et al. 1999).

L'augmentation de la vitesse de la réaction de réduction de l'oxygène est aussi expliquée par l'oxydation de sucres (par exemple le glucose) en acide. L'autre produit de la réaction est le peroxyde d'hydrogène qui se réduit par la suite à la surface de l'électrode (Féron 2005) (L'Hostis et al. 2002)(Figure 19).

Busalmen et al. ont proposé un mécanisme qui relie la catalyse de la réduction de l'oxygène à la catalase (Busalmen et al. 2002). La catalase est une enzyme intracellulaire ou extracellulaire présente dans la plupart des bactéries aérobies. Lorsqu'elle est intracellulaire, elle protège la cellule de l'effet toxique du peroxyde d'hydrogène, en catalysant la dismutation de H_2O_2 en O_2 et H_2O sans la formation de radicaux libres selon :



Les auteurs ont observé une augmentation du courant cathodique et ont attribué ce phénomène à la présence de la catalase (Figure 20). En effet, la dismutation de peroxyde d'hydrogène maintient une concentration d'oxygène à la surface de l'électrode.

Enfin la dernière hypothèse serait une catalyse de la réduction de l'oxygène par les bactéries organisées en biofilm et plus particulièrement par l'intermédiaire d'enzymes telle la catalase qui réagit directement à l'électrode (Figure 21) (Bergel et al. 2005) (Scotto et al. 1998).

Toutes ces théories ne sont pas forcément antagonistes. En effet, des mécanismes différents peuvent intervenir selon le milieu naturel. Par exemple dans les eaux douces particulièrement chargées en manganèse, les phénomènes liés à l'activité des MOB seront les plus rencontrés. De plus, l'hétérogénéité et la diversité microbienne des biofilms nous permettent de penser que plusieurs de ces phénomènes peuvent avoir lieu sur un même matériau. Quel que soit le mécanisme mis en jeu, l'oxygène reste toujours l'accepteur terminal d'électrons.

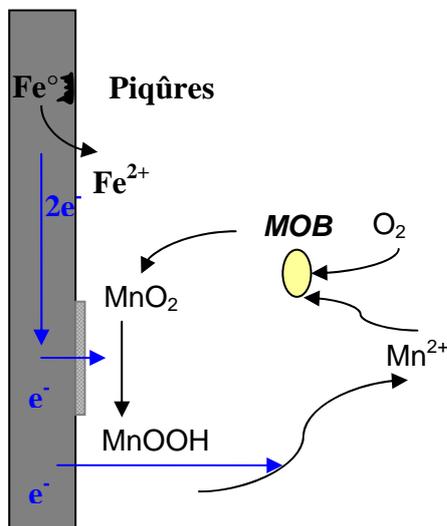


Figure 18 : Mécanisme expliquant l'augmentation du potentiel libre du matériau par un dépôt de MnO_2 . (Rhoads et al. 2005)

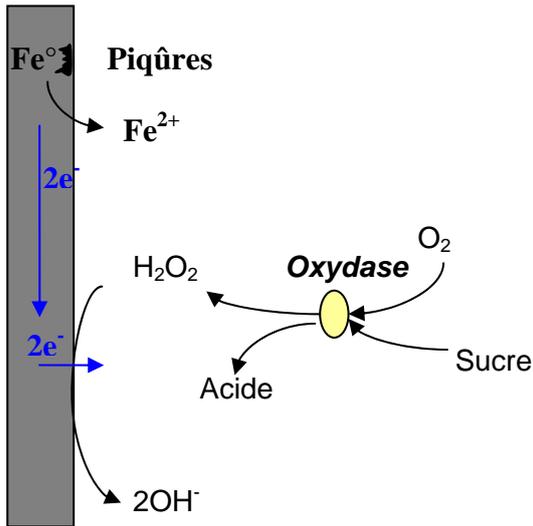


Figure 19 : Mécanisme expliquant l'augmentation du potentiel libre du matériau par la réduction du peroxyde d'hydrogène sur le matériau (Féron 2005).

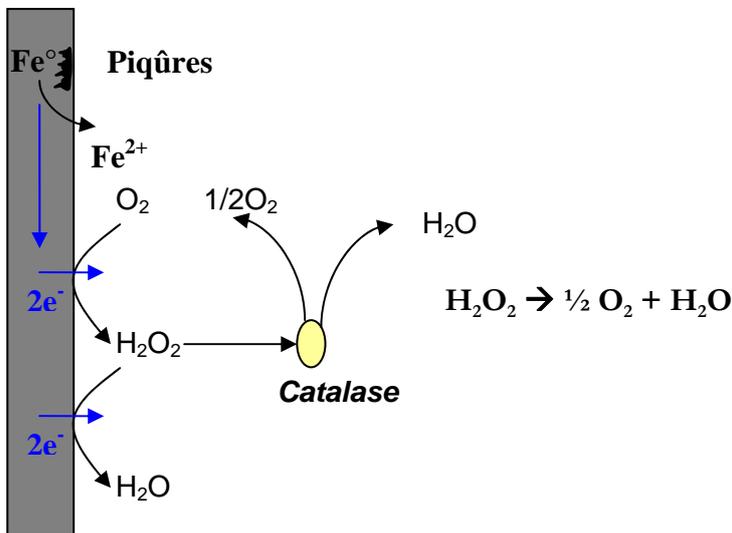


Figure 20 : Mécanisme expliquant l'augmentation du potentiel libre du matériau par la dismutation du peroxyde d'hydrogène en oxygène et en eau. D'après (Busalmen et al. 2002).

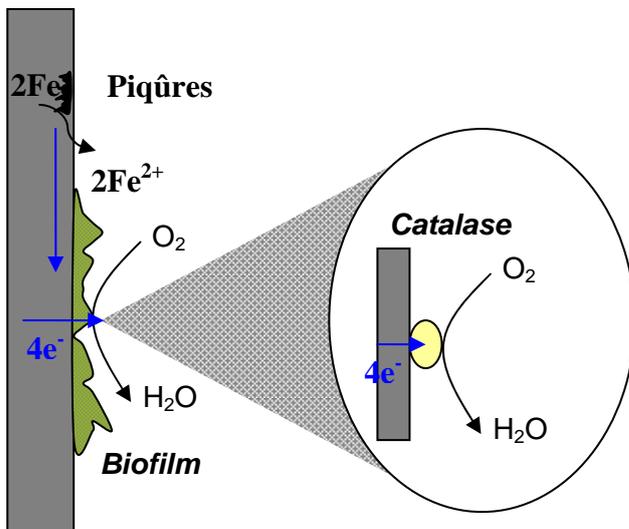


Figure 21 : Représentation schématique de l'effet de la catalase sur la réduction de l'oxygène : catalyse directe de la réduction de l'oxygène. D'après (Lai et al. 2000).

L'accélération des réactions cathodiques en présence d'oxygène et de micro-organismes sur un matériau a été exploitée dans les PACMs. Les électrons habituellement puisés au sein du matériau sont désormais fournis par la réaction (catalysée ou non par des micro-organismes) se produisant sur l'anode reliée à la cathode via le circuit électrique.

Bergel et al. ont mis en place une PACM constitué d'une cathode en acier inoxydable recouverte d'un biofilm marin sur laquelle a lieu la réduction de l'oxygène et d'une anode en platine abiotique où se déroule l'oxydation de l'hydrogène. Ils ont montré que les biofilms marins développés sur la cathode catalysaient la réduction de l'oxygène (Bergel et al. 2005). En effet, la densité de puissance maximale fournie par la PACM chute de 270 mW/m² à 2,8 mW/m² lorsque le biofilm est enlevé de la surface de la cathode. Rhoads et al. ont été les premiers à mettre au point une PACM totalement biologique. Cette dernière est constituée d'une anode et cathode en carbone vitreux réticulé. Du côté anodique *Klebsiella pneumoniae* oxyde le glucose par l'intermédiaire d'un médiateur (le 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone : HNQ). Du côté cathodique, *Leptothrix discophora* (qui est une bactérie qui oxyde le manganèse, *Manganese oxidizing bacteria* ou MOB) oxyde le Mn²⁺ en MnO₂, qui se réduit à la surface de l'électrode. Ils ont démontré qu'ajouter le cycle d'oxydation/réduction du manganèse à une cathode aérée multipliait la puissance fournie par 40 (Rhoads et al. 2005). Les biocathodes ont été appliquées aussi à la détoxification des composés organiques (comme du méthanol du côté anodique) présents dans les effluents industriels (Lopez-Lopez et al. 1999). Du côté cathodique *T. ferrooxydans* réduit l'oxygène et oxyde le Fe²⁺ en Fe³⁺ qui par la suite se réduit sur une cathode en acier ou en feutre de carbone. Les électrons nécessaires à cette réaction proviennent de l'oxydation du méthanol sur l'anode en titane sur laquelle du dioxyde de plomb a été déposé électrochimiquement (TiPbO₂). Cependant pour avoir lieu les réactions nécessitent un apport d'énergie. Une autre équipe a mis au point une PACM totalement biologique constituée d'une anode recouverte de bactérie oxydant l'acétate et une cathode mettant en jeu une bactérie ferro-oxydantes comme *Acidithiobacillus ferrooxydans*, qui comme *T. ferrooxydans* est capable de réduire l'oxygène et d'oxyder le Fe(II) en Fe(III), ce dernier se réduisant électrochimiquement à la cathode (terHeijne et al. 2007).

Ces différents types de fonctionnement présentent quelques avantages par rapport aux cathodes abiotiques utilisant l'oxygène comme accepteur final d'électrons ou mettant en jeu des médiateurs électroniques. En effet, le platine n'est plus nécessaire pour accélérer la réaction de réduction de l'oxygène puisque cette catalyse est assurée par les bactéries. De plus, l'absence de médiateurs électrochimiques artificiels permet d'envisager des PACMs autonomes, « propres » pouvant éventuellement être mises en place dans un environnement naturel.

Après avoir défini ce que sont les PACMs, il paraît nécessaire de présenter quelles sont les méthodes qui permettent de caractériser ces nouveaux procédés de production d'énergie électrique. Ces méthodes de caractérisation sont pour la plupart inspirées de celles des piles à combustibles classiques.

5. Caractérisation des PACMs : thermodynamique et fondamentaux électrochimiques⁷

Au cours des expériences effectuées à Gênes, les PACMs ont été caractérisés. Attardons-nous un peu sur la théorie et les différentes méthodes utilisées nécessaire à la caractérisation des PACMs. Les performances d'une PACM peuvent être affectées par différents paramètres tels que la température, la concentration en substrat, le pH etc. Évaluer leur impact sur le fonctionnement de la PACM s'effectue en s'intéressant aux caractéristiques du système idéal puis aux pertes engendrées par la mise en oeuvre et le fonctionnement du système réel. La détermination de l'efficacité énergétique des réactions de transfert électronique, basées sur les potentiels standard des espèces impliquées est un facteur clé qui détermine les limites théoriques de la conversion d'énergie.

5.1. Thermodynamique

Pour qu'une réaction électrochimique (dans une PAC : Équation 5) ait lieu il faut que la réaction soit thermodynamiquement favorable.



La réaction est évaluée avec l'enthalpie libre ou énergie de Gibbs. Cette énergie mesure le travail maximal que l'on peut obtenir de la réaction.

Équation 6 :
$$\Delta G_r = \Delta G_r^0 + RT \ln(\Pi)$$

avec

- ΔG_r (J) : enthalpie libre de la réaction ;

- ΔG_r^0 (J) : enthalpie libre de la réaction dans les conditions standards (c'est-à-dire T=298,15 K ; P=1 bar ; [espèces]=1 M) disponible dans les tables de données physico-chimiques pour les composés organiques (Amend 2001; Alberty 2003).

- R (8,314 J.mol⁻¹.K⁻¹) : constante des gaz parfaits

- T (K) : température

⁷ Ce paragraphe a été inspiré de la synthèse réalisé par R.Basséguy dans son habilitation à diriger des recherches, 2006 p53-55 et par Logan, B. E., Hamelers, B., Rozendal, R., Schroder, U., Keller, J., Freguia, S., Aeltermann, P., Verstraete, W., Rabaey, K. (2006a). "Microbial fuel cells: methodology and technology." *Environ. Sci. Technol.* **40**: 5181.

- Π : rapport entre les activités des produits sur celles des réactifs.

Pour les PACs, et donc les PACMs, il est préférable d'évaluer la réaction en terme de tension globale de la pile : $\Delta E_{\text{idéale}}$, qui est reliée au travail produit par la cellule $W(J)$:

Équation 7 :
$$W = \Delta E_{\text{idéale}} \times Q = -\Delta G_r \text{ avec } \Delta E_{\text{idéale}} = E_{\text{cathode}} - E_{\text{anode}}$$

avec $Q = nF$ (C). La charge transférée au cours de la réaction est égale au nombre d'électrons, n , échangé au cours de la réaction d'une mole, multiplié par F la constante de Faraday 96485 C/mol.

En combinant l'Équation 6 et l'Équation 7, $\Delta E_{\text{idéale}}$ s'exprime comme $\Delta E_{\text{idéale}} = -\frac{\Delta G_r}{nF}$. Lorsque la réaction s'effectue dans les conditions standards : $\Pi = 1$ et $\Delta E^0 = -\frac{\Delta G_r^0}{nF}$. Ainsi on peut exprimer $\Delta E_{\text{idéale}}$ avec l'équation suivante :

Équation 8 :
$$\Delta E_{\text{idéale}} = \Delta E^0 - \frac{RT}{nF} \ln(\Pi)$$

La valeur de $\Delta E_{\text{idéale}}$ est positive lorsque la réaction est thermodynamiquement favorable (et représente la valeur maximale de la différence de potentiel de la PACM). La tension de la pile, en pratique est plus faible que $\Delta E_{\text{idéale}}$ à cause des différentes pertes engendrées par les surtensions. Ce sujet sera abordé en 5.3.

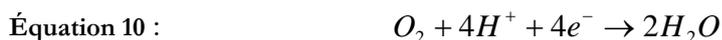
5.2. Potentiels standards

Les réactions de la pile peuvent être analysées en terme de demi-réactions, ayant lieu à l'anode et à la cathode.

Prenons l'exemple de la réaction d'oxydation de l'acétate à l'anode:



et de la réduction de l'oxygène à la cathode.



Les potentiels standards sont exprimés par rapport à l'électrode standard à hydrogène (ESH) dont le potentiel est pris égal à zéro dans les conditions standards ($T=298,15$ K ; $p_{H_2}=1$ bar ; $[H^+]=1$ M). Par convention (IUPAC : *International Union of Pure and Applied Chemistry*), l'équation de Nernst s'écrit dans le sens de la réduction c'est-à-dire lorsque la réaction consomme des

électrons ($Ox + ne^- \rightarrow Red$). Le potentiel théorique à l'anode peut être calculé grâce à l'équation de Nernst, en considérant que les activités des espèces sont égales à leur concentration on obtient :

$$\text{Équation 11 : } E_{Anode} = E_{Anode}^0 + \frac{RT}{8F} \ln \left(\frac{[HCO_3^-]^2 [H^+]^9}{[CH_3COO^-]} \right)$$

De même pour le potentiel théorique à la cathode:

$$\text{Équation 12 : } E_{Cathode} = E_{Cathode}^0 + \frac{RT}{4F} \ln \left(\frac{pO_2 [H^+]^4}{1} \right)$$

La tension de la pile est donnée par $\Delta E_{id\acute{e}ale} = E_{cathode} - E_{anode}$.

Les valeurs des potentiels standards E° de différents composés sont disponibles dans des tables telles que celle présentée en Tableau 5 ou sous forme plus complète dans des ouvrages (Bard A.J. et al. 1985). Il est important de noter que lorsque le pH varie, les potentiels des demi réactions sont modifiés et en conséquence la tension de la pile. De plus, une variation du potentiel de l'anode (ou de la cathode), même si le potentiel de l'électrode opposée reste stable, engendre une différence de valeur de tension de pile et donc de densité de puissance.

Redox compound	E_p' (mV)
SO_4^{2-}/HSO_3^-	-516
$CO_2/formate^a$	-432
H^+/H_2	-414
$S_2O_3^{2-}/HS^- + HSO_3^-$	-402
Flavodoxin ox/red (E'_{41})	-371 ^d
Ferredoxin ox/red (E'_{41})	-398 ^e
NAD/NADH	-320
Cytochrome c_3 ox/red	-290
$CO_2/acetate^-$	-290
S^0/HS^-	-270
CO_2/CH_4	-244
FAD/FADH ₂	-220
Acetaldehyde/ethanol	-197
Pyruvate ⁻ /lactate ⁻	-190
FMN/FMNH ₂	-190
Dihydroxyacetone phosphate/glycerol-phosphate	-190
$HSO_3^-/S_2O_4^{2-}$	-173
Oxaloacetate ²⁻ /malate ²⁻	-172
Flavodoxin ox/red (E'_{42})	-115 ^d
HSO_3^-/HS^-	-116
Menaquinone ox/red (MK)	-74
APS/AMP + HSO_3^-	-60
Rubredoxin ox/red	-57
Acrylyl CoA/propionyl CoA	-15
Glycine/acetate ⁻ + NH_4^+	-10
2-Demethylvitamin K ₂ ox/red	+25
$S_4O_6^{2-}/S_2O_3^{2-}$	+24
Fumarate/succinate	+33
Ubiquinone ox/red	+113
$S_2O_4^{2-}/S_2O_3^{2-} + HSO_3^-$	+225
NO_3^-/NO	+350
NO_3^-/NO_2^-	+433
Fe^{3+}/Fe^{2+}	+772
O_2/H_2O	+818
NO/N_2O	+1175
N_2O/N_2	+1355

Tableau 5 : Tableau récapitulatif des potentiels standards de couples redox habituels. Le potentiel est exprimé en V vs. ESH à pH 7 (Thauer et al. 1977).

5.3. Surtensions et pertes de puissance dans les piles à combustible microbiennes.

Idéalement la tension de la pile en circuit ouvert, c'est-à-dire sans charge, est donnée par l'Équation 8. Si l'on considère une PACM, où se déroule l'oxydation de l'acétate catalysée par des biofilms, et la réduction de l'oxygène (abiotique), la tension de la pile est égale au maximum à 1,1V. Toutefois, en pratique, la tension maximale atteinte en circuit ouvert, lorsque aucun courant ne traverse le circuit, est de 0,80 V (Liu et al. 2005b). De plus, lorsque la pile débite, la tension de la pile ne dépasse pas 0,62 V pour un courant d'environ 0.20A/m² (Liu et al. 2005b). La valeur théorique de la tension est diminuée par diverses surtensions (ou polarisations) qui correspondent à des pertes irréversibles éloignant le système de l'équilibre. Ces pertes proviennent de trois sources principales qui délimitent trois zones sur un diagramme U=f(i) où U est la tension aux bornes de la pile et i la densité de courant débitée (Figure 22) :

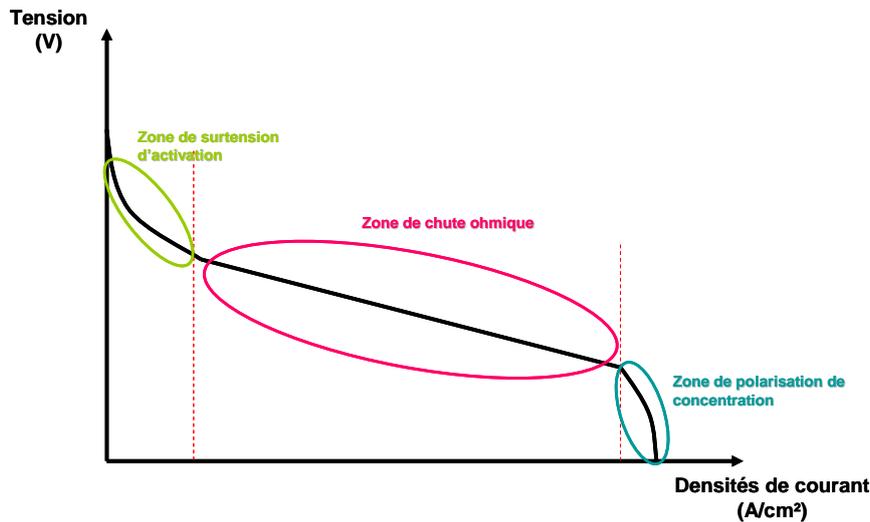


Figure 22 : Caractéristique U=f(i) pour une pile à combustible (d'après (Larminie et al. 2003)).

5.3.1. Zone 1) la surtension d'activation (η_{act})

Elle est présente pour les faibles densités de courant, lorsque le transfert de charge sur l'électrode est lent. En d'autres termes, la surtension d'activation est directement liée aux vitesses des réactions électrochimiques et elle peut être décrite sur chaque électrode par l'équation de Tafel :

Équation 13 :
$$\eta_{act} = \frac{RT}{\alpha nF} \ln \frac{i}{i_0}$$

avec α le coefficient de transfert électronique et i_0 la densité de courant d'échange.

Cette limitation peut avoir lieu à la fois à l'anode et à la cathode. Du côté anodique, la limitation peut être due au transfert d'électrons d'un composé à l'électrode. Ce composé peut être sécrété par les bactéries (médiauteurs biologique), un médiateur présent en solution (médiateur chimique),

ou à la surface de la bactérie (cytochrome). Du côté cathodique, l'accepteur final d'électrons, l'oxygène, peut être à l'origine de la limitation. Ces surtensions d'activation peuvent être diminuées en augmentant la température de fonctionnement ou encore en favorisant la formation d'un biofilm mature sur l'électrode, c'est-à-dire en augmentant le nombre de bactéries à la surface du matériau.

5.3.2. Zone 2) la polarisation ohmique (η_{ohm})

Dans le domaine des densités de courant moyennes, des pertes ohmiques apparaissent du fait de la résistance au transfert ionique entre l'anode et la cathode, par exemple dans la membrane de la pile s'il y en a une, ou de la résistance au transfert électronique au niveau des matériaux d'électrodes et de toutes les connexions jusqu'à la charge. Toutes ces pertes obéissent à la loi d'Ohm:

$$\eta_{ohm} = I \times R$$

où R représente la résistance totale, somme des résistances ionique, électronique et de contact.

Les chutes ohmiques peuvent être réduites en augmentant la conductivité de la solution au maximum toléré par les bactéries, en utilisant une membrane de faible résistivité ou en diminuant les distances entre les électrodes (Liu et al. 2005a).

5.3.3. Zone 3) la polarisation de concentration (η_{conc})

Pour les forts courants, la consommation importante des réactifs à l'électrode entraîne une chute de potentiel liée à l'incapacité du système à maintenir la concentration initiale (limitation due au transfert de masse). A l'anode, le rapport entre les espèces oxydées et réduites augmente pouvant entraîner une augmentation du potentiel. À la cathode, l'inverse se produit et le potentiel chute. De plus, cette limitation de transfert de masse en solution peut limiter l'apport en substrat dans le biofilm et défavoriser la catalyse de la réaction.

Le potentiel aux électrodes s'écrit alors de la manière suivante :

$$E_{cath} = E_{ideale, cath} - |\eta_{act, cath} + \eta_{conc, cath}|$$

et

$$E_{anode} = E_{ideale, anode} + |\eta_{act, anode} + \eta_{conc, anode}|$$

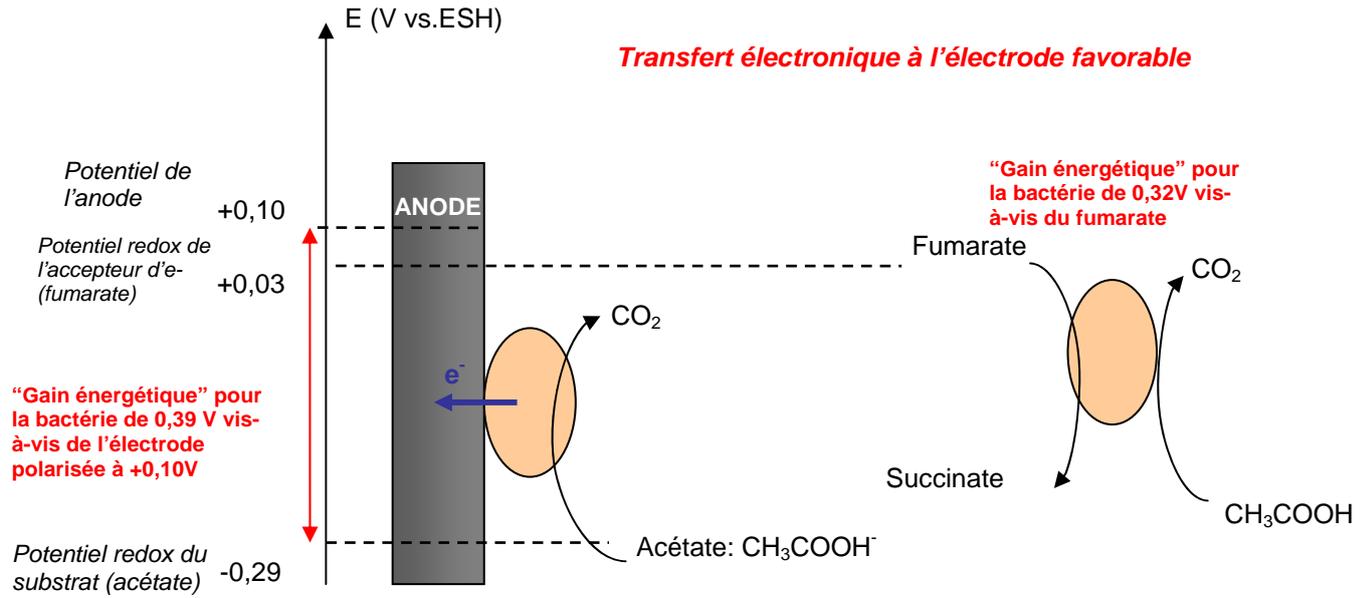
La tension U aux bornes de la pile devient :

$$U = \Delta E_{ideale} - |\eta_{act, cathode} + \eta_{conc, cathode}| - |\eta_{act, anode} + \eta_{conc, anode}| - IR$$

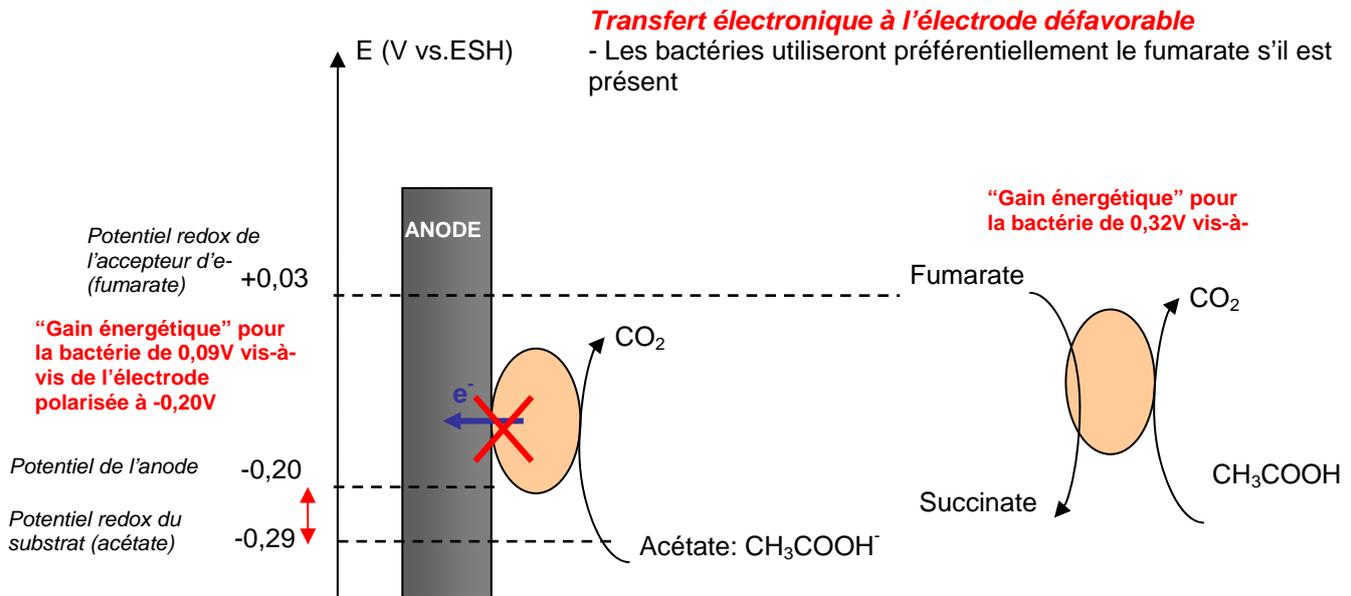
5.3.4. Recherche des meilleurs systèmes bactéries/substrat pour les PACMs

Pour étudier les deux compartiments de la pile de façon indépendante, on utilise une cellule d'électrolyse où le potentiel anodique ou cathodique est imposé à l'aide d'un potentiostat.

Pour obtenir de l'énergie, les bactéries transportent les électrons d'un substrat à bas potentiel (par exemple, l'acétate $E^\circ = -0,29$ V vs. ESH) jusqu'à l'accepteur final d'électrons à un potentiel plus élevé (tel que l'oxygène $E^\circ = 0,82$ V le nitrate $E^\circ = 0,43$ V ou le fumarate $E^\circ = 0,03$ V vs. ESH) au travers de la chaîne de transport d'électrons. Dans une cellule d'électrolyse, où les bactéries se situent dans le compartiment anodique, l'anode est l'accepteur final d'électron et son potentiel détermine l'énergie disponible pour les bactéries. Plus la différence entre le potentiel redox du substrat et le potentiel de l'anode est important, plus le gain d'énergie possible pour les bactéries est grand (Figure 23). Prenons l'exemple de la bactérie *G. sulfurreducens* qui oxyde l'acétate sur une électrode dont le potentiel est imposé par un potentiostat, mise en présence de fumarate dans le milieu. Le potentiel redox du couple fumarate/succinate est de $E^\circ = +0,03$ V vs. ESH. Celui du couple acétate/ CO_2 est de $E^\circ = -0,29$ V vs. ESH. Dans la Figure 23-A, le potentiel de l'électrode est fixé à $+0,10$ V vs. ESH. En oxydant l'acétate sur l'électrode polarisée, le « gain énergétique » pour la bactérie s'élève à $0,39$ V ($+0,10 - (-0,29) = 0,39$). Alors qu'en oxydant l'acétate et réduisant le fumarate, le gain énergétique ne s'élève qu'à $0,32$ V ($+0,03 - (-0,29) = 0,32$). Dans le cas où l'électrode est polarisée à $+0,10$ V vs. ESH, pour la bactérie, il est plus intéressant d'un point de vue énergétique d'oxyder l'acétate sur l'électrode polarisée. Dans la Figure 23-B, le potentiel de l'électrode est fixé à $-0,20$ V vs. ESH. En oxydant l'acétate sur l'électrode, le « gain énergétique » ne s'élève qu'à $0,09$ V, alors qu'en oxydant l'acétate, et en réduisant le fumarate, le gain énergétique est de $0,32$ V. La bactérie utilisera alors préférentiellement le fumarate, plutôt que l'électrode. Dans la Figure 23-C, le potentiel de l'électrode est fixé à $-0,30$ V vs. ESH. Lorsque le potentiel de l'électrode est trop bas, il n'est pas possible pour la bactérie d'oxyder l'acétate sur l'électrode. Dans le cas d'un fonctionnement en pile, augmenter le potentiel anodique, à potentiel cathodique constant, signifie diminuer la tension entre les électrodes. Pour maximiser la tension entre les électrodes, le potentiel de l'anode doit être maintenu aussi bas (négatif) que possible. En contrepartie, si le potentiel d'anode devient trop bas, la fermentation du substrat (s'il est présent dans le milieu) deviendra plus avantageuse énergétiquement pour les bactéries, et le transfert électronique sera inhibé (Figure 23).



A



B

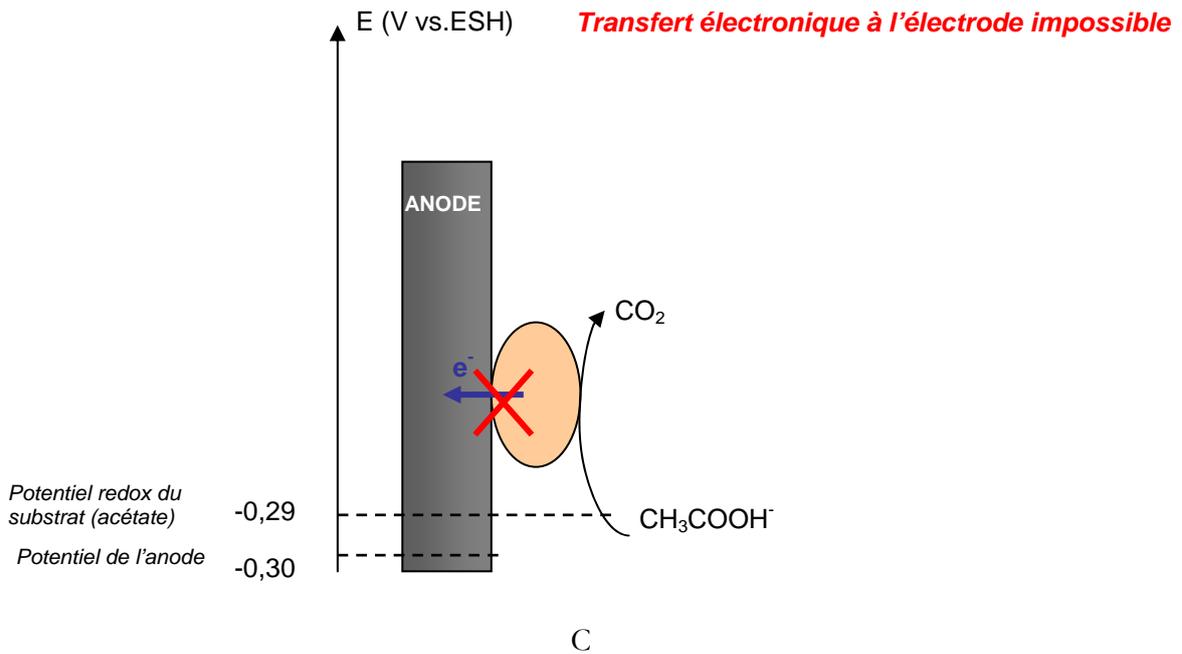


Figure 23 : Schéma représentant le gain énergétique de la bactérie selon la valeur de potentiel imposé sur l'anode.

Ainsi, il faudra trouver un compromis entre le potentiel adéquat et favorable au transfert électronique de la bactérie à l'électrode et le potentiel technologiquement avantageux en vue d'un développement des PACMs. Un moyen de minimiser le potentiel de l'anode tout en favorisant le transfert entre la bactérie et l'électrode est aussi de trouver un élément à oxyder appartenant à un couple redox avec un potentiel bas. Le formate, par exemple, appartenant au couple $\text{CO}_2/\text{formate}$ qui a un potentiel de $-0,43 \text{ V vs. ESH}$ apparaît intéressant.

5.4. Calculs et procédures de caractérisations de la PACM

Un récapitulatif des calculs utilisés dans ce manuscrit est abordé ci-dessous. La charge Q (en coulomb C) qui traverse un milieu conducteur est calculée par :

$$Q = \int I \times dt$$

avec I en A et t en s.

La loi d'Ohm permet de calculer la tension aux bornes de la pile (U en V) qui débite un courant I (A) au travers d'une charge R (Ω) :

$$U = R \times I$$

La puissance de la pile est calculée comme : $P = U \times I$ avec P en W, U en V et I en A. Ces valeurs peuvent être exprimées par unité de surfaces d'électrodes (anode ou cathode).

Un moyen de caractériser une pile consiste à tracer des courbes de densité de puissance et de tension en fonction de la densité de courant (Figure 24). La courbe de puissance présente un maximum qui se situe au niveau des forts courants avec une tension de pile faible (Figure 24). L'enjeu consiste à trouver le bon compromis entre une puissance délivrée élevée et une tension de pile suffisamment élevée.

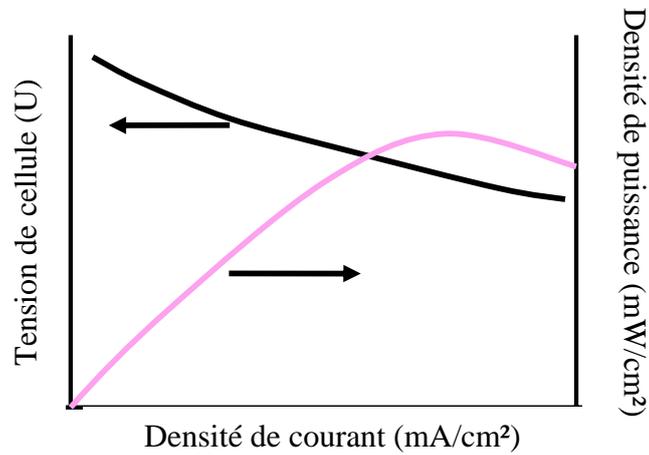


Figure 24 : Caractéristiques Puissance =f(i) et Tension=f(i) pour une pile à combustible (d'après (International et al. 2000)).

Les différentes zones de la courbe $U=f(i)$ ont été décrites en Figure 22.

Un autre moyen de définir les propriétés de la pile est de caractériser séparément l'anode et la cathode grâce au tracé de courbes de polarisation. Ces courbes sont tracées à l'équilibre (ou pseudo-équilibre c'est-à-dire après quelques minutes de stabilisation ou plus selon le système) en mesurant, le courant qui traverse la pile, et le potentiel de chaque électrode pour différentes valeurs de résistances (Figure 25 courbes indicées 1). Si l'on s'intéresse à l'évolution au cours du temps de ces courbes, il est possible de caractériser l'effet catalytique d'un composé présent sur les électrodes (par exemple le biofilm) (Figure 25 courbes indicées 2). En absence d'élément catalyseur tel que le biofilm électroactif dans notre cas, les pentes sont représentées par θ_{a1} et θ_{c1} , la différence de potentiel s'élève à ΔE_1 . Lorsque les réactions sont catalysées, les pentes des courbes augmentent ainsi que la différence de potentiel : $\theta_{a1} < \theta_{a2}$; $\theta_{c1} < \theta_{c2}$ et $\Delta E_1 < \Delta E_2$.

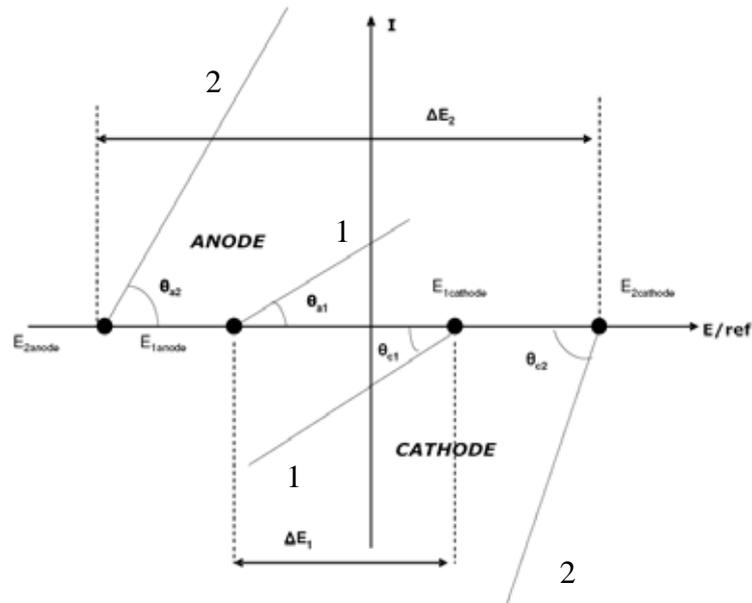


Figure 25 : Représentation schématique de l'effet d'une catalyse sur les courbes de polarisation $I=f(E)$. 1 : sans catalyse des réactions ; 2 : avec catalyse des réactions.

6. Conclusions

Le contexte dans lequel s'inscrit la thématique de recherche développée dans ce manuscrit à savoir les piles à combustible microbiennes vient d'être présenté. On note que cette technologie apparue très tôt ne fait l'objet de nombreuses recherches que ces dernières années. Les PACMs intéressent aussi bien les microbiologistes qui désirent clarifier les mécanismes mis en jeu au cours du transfert électronique entre la bactérie et l'électrode que les chercheurs dans le traitement des eaux qui voient dans les PACMs un outil pour traiter les eaux usées d'une part et subvenir d'autre part à une partie de la consommation électrique de l'usine de traitement. D'autres applications voient le jour : la production d'hydrogène ou la protection cathodique de matériaux en mer. Chaque équipe de recherche approfondit la thématique de recherche dans laquelle elle est compétente à savoir les technologies biomoléculaires, ou les matériaux ou les aspects technologiques d'architecture des PACMs.

L'approche pluridisciplinaire des PACMs est au cœur de l'avancée scientifique constatée et de toutes les recherches engagées actuellement. Elle sera certainement à l'origine de leur futur développement.

Chapitre 2 :
Matériel et Méthodes

Chapitre 2 : **Matériel et Méthodes**

Ce chapitre regroupe le matériel et les méthodes mis en œuvre au cours des expériences conduites au Laboratoire de Génie Chimique de Toulouse et des études menées en collaboration avec le Pr. A. Mollica à Gênes en Italie. La première partie présente les réacteurs électrochimiques utilisés. Dans une seconde partie, les techniques électrochimiques sont abordées. Le troisième paragraphe s'attache aux méthodes de caractérisation des matériaux. La quatrième partie présente les tests de détachement de biofilms effectués avec une cellule à écoulement cisailé. Enfin, la dernière section présente d'une part la PACMM mise en place dans le port de Gênes, et d'autre part le prototype de PACMM installé en station marine.

Les photographies de microscopie confocale ont été réalisées à l'INRA-IFR 40 de Castanet-Tolosan par A. Jauneau. Les photographies de matériaux effectuées au microscope électronique à balayage ont été effectuées à la plate forme du Laboratoire de Génie Chimique, par de M.-L. DeSolan. Les mesures de rugosité de matériaux ont été réalisées au CIRIMAT par V. Baylac. La mise en place de la cellule à écoulement a été effectuée avec l'aide du Service technique du Laboratoire de Génie Chimique de Toulouse.

1. Réacteurs d'électrolyse

1.1. Milieu et conditions de croissance

La souche *Geobacter sulfurreducens* référencée ATCC (American Type Culture Collection) a été commandée chez DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen). La composition du milieu de culture est présentée dans le Tableau 6.

Le milieu est autoclavé pour la stérilisation, puis complété par une solution de fumarate de sodium, filtrée à 0,2 μm , pour une concentration finale de 8 g/L dans le milieu. 10 mL d'un mélange de vitamines et 10 mL de minéraux (compositions en annexe 1) sont aussi ajoutés. Les bactéries (10% v/v) sont mises en culture dans ce milieu pendant 5 jours à 30 °C.

Dans les expériences en réacteurs électrochimiques, mettant en jeu l'oxydation de l'acétate en CO_2 , le milieu contenu dans le réacteur est similaire au milieu de culture mais contient uniquement la moitié de la concentration en donneur d'électrons (soit 0,41 g/L d'acétate de sodium ou 5 mM) et aucun accepteur d'électrons soluble (c'est-à-dire pas d'ajout de fumarate). De la même façon, dans le cas de la réduction du fumarate en succinate, le milieu du réacteur contient la moitié de fumarate de sodium (soit 4 g/L ou 25 mM) et aucun donneur d'électrons soluble (c'est-à-dire pas d'ajout d'acétate).

Avant chaque expérience, le milieu est dégazé pendant au minimum une heure avec un mélange de diazote et de dioxyde de carbone (N₂:80%-CO₂:20%) pour chasser l'oxygène. Pendant les expériences, le bullage de gaz est maintenu mais le débit est réduit.

Après environ 5 jours de croissance à 30°C, quand la densité optique à 620 nm dans le milieu de culture se situe autour de 0,3 (c'est-à-dire autour de 142 000 UFC/mL⁸), les bactéries (5% v/v) sont utilisées pour inoculer le réacteur électrochimique

Composés	Concentration en g/L
KCl	0,1
NH ₄ Cl	1,5
NaHCO ₃	2,5
NaH ₂ PO ₄	0,6
Acétate de sodium	0,82
<i>Fumarate de sodium</i>	8

Autres composés	Volume en mL
<i>Vitamines (MD-VS ATCC)</i>	10
<i>Minéraux (MD-TM ATCC)</i>	10

Tableau 6: Composition d'un litre de milieu de culture. Le fumarate de sodium, les vitamines et les minéraux sont ajoutés stérilement après autoclavage (notés en italique).

1.2. Réacteurs électrochimiques

Les expériences ont été réalisées dans une cellule électrochimique à trois électrodes, appelée réacteur dans ce manuscrit (Figure 26). Deux types de réacteurs ont été utilisés dans les expériences, un réacteur A de 2 L et des réacteurs B de 0,5 L dont les caractéristiques principales sont regroupées dans le Tableau 7. Les réacteurs A et B comportent sur leur partie supérieure, des orifices pour introduire les électrodes, l'entrée et la sortie du gaz N₂-CO₂. La jonction entre le couvercle et le corps du réacteur est scellée par un collier de serrage. Les ports de prélèvement, situés sur le corps du réacteur sont fermés par des bouchons en butyl et sertis. Le réacteur est thermostaté à 30 °C.

⁸ Le nombre de cellules planctoniques est évalué par l'absorbance à 620 nm. L'absorbance a été transformée en unités formant colonies (UFC/mL) par la courbe d'étalonnage: [UFC/mL] = DO_{620nm} * 472 067, qui a été établie avec des mesures dans des boîtes de Pétri sous atmosphère N₂-CO₂. Ces résultats, qui ont été obtenus par B.Erable, sont présentés en annexe 2.

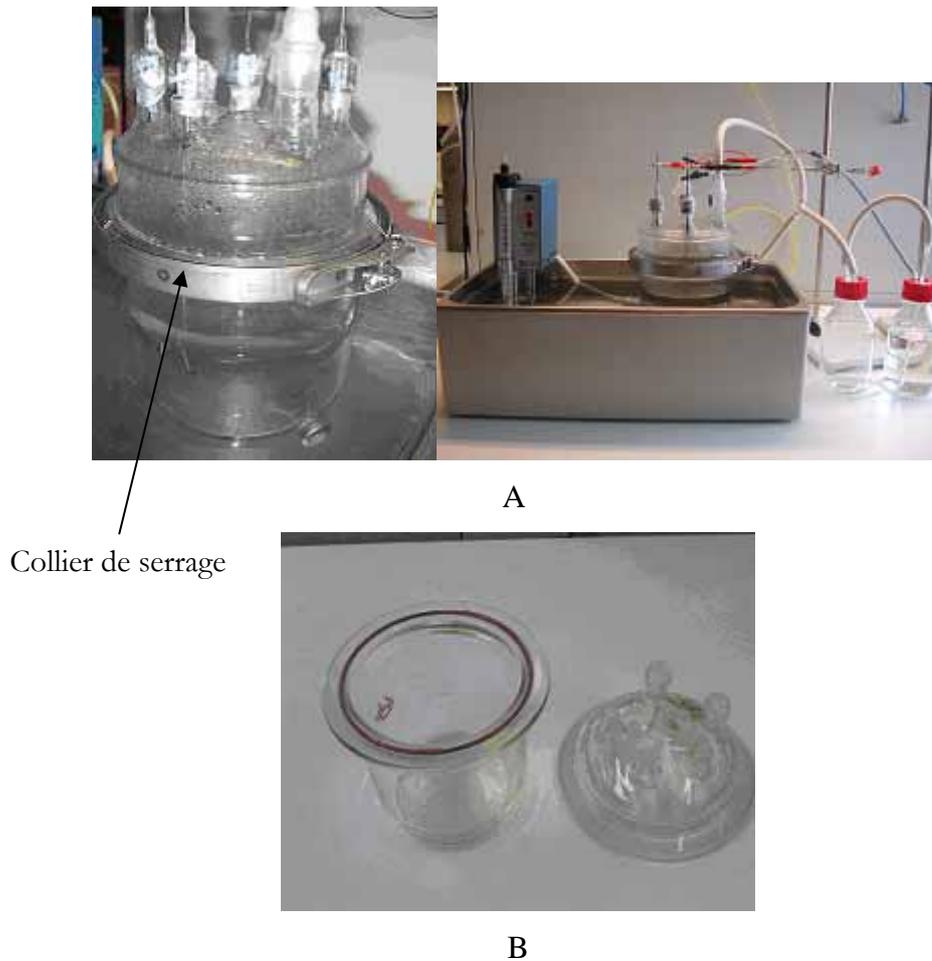


Figure 26 : Photographies des réacteurs électrochimiques utilisés au cours des expériences en laboratoire. A. Réacteur A de 2 L ; B. Réacteur B de 0,5 L.

Réacteurs	Volume (L)	Nombre d'orifices sur le dessus	Ports de prélèvements sur le corps
A	2	7	2
B	0,5 L	6	//

Tableau 7 : Tableau récapitulatif des différentes caractéristiques des réacteurs électrochimiques.

1.3. Électrodes : matériaux et prétraitement

Le réacteur électrochimique est une cellule électrochimique à trois électrodes. Une électrode en argent joue le rôle d'électrode de référence, une grille de platine celui de contre-électrode. L'électrode de référence est un fil d'argent de 1,5 mm de diamètre recouvert de chlorure d'argent (Ag/AgCl). Le fil d'argent est plongé dans une solution d'acide nitrique (HNO₃) puis immédiatement transféré dans du chlorure de potassium (KCl) saturé. La valeur du potentiel de l'électrode de référence dans notre milieu, à 30°C et pH=7, a été calculée grâce à la formule de

Nernst et est d'environ 0,31 V vs. ESH (électrode standard à hydrogène). La contre-électrode est une grille de platine composée de fils de 0,5 mm de diamètre (90% Platine-10% Iridium, Platecxis). La grille de platine est nettoyée en la chauffant à la flamme.

Selon les expériences, l'électrode de travail est en graphite, DSA (Dimensionally Stable Anode) ou acier inoxydable. Les électrodes en graphite (Goodfellow, référence : C 000350) sont des plaques de dimensions 5x2,5x0,5 cm³. Les DSA (ECS International) sont des électrodes à base de titane recouvert d'oxydes d'iridium et de tantale (10 g/m²). Deux tailles de DSA ont été utilisées : 5x2,5x0,1 cm³ et 4,5x2,5x0,1 cm³. L'acier inoxydable est un acier UNS S31254⁹ appelé aussi 254SMO (Outokumpu). Les électrodes sont des plaques de dimensions 2,5x1x0,1 cm³.

Chaque électrode de travail est prétraitée avant son utilisation en réacteur. Les électrodes de graphite sont immergées pendant une heure dans une solution normale d'acide chlorhydrique (HCl), et une heure supplémentaire dans une solution normale d'hydroxyde de sodium (NaOH). Les DSA sont électrolysées à 200A/m² pendant 5 heures dans une solution d'acide sulfurique (H₂SO₄) à 0,1 M. Les électrodes d'acier inoxydable sont nettoyées pendant 30 minutes avec un mélange d'éthanol/acétone (50-50 %) pour dissoudre les espèces organiques adsorbées. Elles sont rincées à l'eau puis décapées par trempage pendant 20 minutes dans une solution contenant 2 % d'acide fluorhydrique (HF) et 20 % d'acide nitrique (HNO₃ à 68%) pour dissoudre la couche d'oxydes. Elles sont ensuite rincées à l'eau puis utilisées immédiatement après traitement.

Chaque électrode de travail est trouée, taraudée, et vissée à une tige de titane pour assurer le contact électrique. Les tiges en titane sont protégées par des gaines thermorétractables et sont insérées au niveau des orifices supérieurs, un joint troué assure l'étanchéité.

2. Techniques électrochimiques

Les expériences en réacteurs électrochimiques ont été effectuées pour plusieurs électrodes de travail introduites dans un même réacteur et reliées à la même électrode auxiliaire (grille de platine) et à la même électrode de référence (Ag/AgCl) au travers d'un multi-potentiostat (modèle VMP1 ou VMP2, EC-Lab v.8.3, Bio-Logic SA). Chaque électrode peut être polarisée individuellement grâce à un dispositif appelé N-STAT (Bio-Logic SA). Le courant détecté sur chaque électrode de travail est suivi indépendamment grâce à ce système. Cette méthode a permis de comparer les matériaux dans des conditions expérimentales strictement identiques. Plusieurs séries de mesures ont été réalisées afin d'étudier la reproductibilité des résultats. Des échantillons témoins sont parfois placés dans le réacteur sans être reliés au potentiostat.

⁹ Composition Cr: 19.9%, Ni: 17.8%, Mo: 6.0%, N: 0.2%, C: 0.01%, Fe: complément

2.1. Chronoampérométrie

Sauf précisions contraires, les électrodes de travail sont maintenues à +0,20 V vs. Ag/AgCl au cours des expériences mettant en jeu l'oxydation de l'acétate par la souche *G. sulfurreducens* et à -0,60 V vs. Ag/AgCl pour la réduction du fumarate (Figure 27). Le courant est enregistré toutes les 300 s. La durée totale des chronoampérométries est d'environ une dizaine de jours.

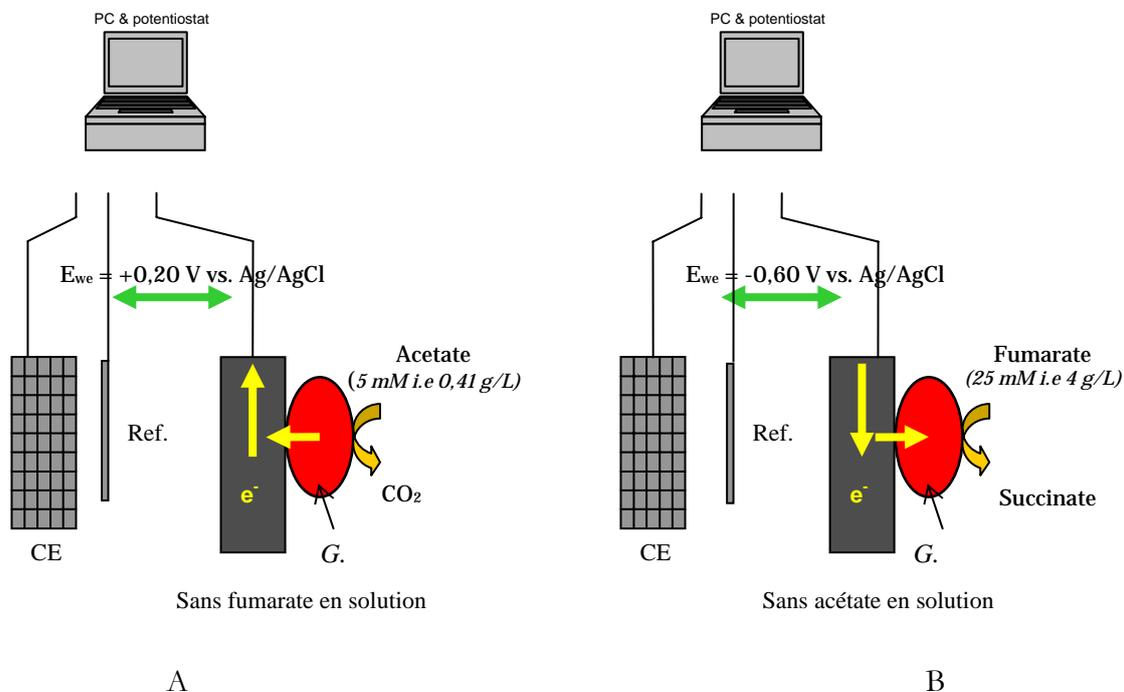


Figure 27 : Schéma du dispositif de chronoampérométrie. A. Cas de l'oxydation de l'acétate par *G. sulfurreducens* à +0,20 V vs. Ag/AgCl. B : Cas de la réduction du fumarate par *G. sulfurreducens* à -0,60 V vs. Ag/AgCl. CE : contre-électrode ; Ref. : électrode de référence

2.2. Voltammétrie cyclique

La voltammétrie cyclique (CV) consiste à faire varier le potentiel de l'électrode de travail de façon linéaire avec le temps et de recueillir le courant en fonction du temps, et ce entre deux bornes de potentiel. Au cours des chronoampérométries, l'imposition du potentiel est suspendue périodiquement pour tracer des voltammogrammes à 2, 10 ou 200 mV/s. Les gammes de potentiels sur lesquelles sont tracés les voltammogrammes diffèrent selon les matériaux utilisés. Pour le graphite, le potentiel varie en général entre -0,70 et 0,50 V vs. Ag/AgCl, pour les DSA entre 0,00 et 0,80 V vs. Ag/AgCl. Pour l'acier la gamme de potentiel varie selon si la polarisation est anodique ou cathodique. En oxydation, la gamme de potentiel est de -0,70 à +0,30 V vs. Ag/AgCl, et en réduction entre -0,80 V et 0,00 V vs. Ag/AgCl.

À la fin des expériences, les électrodes sont observées au microscope (paragraphe 3.1.1). Le biofilm est enlevé de la surface de l'électrode en la frottant avec un papier humide imbibé

d'éthanol. L'électrode est ensuite rincée à l'eau distillée puis placée à nouveau dans le réacteur afin de tracer de nouveaux voltammogrammes sur l'électrode sans biofilm (Figure 28)

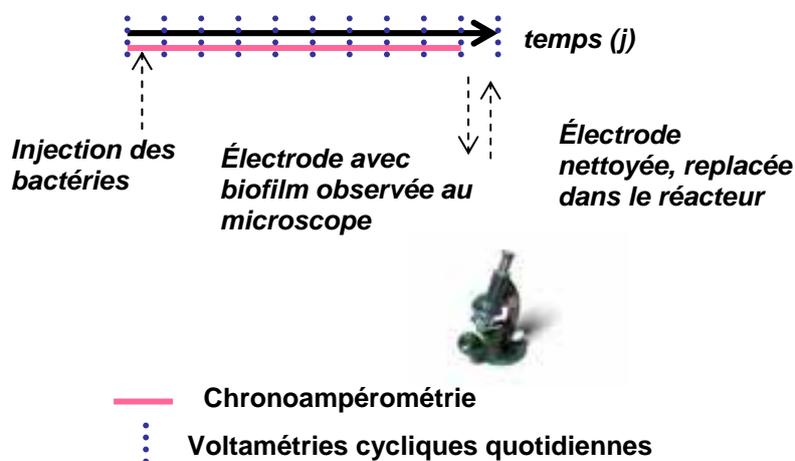


Figure 28 : Chronologie des événements au cours des expériences en réacteurs électrochimiques.

3. Caractérisation des matériaux d'électrodes

3.1. Techniques de microscopie

3.1.1. Microscopie à épifluorescence : appareillage

À la fin des expériences en réacteurs électrochimiques, comme précisé en Figure 28, les électrodes sont retirées du réacteur, marquées pendant 10 minutes à l'obscurité avec une solution à 0,03% d'acridine orange (Sigma : A6014, $\lambda_{\text{excitation}} = 490\text{nm}$; $\lambda_{\text{émission}} = 530\text{nm}$ pour l'ADN et $\lambda_{\text{excitation}} = 490\text{nm}$; $\lambda_{\text{émission}} = 630\text{nm}$ pour l'ARN). Les électrodes sont ensuite rincées à l'eau distillée et laissées à l'air, à l'obscurité pour séchage.

Les photographies de microscopie sont prises à l'aide d'un microscope Karl Zeiss AxioTech 100, équipé d'une lampe HBO 50/ac et d'un filtre Zeiss 09 (excitation AP 450-490, réflexion pi 510, filtre LP 520) pour l'épifluorescence. L'acquisition et le post-traitement sont réalisés avec une caméra numérique monochrome (évolution VF) et le logiciel Image-Pro plus v.5. Quelques photographies ont été également prises avec un microscope confocal Leica à tête de balayage AOTF, comprenant 6 canaux TCS SP2 (Castanet-Tolosan-France IFR 40). Un exemple de photographie obtenue avec le microscope confocal est présenté en Figure 29. L'image représente un biofilm de *G. sulfurreducens* développé sur une DSA, marqué à l'acridine orange (Figure 29-A) et sa reconstruction en image 3D (Figure 29-B).

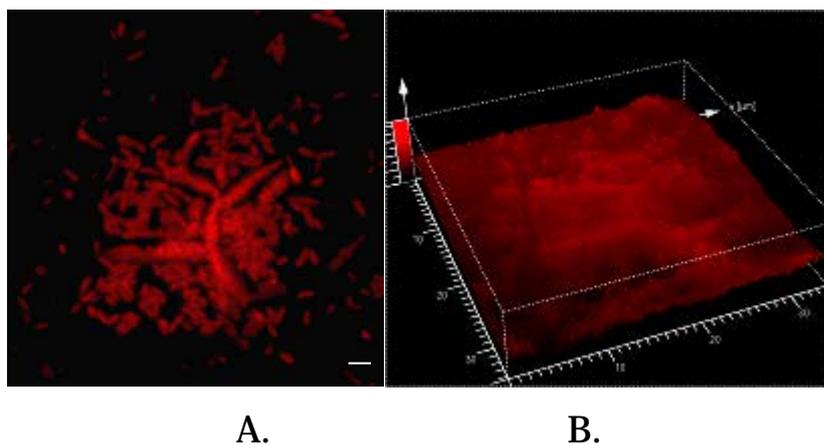


Figure 29 : Biofilm de *G. sulfurreducens* développé sur DSA observé au microscope confocal. Le biofilm a été développé pendant 9 jours à +0,20 V vs. Ag/AgCl mais n'a fourni aucun courant. A : Agrégats de bactéries en 2D, barre=2 μ m. B : Même image en reconstruction 3D.

3.1.2. *Techniques de mesures du taux de recouvrement bactérien*

A la fin des expériences, le taux de recouvrement du biofilm sur les électrodes est estimé par un post-traitement numérique des photographies obtenues en microscopie.

La technique consiste à choisir un seuil d'intensité lumineuse qui divise l'image en deux classes : les zones fortement fluorescentes qui traduisent une colonisation bactérienne, ou celles de basses intensités qui présentent des zones non colonisées. Le taux de recouvrement bactérien est calculé comme le rapport entre l'aire fortement colonisée et l'aire totale analysée. L'erreur sur le taux de recouvrement a été estimée en faisant varier le seuil d'intensité, tout en conservant une image de post-traitement représentative de l'aspect initial du biofilm. Cette erreur s'élève à $\pm 2\%$ et le taux de recouvrement moyen possède un écart-type de 2,5% pour des échantillons peu colonisés alors que cette erreur est égale à $\pm 7\%$ avec un écart-type de 5% pour des échantillons très colonisés. Un exemple de photographie et de son post-traitement est présenté en Figure 30. En noir sont représentées les zones non colonisées, en blanc les zones colonisées par les bactéries (Figure 30-B). Ce type de post-traitement nous a permis de comparer les taux de recouvrement bactérien sur différentes électrodes placées dans un même réacteur, et d'étudier l'éventuelle influence de la polarisation de l'électrode ou de la nature du matériau.

Cette méthode a été mise en œuvre pour analyser les taux de recouvrement bactérien sur les électrodes au cours des expériences en réacteurs électrochimiques, mais aussi au cours des tests d'adhésion effectués avec la cellule à écoulement cisailé (paragraphe 4).

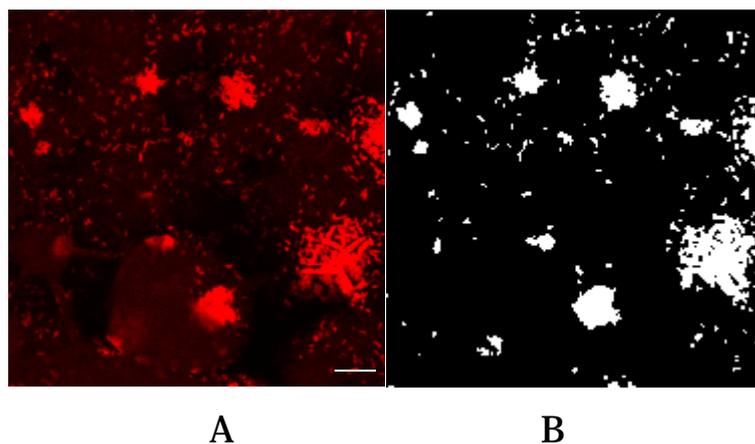


Figure 30 : Biofilm de *G. sulfurreducens* sur DSA observée au microscope confocal. Le biofilm a été développé pendant 9 jours à +0,20 V vs. Ag/AgCl mais n'a fourni aucun courant. A : image originale, barre=10 μ m. B : après post-traitement.

3.1.3. *Microscopie électronique à balayage*

Des photographies par microscopie électronique à balayage ont été prises sur les électrodes prétraitées suivant le protocole décrit en 1.3. Le microscope est un microscope électronique à balayage (MEB) LEO 435 VP, munis de diaphragmes de 30, 50, et 700 μ m. L'acquisition se fait à l'aide du logiciel LEO UIF. Un exemple de photographie d'une électrode d'acier inoxydable est présenté en Figure 31.

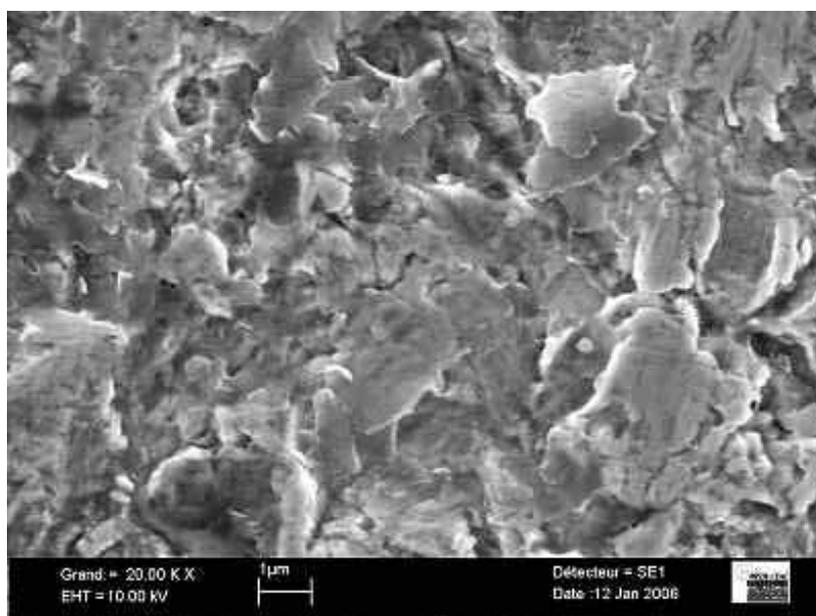


Figure 31 : Photographie au microscope électronique à balayage d'une électrode d'acier inoxydable UNS 31254.

3.1.4. Analyse de la rugosité des matériaux

La morphologie et la rugosité des électrodes prétraitées (protocole décrit en 1.3) ont été caractérisées par l'utilisation d'un interféromètre à lumière blanche Zygo New View 100 OMP-0348K et le logiciel MetroPro. Les mesures ont été effectuées à une distance de 100 μm de la surface de l'électrode. Des topographies de surface jusqu'à 100 μm de haut peuvent être détectées avec une résolution de 0,1 μm . La méthode a été employée pour caractériser la rugosité moyenne (R_a) des surfaces. Cette rugosité moyenne correspond à la moyenne des hauteurs entre les pics hauts et les pics bas de la surface analysée.

Cette technique, basée sur le principe de l'interférence lumineuse, présente de nombreux avantages (rapidité de la mesure, simplicité de mise en oeuvre). En outre, aucune préparation préalable de l'échantillon n'est nécessaire quand celui-ci réfléchit la lumière.

3.2. Mesure d'angle de contact

La mesure d'angle de contact rend compte de l'aptitude d'un liquide à s'étaler sur une surface par mouillabilité. La méthode consiste à mesurer l'angle de la tangente du profil d'une goutte déposée sur le support, avec la surface de ce support. La mesure de l'angle de contact permet d'accéder à l'énergie libre de surface. Elle permet aussi la discrimination de la nature polaire ou apolaire des interactions à l'interface liquide solide. On peut ainsi déduire le caractère hydrophile ou hydrophobe d'une surface.

Principe

Lorsqu'une goutte de liquide est déposée sur une surface solide plane, l'angle entre la tangente à la goutte au point de contact et la surface solide est appelé angle de contact θ (Figure 32).

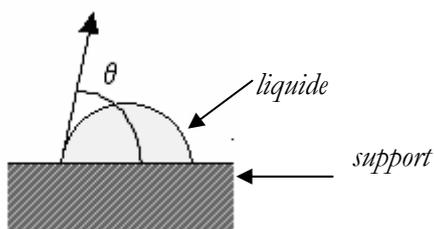


Figure 32 : Schéma représentatif de l'angle formé entre un liquide et un support.

La mesure de cet angle donne trois types d'information :

-Si l'on utilise l'eau comme liquide de mesure d'angle de contact, on peut déduire le caractère hydrophobe (grand angle, faible énergie de surface) ou hydrophile (petit angle, grande énergie de surface) de la surface.

-Si l'on utilise plusieurs liquides différents, on peut accéder à l'énergie libre de la surface, tout en discriminant les composantes polaires ou apolaires de cette énergie en utilisant le modèle de Good Van Oss ou celui de Owens Wendt.

-Si on mesure l'hystérésis entre l'angle à l'avancée de la goutte et au retrait de la goutte, on obtient des renseignements sur la non homogénéité physique (rugosité) ou chimique de la surface.

Dans notre cas les mesures ont été effectuées avec de l'eau osmosée pour déterminer le caractère hydrophile/hydrophobe des matériaux.

Appareillage

L'appareillage utilisé est présenté en Figure 33. Une goutte de liquide de 4 μ L, est déposée à l'aide d'une seringue sur la surface de l'échantillon à analyser.

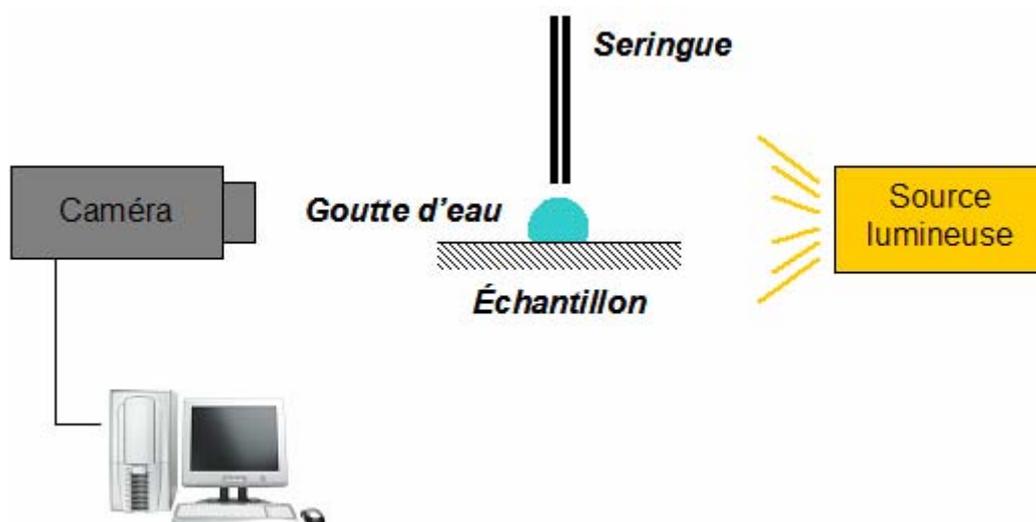


Figure 33 : Principe de la mesure d'angle de contact.

La mesure de l'angle se fait à partir d'images capturées par un PC via une caméra. Le logiciel WINDROP permet de numériser le contour de la goutte par traitement des images.

3.3. Spectroscopie d'impédance

Au cours des expériences faites sur acier inoxydable au LGC (Toulouse) et à l'ISMAR (Gênes) en station marine, des mesures de spectroscopie d'impédance ont été mises en oeuvre. C'est une méthode très utilisée pour l'analyse des systèmes électrochimiques car elle permet de séparer les diverses contributions des phénomènes chimiques et électrochimiques se déroulant à l'interface métal/solution, sur la base de leur constante de temps. Cette méthode consiste à perturber l'état stationnaire d'un système électrochimique, et d'observer comment chaque processus élémentaire perturbé revient à l'état stationnaire, avec son propre temps de réponse. À hautes fréquences, les

phénomènes rapides sont sollicités (transfert de charge) alors qu'à basses fréquences, ce sont les processus lents (réactions de diffusion et d'adsorption). Il est généralement admis que la couche d'oxydes qui recouvre les aciers inoxydables possède des propriétés semi-conductrices. L'étude des semi-conducteurs peut se faire par spectroscopie d'impédance.

Tout d'abord, les principes de la spectroscopie d'impédance et l'analyse en terme de circuits équivalents sont exposés. Ensuite, un rappel de ce que sont les semi-conducteurs est présenté ainsi que la méthode permettant de les étudier. Cette méthode est un cas particulier de spectroscopie d'impédance appelée la méthode de Mott-Schottky.

3.3.1. *Spectroscopie d'impédance et circuits équivalents*

Les mesures de spectroscopie d'impédance présentées dans le chapitre 3 ont été effectuées à l'aide d'un potentiostat (modèle VMP2, EC-Lab v.8.3, Bio-Logic SA) possédant un générateur de fréquence de 10 μ Hz à 200 kHz. Le principe de la mesure consiste à surimposer un signal sinusoïdal δE à la tension continue \bar{E} . Dans notre cas un signal d'amplitude $|\delta E|$, égale à 10mV est appliqué autour de la valeur du potentiel imposé (Figure 34). Il résulte de cette perturbation une réponse en courant de type sinusoïdal de même pulsation ω , superposée au courant stationnaire \bar{I} .

Sur une courbe courant-potentiel, au point (\bar{E}, \bar{I}) on peut définir une impédance complexe Z qui est égale au rapport entre δE et δI .

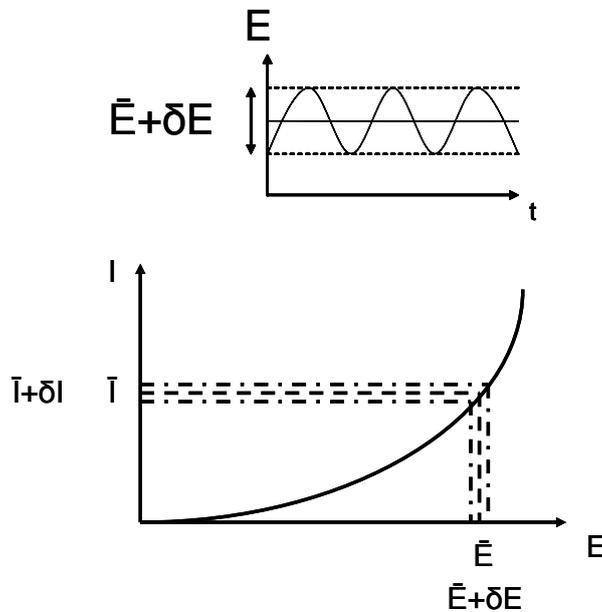


Figure 34 : Schéma descriptif de la méthode de spectroscopie d'impédance. \bar{E} : tension continue ; δE : perturbation sinusoïdale d'amplitude ω ; \bar{I} : courant stationnaire ; δI : courant sinusoïdal

Il est ainsi possible de représenter les performances du système électrochimique par un circuit équivalent de résistances et de capacités dans lequel le courant passe avec la même amplitude et le même angle de phase que dans la cellule réelle. L'interface électrode/électrolyte est généralement simulée par le circuit présenté en Figure 35 dans lequel C_{dl} correspond à la capacité de double couche électrochimique, en parallèle de l'impédance complexe Z_F (impédance faradique) regroupant tous les phénomènes qui se déroulent à l'interface.

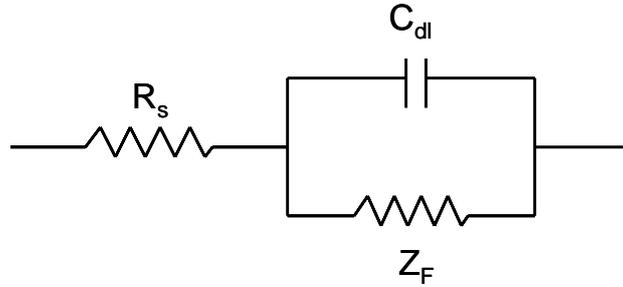


Figure 35 : Modélisation de l'interface électrode/électrolyte. R_s : résistance de la solution (électrolyte) ; C_{dl} : capacité de double couche électrochimique, Z_F : impédance faradique du système

En général, les variations de l'impédance en fonction de la fréquence sont représentées dans le plan de Nyquist en traçant l'opposé de la partie imaginaire ($-Z_i$) de l'impédance en fonction de sa partie réelle (Z_r).

Quand seuls les transferts de charge rentrent en jeu, l'impédance Z_F est réduite à une résistance R_t , appelée résistance au transfert de charge. Dans ce cas, l'impédance totale du système est représentée par un cercle centré sur l'axe des réels, de rayon $R_t/2$ (Figure 36). L'intersection du demi-cercle avec l'axe des abscisses $Re(Z)$ dans les hautes fréquences, représente la résistance de la solution, alors que dans les basses fréquences, cette interception correspond à l'addition de la résistance de la solution R_s et de celle au transfert de charge ($R_s + R_t$).

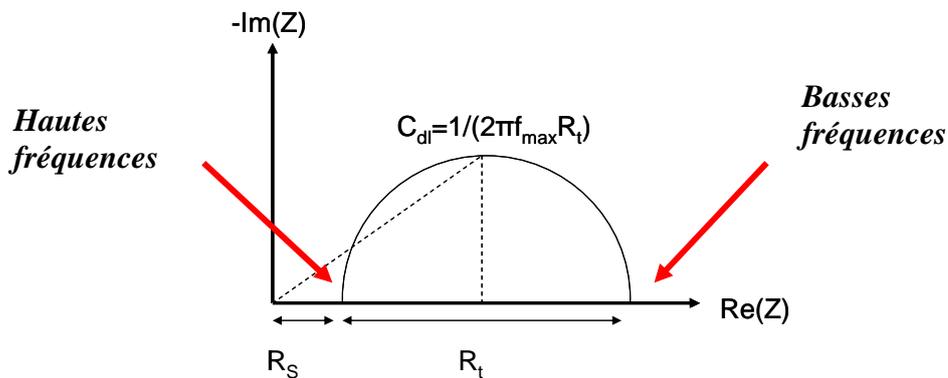


Figure 36 : Diagramme d'impédance caractéristique d'une interface électrode/solution avec

$$Z = R_s + \frac{R_t}{1 + \frac{R_t}{jC_{dl}\omega}}$$

Pour des piles à combustible, ces diagrammes de Nyquist se composent typiquement d'un demi-cercle et d'une partie linéaire, qui représentent la résistance de l'électrolyte ainsi que la résistance au transfert de charge et la résistance de diffusion respectivement (Katz et al. 2003b).

Dans notre cas d'étude, mettant en jeu l'interface électrode en acier inoxydable/biofilm électroactif/solution, le système a été modélisé par une combinaison en série et/ou en parallèle de résistances et d'éléments à phase constante (*Constant phase element*: CPE). Chaque élément répond de manière unique à la perturbation appliquée et en conséquence possède une impédance propre. Le Tableau 8 regroupe les impédances caractéristiques des principaux éléments utilisés dans le chapitre 3.

<i>Élément</i>	<i>Résistance</i>	<i>Capacité</i>	<i>Élément à phase constante (CPE)</i>
Impédance (Z)	R	$\frac{1}{jC\omega}$	$\frac{1}{Q(j\omega)^\alpha}$

Tableau 8 : Impédance des principaux éléments électriques utilisés dans le chapitre 3

Avec R : valeur de la résistance en Ω , C valeur de la capacité en F (Farad ou $\Omega^{-1}.s$), Q valeur de la pseudocapacité en $\Omega^{-1}.s^\alpha$, α exposant inférieur à 1 représentant l'écart à l'idéalité, j imaginaire ($j^2=-1$).

Les résistances caractérisent une limitation du courant au travers, par exemple, de la solution R_s . Une limitation due au transfert de masse sera symbolisée par une résistance au transfert de charge : R_c . Les capacités représentent la quantité de charge électrique stockée pour un potentiel donné. Un élément à phase constante (CPE) est une pseudocapacité ou capacité non idéale dont l'écart à l'idéalité est traduit par le facteur α . Ce facteur est généralement compris entre 0,7 et 0,9. S'il vaut 1, on se trouve en présence d'une capacité pure.

En plus d'une étude de spectroscopie d'impédance à potentiel imposé sur une gamme de fréquences (représentée par des diagrammes de Nyquist), des analyses à fréquence fixe sur une gamme de potentiels ont été mises en œuvre. Ce sont des études de Mott-Schottky qui sont spécifiques de l'étude des semi-conducteurs.

3.3.2. Les semi-conducteurs

Les propriétés des semi-conducteurs et leurs différences avec les conducteurs peuvent être comprises en observant les structures électroniques de ces matériaux (Bard A.J. et al. 2000). Leur structure électronique est discutée en terme de bandes d'énergie. De la même façon que les atomes isolés, caractérisés par des orbitales occupées ou vacantes, sont assemblés sous forme de maille contenant environ 5.10^{22} atomes.cm⁻³, des orbitales moléculaires se créent au cours de la formation d'un solide cristallin (par exemple le silicium Si). Ces orbitales sont si proches qu'elles se retrouvent dans des bandes continues : la bande de valence où les orbitales sont occupées et la bande de conduction où les orbitales sont vacantes (Figure 37).

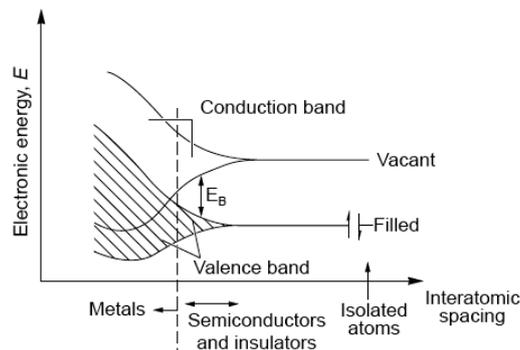


Figure 37 : Génération des bandes d'énergie dans les solides à partir des orbitales atomiques (Bard A.J. et al. 2000).

L'espace d'énergie (E_B) entre la bande de valence et la bande de conduction (*i.e* la différence entre la limite basse de la bande de conduction et la limite haute de la bande de valence) détermine les propriétés électriques et optiques du matériau (Figure 37).

Pour les métaux, les bandes de valence et de conduction se superposent. Les électrons peuvent ainsi se déplacer d'un niveau d'énergie à l'autre, avec une faible énergie d'activation.

Lorsque l'espace E_B entre les deux bandes devient plus important, la conduction devient possible grâce à l'excitation thermique des électrons de la bande de valence à la bande de conduction. On parle alors de matériaux semi-conducteurs. Un tel phénomène engendre la présence d'électrons dans la bande de conduction, qui ont une mobilité électrique et peuvent se déplacer librement dans cette bande. Ces électrons laissent derrière eux des lacunes ou « trous » dans la bande de valence, qui sont mobiles et peuvent se réarranger afin de déplacer le lieu et l'énergie de la lacune (Figure 38-A). Les porteurs de charges, c'est-à-dire les électrons et les trous sont en équilibre dynamique au sein du matériau (Figure 38-B).

Pour les isolants, l'espace entre les deux bandes est suffisamment important pour que les électrons ne puissent pas se déplacer de la bande de valence à la bande de conduction.

Un autre concept important dans la compréhension de l'état solide des matériaux est le niveau d'énergie de Fermi : E_F . Il est défini par l'énergie à laquelle la probabilité qu'un électron occupe un niveau est égale à $\frac{1}{2}$ (quand il est équitablement probable que le niveau soit occupé ou vacant). Pour un semi-conducteur intrinsèque, à température ambiante, ce niveau est situé au milieu du « *gap* » entre les bandes de conduction et de valence (Figure 38-A).

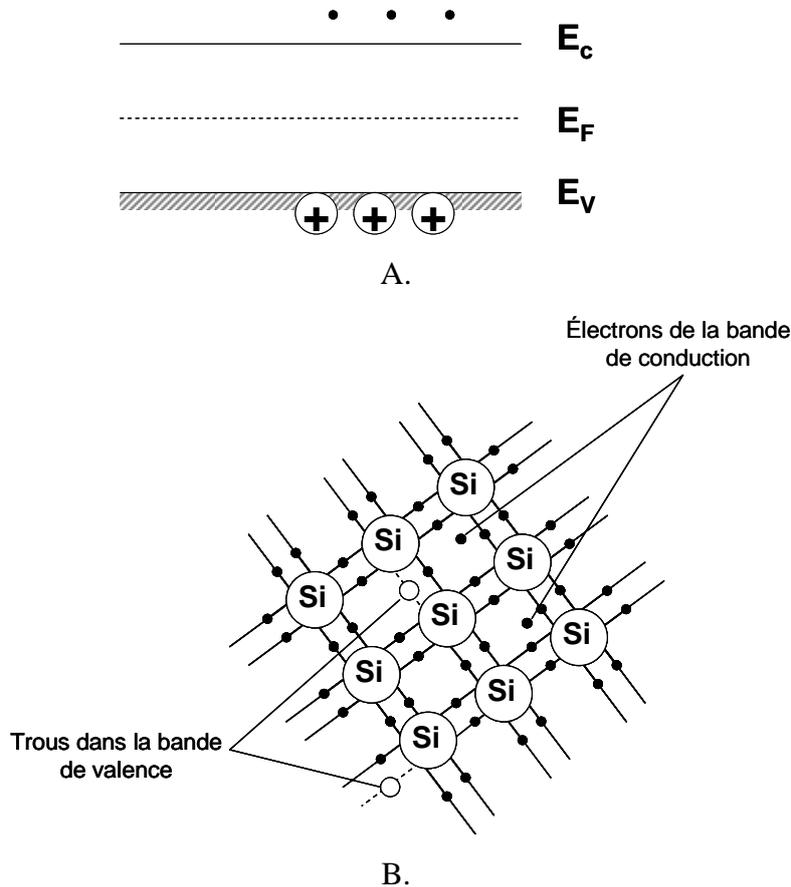


Figure 38 : Représentation schématique A: des niveaux d'énergie d'un semi-conducteur intrinsèque, E_C niveau d'énergie de la bande de conduction, E_V niveau d'énergie de la bande de valence et E_F niveau d'énergie de Fermi. B: d'un semi-conducteur intrinsèque (exemple du Silicium), des électrons apparaissent dans la bande de conduction et des lacunes dans la bande de valence. Adapté de (Bard A.J. et al. 2000).

Par ailleurs, les électrons dans la bande de conduction et les trous dans la bande de valence peuvent aussi être introduits par la substitution d'accepteurs ou de donneurs d'électrons appelés éléments dopants. Les semi-conducteurs dopés dans lesquels la majorité des porteurs de charges sont des électrons sont des semi-conducteurs de type n alors que ceux dans lesquels les trous sont prépondérants sont de type p.

Différence entre l'interface électrode métallique/solution et l'interface électrode semi-conductrice/solution :

Dans le cas d'un métal mis en solution, l'électrode est considérée comme une source ou un puits parfait d'électrons (selon les conditions de polarisation), si bien que la charge superficielle de l'électrode se trouve dans une région d'épaisseur beaucoup plus petite que la couche de Helmholtz¹⁰. La différence de potentiel entre l'électrode et l'électrolyte s'établit alors dans ce cas, presque exclusivement dans la solution, dans la double couche électrochimique.

Dans le cas d'un semi-conducteur, le nombre de porteurs de charges est beaucoup plus faible et la charge au sein du matériau se répartit sur une épaisseur non négligeable, c'est la région de charge d'espace (de quelques Angströms). La différence de potentiel s'établit alors principalement dans l'électrode. Comme pour la double couche électrochimique, la région de charge d'espace peut être assimilée à une capacité, appelée capacité de charge d'espace.

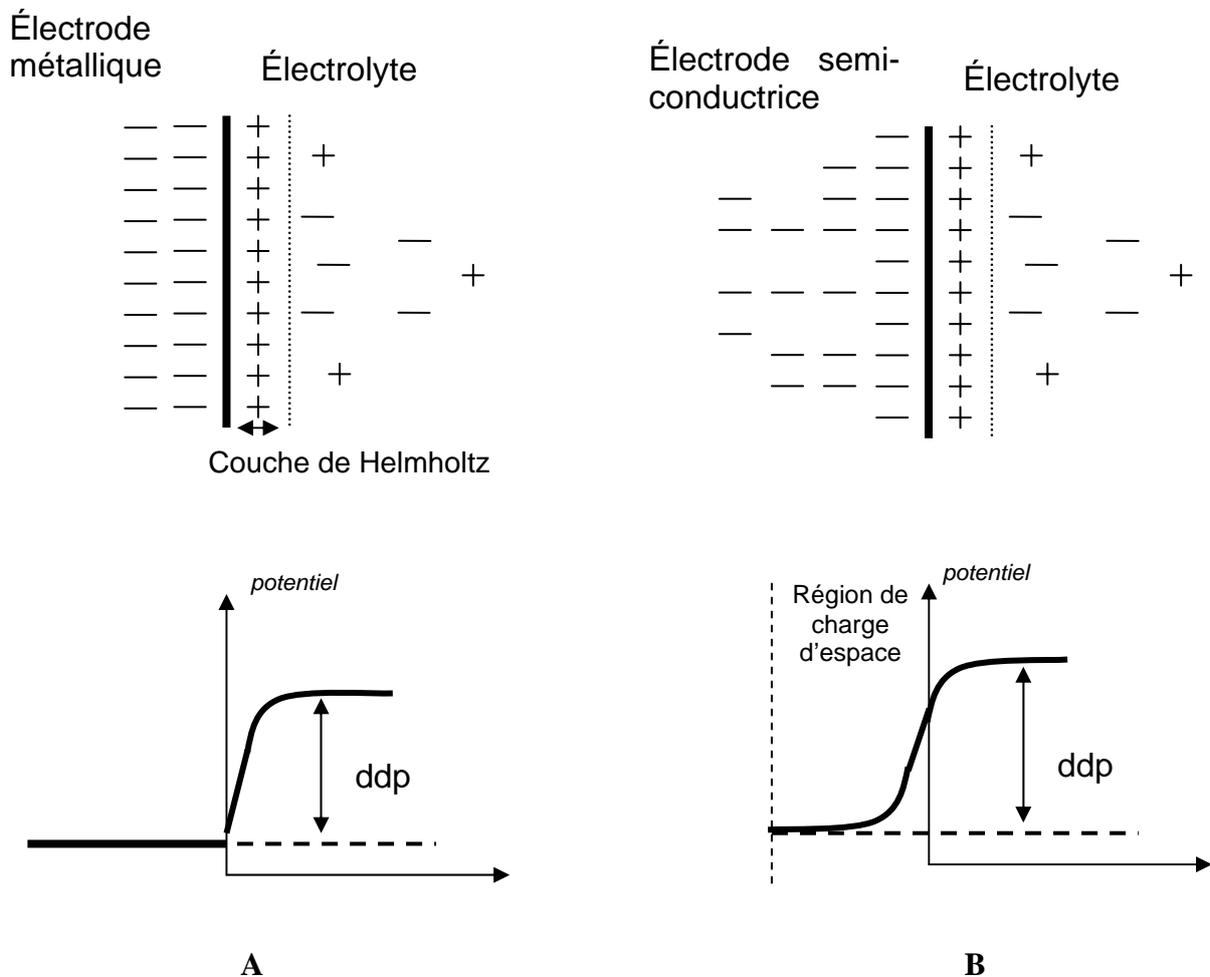


Figure 39 : Représentation schématique de l'interface métal/électrolyte (A) et semi-conducteur/électrolyte (B)

¹⁰ Couche de Helmholtz : quand l'électrolyte est en concentration élevée, cette région contient des ions non adsorbés qui équilibrent la charge de surface de l'électrode.

La différence de potentiel qui s'établit dans un semi-conducteur en contact avec un électrolyte conduit à une courbure des bandes énergétiques de conduction et de valence. Trois situations sont alors possibles :

-À un certain potentiel, l'équilibre électrochimique est tel qu'aucune différence de potentiel ne s'établit entre l'électrode et la solution, ou bien l'électrode est polarisée de manière à ce que cette différence soit nulle. Il n'y a alors aucun transfert de charge, et par conséquent aucune courbure de bande (Figure 40-A). Ce potentiel est désigné sous le nom du potentiel de bande plate E_{fb} .

-Pour un semi-conducteur de type n, lorsque le potentiel imposé $E_{WE\ imposé} > E_{fb}$, les porteurs de charges (électrons) sont transférés profondément dans l'électrode et ne peuvent participer aux réactions électrochimiques. La région de charge d'espace est alors désignée sous le nom de région d'épuisement (Figure 40-B). Respectivement, pour un semi-conducteur de type p, la zone d'épuisement se rencontre quand $E_{WE\ imposé} < E_{fb}$.

-Pour un semi-conducteur de type n, lorsque $E_{WE\ imposé} < E_{fb}$ un excès de porteurs de charge (électrons) apparaît dans la région de charge d'espace, désignée sous le nom de région d'accumulation. Le transfert électronique entre l'électrode et l'électrolyte est alors possible (Figure 40-C). Respectivement pour un semi-conducteur de type p, la région d'accumulation se rencontre quand $E_{WE\ imposé} > E_{fb}$.

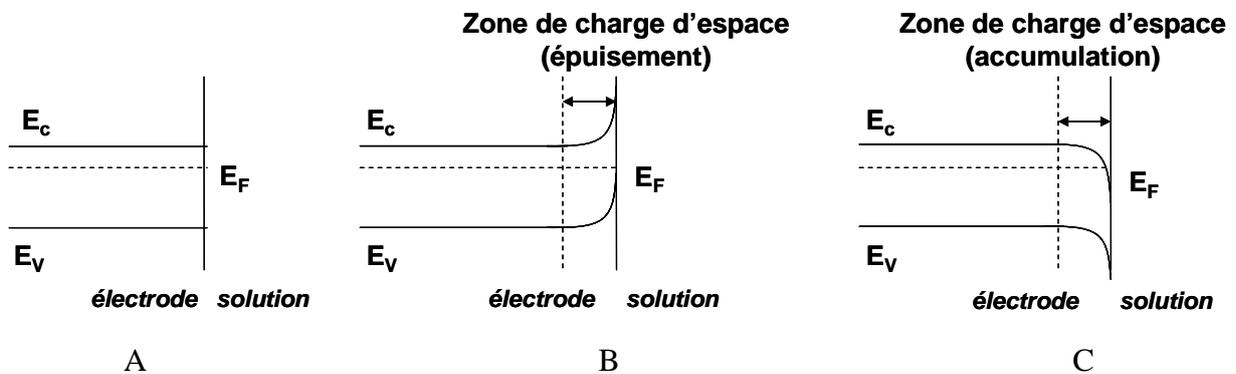


Figure 40 : Effet du changement de potentiel appliqué sur les bords de bandes à l'intérieur d'un semi-conducteur de type n. A : $E_{WE\ imposé} = E_{fb}$, B: $E_{WE\ imposé} > E_{fb}$, C: $E_{WE\ imposé} < E_{fb}$.

3.3.3. Spectroscopie d'impédance : méthode de Mott-Schottky

Avant de présenter le matériel utilisé pour les études Mott-Schottky attardons-nous sur quelques points théoriques.

Le comportement électrochimique de la couche d'oxydes de l'acier inoxydable peut être corrélé à ses propriétés semi-conductrices. Un modèle de film passif existe (Castro et al. 1993) et symbolise

l'interface entre le film passif et la double couche de Helmholtz par la mise en série de deux condensateurs. La capacité résultante est donnée par l'équation suivante :

Équation 14 :
$$\frac{1}{C} = \frac{1}{C_{SC}} + \frac{1}{C_H}$$

où C_{SC} et C_H sont respectivement la capacité de la zone de charge d'espace et la capacité de la double couche de Helmholtz.

Lorsque l'interface film passif/électrolyte est considérée, il faut tenir compte de la capacité de la double couche. En fait, suivant la densité de dopage du semi-conducteur, l'Équation 14 qui donne la capacité globale peut être simplifiée. En effet, que le semi-conducteur soit dopé faiblement (la densité de dopage est d'environ 10^{16} cm^{-3}) ou de façon plus importante (10^{20} cm^{-3}), C_{SC} reste très faible devant C_H . Ainsi la capacité globale C est égale à celle de la zone de charge d'espace C_{SC} .

Le calcul de la capacité d'un semi-conducteur est dérivé de l'Équation 15:

Équation 15 :
$$C = \frac{dQ}{dU}$$

où dQ est la charge par unité de surface et dU la différence de potentiel appliquée. Dérivée l'équation précédente en se basant sur l'équation de Poisson donne pour une dimension :

Équation 16 :
$$d^2\Phi(x) = \frac{-\rho(x)}{\epsilon_0\epsilon}$$

où $\rho(x)$ est la densité de charge à la position x , $\Phi(x)$ le potentiel à la même position, ϵ_0 est la perméabilité du vide (environ $8,85 \cdot 10^{-12} \text{ F.m}^{-1}$) et ϵ la constante diélectrique du semi-conducteur.

L'intégration de cette équation, en tenant compte des conditions aux limites, conduit aux relations de Mott-Schottky :

Équation 17 :
$$\frac{1}{C_{SC}^2} = \left(\frac{2}{\epsilon\epsilon_0 e N_d} \right) \left(U - U_{fb} - \frac{kT}{e} \right)$$
 pour un semiconducteur de type n et

Équation 18 :
$$\frac{1}{C_{SC}^2} = \left(\frac{2}{\epsilon\epsilon_0 e N_A} \right) \left(-U - U_{fb} - \frac{kT}{e} \right)$$
 pour un semiconducteur de type p

où N_d et N_A les concentrations des donneurs et accepteurs dans les semi-conducteurs n et p respectivement, e la charge élémentaire ($-1,6 \cdot 10^{-19} \text{ C}$ pour les électrons, $1,6 \cdot 10^{-19} \text{ C}$ pour les trous),

U_{fb} le potentiel de bande plate, U le potentiel de mesure, k la constante de Boltzmann (environ $1,38.10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$) et T la température absolue.

La distribution de charge à l'interface semi-conducteur/électrolyte est déterminée en mesurant la capacité de la couche passive en fonction de la tension de l'électrode U . La relation de Mott-Schottky exprime la dépendance de la capacité de charge d'espace d'une électrode de semi-conducteur par rapport au potentiel (L'Hostis et al. 2003).

Lorsque la courbe expérimentale $C^2 = f(U)$ comporte des portions linéaires alors le système se comporte comme un semi-conducteur. Sur chaque portion linéaire :

- le signe de la pente permet de connaître le type de semi-conduction : type n si la pente est positive, type p si la pente est négative ;
- la valeur de la pente permet de déterminer la densité de porteurs de charge N_d ou N_a pour un semi-conducteur de type n et de type p respectivement.
- l'abscisse du point d'intersection entre la courbe $C^2 = f(U)$ et l'axe des abscisses est à peu près égale au potentiel de bandes plates U_{fb} (en négligeant le terme d'énergie thermique kT).

L'épaisseur de la couche de charges d'espace W peut être calculée à l'aide de l'équation :

Équation 19 : $W = \epsilon\epsilon_0 / C(\text{max})$

où $C(\text{max})$ est égal à la valeur de capacité au maximum de la courbe $C^2 = f(U)$ en F.cm^{-2} (Marconnet 2007).

Au cours des expériences présentées dans le chapitre 3 , les études de Mott-Schottky ont été réalisées avec un multi-potentiostat VMP2 et le logiciel EC-Lab (Bio-Logic SA). Les mesures de capacités sont effectuées à 200 et 1000Hz, dans le domaine de potentiel de -0,50 V à +0,50 V vs. Ag/AgCl, exploré par pas de 50 mV. A chaque pas de potentiel, une tension sinusoïdale de 10mV est surimposée (Figure 41). Les essais de spectroscopie d'impédance de Mott-Schottky effectuées à Gênes, dont les résultats sont présentés dans le chapitre 5, ont été réalisés avec un analyseur de réponse en fréquence (Schlumberger 1255) couplé à un potentiostat (Schlumberger 1286).

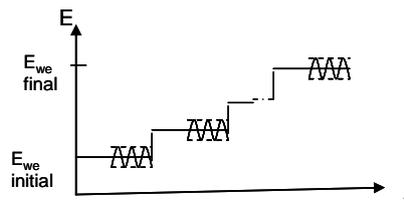


Figure 41 : Schéma descriptif de la méthode de spectroscopie d'impédance de Mott-Schottky. E_{we} : potentiel de l'électrode de travail.

Les résultats obtenus permettent de tracer les courbes $C^2 = f(U)$ dont l'analyse est détaillée pour le cas d'acier inoxydable dans le chapitre 3.

Dans la littérature, la valeur de la constante diélectrique ϵ du film passif d'un acier inoxydable varie entre 12 (L'Hostis et al. 2003) et 15,6 (Marconnet 2007). Dans ce travail, la constante diélectrique a été fixée à 12.

4. Cellule à écoulement

4.1. Préparation des échantillons

Les études d'adhésion/détachement ont été réalisées sur des électrodes recouvertes de biofilms de *G. sulfurreducens* développés en réacteur électrochimique sous polarisation.

Le réacteur est identique à celui utilisé au cours des expériences électrochimiques dans lequel est adapté une couronne métallique. Cette couronne en acier inoxydable (Figure 42) est trouée en onze points taraudés. Une tige de titane taraudée permet d'établir le contact entre le potentiostat et la couronne. Dix tiges de titanes identiques, filetées au deux extrémités, établissent le contact entre la couronne et les électrodes. Ce dispositif permet de polariser dix électrodes simultanément au même potentiel. Le courant global (des 10 électrodes) est suivi grâce au potentiostat présenté en 2.1.

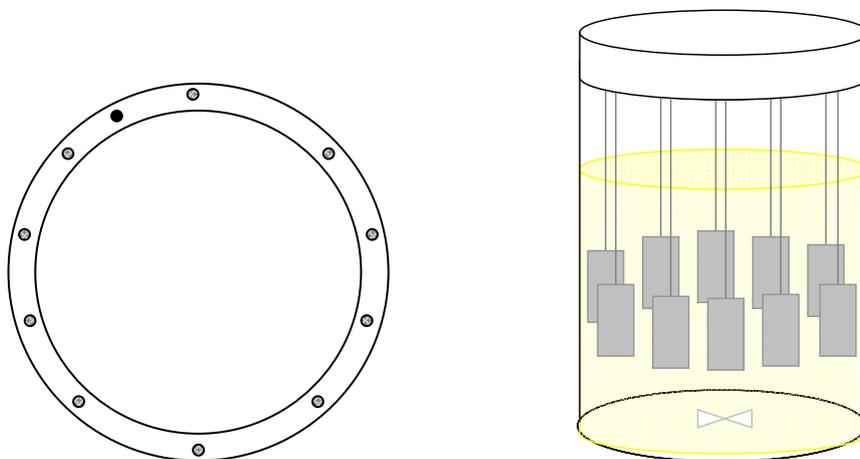


Figure 42 : Schéma de la couronne en acier inoxydable permettant de polariser dix échantillons au même potentiel dans un même réacteur.

4.2. Pré-requis

Le dispositif de cellule à écoulement utilisé dans le cadre de cette étude a été adapté à partir d'un appareil existant, développé au Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés (LISBP) de Toulouse. La caractérisation de la cellule d'un point de vue hydrodynamique a été

effectuée par S. Lorthois (Lorthois 1999). La cellule à écoulement a été dimensionnée pour des tests d'adhésion de levures injectées au cœur de la cellule. Dans ce cas là, la cellule à écoulement était insérée sous un microscope et les images étaient prises *in situ*.

Adapter cette cellule aux tests d'adhésion de biofilm nécessitait de revoir les dimensions de l'appareil. De plus, effectuer les tests sur des électrodes recouvertes par un biofilm développé sous polarisation, impliquait d'insérer les électrodes dans la cellule avant l'assemblage.

La Figure 43 représente le canal d'écoulement de la cellule.

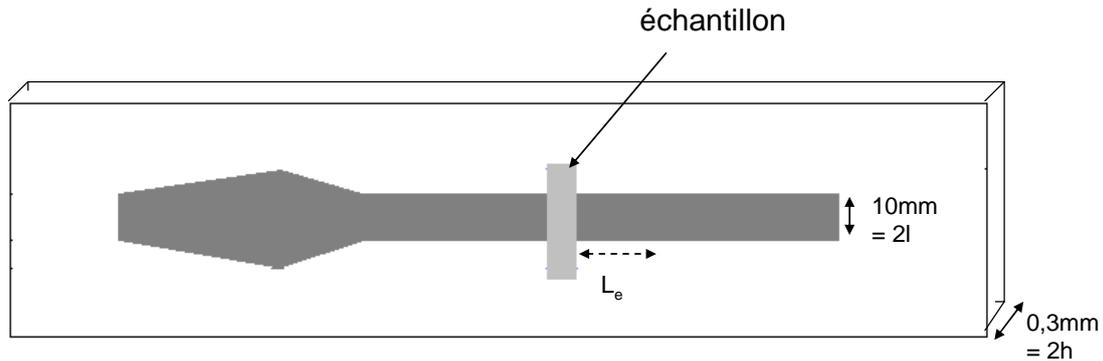


Figure 43 : Schéma représentant le canal d'écoulement

Rappelons simplement ici quelques points importants, nécessaires à la mise en place et au dimensionnement de la cellule :

- l'écoulement au sein du canal (Figure 43) doit être laminaire afin de se placer dans des conditions opératoires parfaitement contrôlées, et d'avoir accès de façon précise au taux de cisaillement s'exerçant le biofilm (Lorthois et al. 2001). Le nombre de Reynolds (Équation 20) doit rester petit devant 1000 pour conserver un régime laminaire dans le canal.

Équation 20 :

$$Re_h = \frac{\rho U h}{\mu}$$

ρ : masse volumique du fluide ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$)

μ : viscosité dynamique du fluide (Pa.s)

h : demi-hauteur du canal (m)

U : vitesse en $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$

- la contrainte de cisaillement pariétale est donnée par l'Équation 21 :

Équation 21 : $\tau_p = \frac{3\mu Q}{4h^2 l}$

avec τ_p : contrainte de cisaillement (Pa)

Q : débit du liquide de circulation (m^3/s)

μ : viscosité dynamique du fluide (Pa.s)

h : demi-hauteur du canal (m)

l : demi-largeur du canal (m)

Cette contrainte est uniforme dans toute la zone parallélépipédique excepté au niveau des couches limites proches des parois de la canalisation et le long d'une région d'entrée, située juste après le divergent-convergent, d'une longueur L_e :

Équation 22 : $L_e = 0,273 \times h \times \text{Re}_h$

- En appliquant l'Équation 22, on obtient pour un débit de 543mL/min (débit maximal de la pompe utilisée), une longueur d'établissement $L_e = 1,85$ cm. D'où le dimensionnement de la cellule présenté en 4.3

L'échantillon, pour être soumis à un régime laminaire et éviter les perturbations dues à l'entrée, doit être placé au moins à 1,85 cm après le convergent.

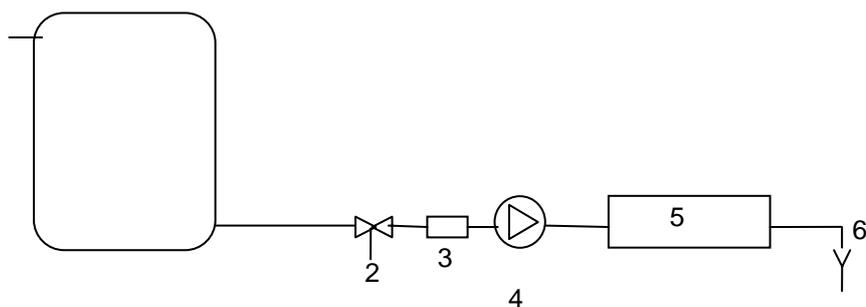
4.3. Matériel

La cellule à écoulement est composée de trois plaques superposées (Figure 44).

- la plaque inférieure en PVC (polychlorure de vinyle) de $48 \times 10 \times 1,4$ cm³, constitue le « porte-échantillon »
- une entretoise en Mylar® évidée constitue le canal d'écoulement de $48 \times 10 \times 0,03$ cm³
- une plaque supérieure en PVC de $48 \times 10 \times 1,4$ cm, dans laquelle sont percées les orifices d'entrée et de sortie de fluide. L'entrée du fluide est munie d'un débulleur pour éviter l'injection de bulles au cours des expériences. L'orifice d'entrée est constitué d'une fente de $0,8 \times 0,1$ cm.

Les trois plaques sont maintenues entre elles par des étriers de serrage en aluminium contenant 22 vis. L'étanchéité de la cellule est assurée par les forces de capillarité ainsi créées. La partie parallélépipédique du canal d'écoulement est précédée d'un divergent-convergent afin d'assurer l'uniformité du profil de vitesse en entrée de cette zone.

L'installation (Figure 44) a été mise au point avec l'aide du service technique du LGC. Elle est constituée d'un bac d'alimentation d'eau à niveau constant, d'une pompe à engrenages et de la cellule à écoulement. Le réservoir d'alimentation possède un système de remplissage automatique. La pompe à engrenages (Ismatec distributeur MCP-Z, Fisher Bioblock Scientific) fonctionne dans une gamme de débits de 5,5 mL/min à 543,6 mL/min.



1. Bac d'alimentation avec système de remplissage automatique
2. Vanne d'arrêt
3. Filtre membrane
4. Pompe à engrenages
5. Cellule à écoulement
6. Sortie : évier



Figure 44 : Schéma et photographie de l'installation de la cellule à écoulement cisailé

4.4. Déroulement des essais

Pour chaque expérience, l'échantillon à analyser (électrode de 2,5x1x0,1 cm) est placé dans la zone évidée de la plaque inférieure de la cellule. La cellule à écoulement est assemblée et remplie d'eau (supposée comme possédant une force ionique suffisamment élevée pour ne pas endommager les cellules) à un débit de 20 mL/min environ. La procédure de détachement est ensuite amorcée. Le débit est augmenté jusqu'à la valeur déterminée et appliquée pendant une durée de 10 minutes. L'écoulement est généré par la pompe à engrenages qui a été étalonnée en vérifiant le débit par mesure volumétrique. A la fin de chaque expérience, la pompe est arrêtée, la cellule démontée et l'échantillon retiré de la plaque inférieure. Le taux de recouvrement bactérien restant sur l'électrode est mesuré à l'aide du microscope à épifluorescence suivant le protocole décrit au paragraphe 3.1.2. La zone d'observation est un carré de 1 cm de côté. Une vingtaine de mesures sont effectuées sur chaque échantillon et au moins deux échantillons sont soumis au même débit de fluide soit une quarantaine de mesures pour un débit donné.

Le taux de recouvrement moyen de biofilm présent initialement sur l'échantillon, en pourcentage est comparé au taux de recouvrement de biofilm détaché après exposition à un taux de cisaillement τ donné. Les résultats sont représentés sous forme d'histogrammes, le taux de cisaillement en abscisses et le taux de recouvrement moyen en ordonnée.

L'épaisseur moyenne du biofilm sur différentes zones de l'échantillon a été estimée après le passage dans la cellule à écoulement. Pour cela, la différence entre le point de focalisation haut et le point de focalisation bas du biofilm a été mesurée grâce au logiciel Image Pro Plus. Trois débits différents ont été testés pour le détachement de biofilm sur DSA et acier inoxydable : 200, 400 et 543 mL/min correspondant à des taux de cisaillement de 20, 44 et 60Pa. Sur les 10 échantillons, au moins trois échantillons sont conservés comme « contrôle » et ne sont pas insérés dans la cellule à écoulement afin de considérer le recouvrement initial du biofilm sur des électrodes ayant différents positionnements dans le réacteur.

5. Piles à combustible microbiennes marines installées à Gênes

5.1. Pile en mer

La pile à combustible microbienne marine a été mise en place dans le port de Gênes (Figure 45). Elle est constituée d'une anode et d'une cathode, composées chacune de deux plaques d'acier inoxydable UNS S31254 appelé aussi 254SMO. Les plaques ont pour dimensions 20 x 30 cm², soit une surface globale d'électrode de 1200 cm². L'anode est enfouie 15 m sous le niveau de la mer dans les sédiments marins anaérobies. La cathode est immergée dans l'eau de mer placée en zone aérobie.

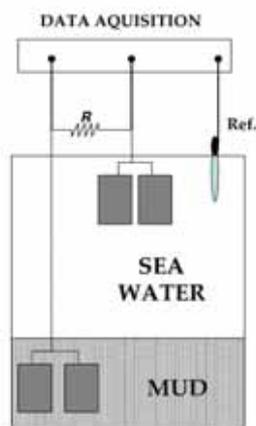


Figure 45 : Pile à combustible marine constituée d'une anode et d'une cathode en acier inoxydable UNS S31254, placée respectivement dans les sédiments marins et dans l'eau de mer aérée. Chaque électrode est composée de deux plaques de 600 cm² de surface géométrique soit une surface totale de 1200 cm²

Les connexions entre les électrodes sont assurées par des câbles électriques gainés en cuivre. Les plaques d'acier sont connectées au fil électrique grâce à un fil en titane. Les soudures acier/titane et cuivre/titane ont été réalisées au CEA de Saclay par M.Roy. Leur isolation a été effectuée par de la résine époxy (résine Epofix et durcisseur STUERS) afin d'éviter tout risque de corrosion. Un fil d'argent recouvert de chlorure d'argent joue le rôle d'électrode de référence. Parfois, une électrode en zinc est aussi utilisée comme pseudo-référence. L'anode et la cathode sont connectées entre elles via des résistances électriques de 1 Ω à 33 k Ω . Des courbes de polarisation sont tracées en mesurant le courant qui traverse la pile et le potentiel aux bornes de chaque électrode pour différentes valeurs de résistances. Au début de l'expérience l'eau de mer était à 13°C.

5.2. Pile en laboratoire

Le prototype de PACM a été installé dans une station marine dans le port de Gênes. La Figure 46 représente le schéma du prototype.

La cathode en acier inoxydable UNS S31254 est plongée dans un bassin de 100 L d'eau de mer thermostatée à 25°C et constamment renouvelée à 6 L/h. La cathode est préparée en la couplant à une électrode de zinc au travers d'une résistance ($R= 50 \Omega$), placée dans le compartiment cathodique. L'électrode en zinc par sa dissolution instantanée dans l'eau de mer (E° dissolution d'environ 1,177 vs. ESH à pH 7) permet d'imposer un potentiel relativement constant sur la cathode, favorable à la formation du biofilm.

L'anode est constituée soit d'une plaque d'acier inoxydable (UNS S31254) identique à la cathode, soit d'une plaque de graphite (Goodfellow, référence : C 000360), ou bien d'une grille de DSA (Dimensionally Stable Anode). Ces grilles sont à base de titane recouvert d'oxydes d'iridium et de

tantale à 16 g/m² (ECS international). Les dimensions des électrodes sont regroupées dans le Tableau 9.

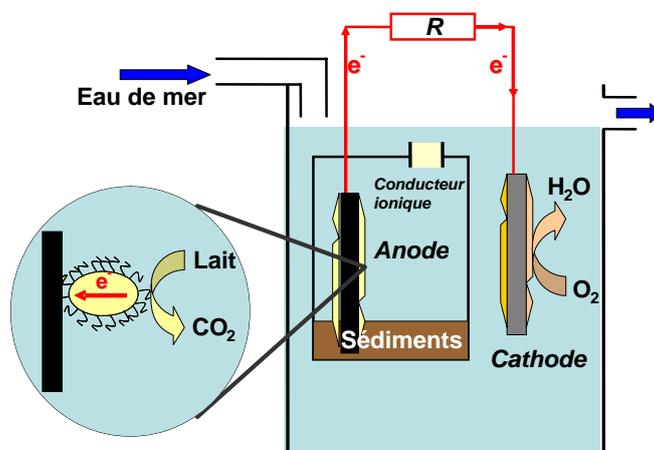


Figure 46 : Schéma du prototype de pile à combustible microbienne implantée en station marine dans le port de Gênes.

Électrodes	Matériaux	Dimensions (en cm)	Surface géométrique considérée (en cm ²)
ANODE	Acier inoxydable UNS S31254 appelé aussi 254SMO	20 x 30 x 0,1	600
	Graphite	20 x 30 x 2	600
	Grille de DSA (surface déployée = surface géométrique x 2)	20 x 10	400
CATHODE	Acier inoxydable UNS S31254 appelé aussi 254SMO	20 x 30 x 0,1	600

Tableau 9 : récapitulatif des matériaux, des dimensions et des surfaces d'électrodes utilisées.

Un réservoir de 35 L immergé dans le compartiment cathodique constitue la chambre anodique. Cette dernière contient 0,2 L de sédiments marins prélevés 15 m sous le niveau de la mer. Le complément est rempli par de l'eau de mer. Le transfert ionique entre les deux compartiments est assuré par du coton. Trois séries d'expériences ont été effectuées, chacune correspondant à un changement de matériaux pour l'anode. Au début de chaque expérience, l'oxygène est éliminé du réservoir anodique par l'addition de sulfite (Na₂SO₃) en excès. Les sédiments, qui ici jouent le rôle d'inoculum, sont préparés avec un ajout de lait tous les 2 à 3 jours et ce jusqu'à ce que la

concentration en sulfite soit proche de celle habituellement rencontrée dans les sédiments marins (300-400 ppm). Le compartiment anodique simule ainsi les conditions rencontrées dans les sédiments.

Au début des expériences, la cathode et l'anode sont reliées soit par un moteur électrique soit par des résistances électriques variant de 1 Ω à 33 k Ω . La résistance interne du moteur est de 25 Ω , et l'hélice tourne quand le système fournit au moins 0,15 V et 6 mA.

Des ajouts de lait ont également été effectués au cours de l'expérience avec une anode en graphite. Les dates d'ajout seront précisées sur les graphiques et dans le texte.

5.2.1. Mesures électrochimiques.

La différence de potentiel entre l'anode et la cathode, ΔV , et le potentiel de la cathode par rapport à l'électrode de référence en Ag/AgCl, E_C , sont relevés indépendamment toutes les heures. Le potentiel de l'anode E_A , est calculé à partir de $E_A = \Delta V - E_C$. Lorsque les électrodes sont placées en circuit ouvert, le potentiel de l'anode et de la cathode sont relevés par rapport à l'électrode de référence Ag/AgCl. Le système d'acquisition de données est composé d'une carte d'acquisition PCI-6034E (National Instrument) contrôlée par le logiciel Labview6. Quand cela est précisé, un moteur faisant tourner une hélice, est connecté aux bornes des électrodes.

5.2.2. Méthodes analytiques.

Les études de spectroscopie d'énergie dispersive (EDS) sont effectuées sur les électrodes en acier inoxydable avec une sonde dispersive d'énergie en Silicium Lithium (Link Analytical mod E5526) de la société EDAX.

Les essais de spectroscopie d'impédance de Mott-Schottky (paragraphe 3.3.3) sont réalisés avec un analyseur de réponse en fréquence (Schlumberger 1255) couplé à un potentiostat (Schlumberger 1286). Les mesures sont faites à 1592Hz, avec un balayage de potentiel de -0,50 V à 0,00 V vs. Ag/AgCl par pas de 50 mV. La sinusoïde possède une amplitude de 10 mV et un temps d'intégration de 0,1 s.

Chapitre 3 :
Transfert électronique entre
Geobacter sulfurreducens et une
électrode

Chapitre 3 : Transfert électronique entre *Geobacter sulfurreducens* et une électrode

Ces travaux ont été effectués dans le cadre du projet de recherche européen « *Electrochemically Active Biofilms* » NEST 508866. Le but de ce projet est de découvrir des biofilms électroactifs dans l'environnement, d'isoler les souches responsables de la production de courant, et enfin de comprendre les mécanismes du transfert d'électrons entre les bactéries et l'électrode. Ce projet regroupe sept partenaires provenant de cinq pays différents : Consiglio Nazionale delle Ricerche-Istituto di Scienze Marine (CNR-ISMAR ; Italie), University Duisburg-Essen-Biofilm Center (UDE-BC ; Allemagne), University Gent (UGent ; Belgique), Química Faculdade de Ciências e Tecnologia-Universidade Nova de Lisboa (CQFB-UNL ; Portugal), Commissariat à l'énergie atomique (CEA ; France), Centro Elettrotecnico Sperimentale Italiano (CESI; Italie) et nous mêmes (CNRS-LGC ; France)

Au sein de ce projet, l'objectif de mon travail de thèse réside en l'optimisation de l'interface matériau/éléments biologiques en terme de densité de courant et de potentiel pour une anode et une cathode de PACM. Les réactions aux électrodes ont été étudiées de manière séparée, c'est-à-dire en utilisant un potentiostat et en testant uniquement les phénomènes d'oxydation ou de réduction, pour découpler les phénomènes rencontrés dans la pile.

Ce chapitre est construit à partir de trois publications, insérées dans le manuscrit. Chaque publication est précédée d'une brève description des protocoles expérimentaux et des résultats essentiels. Ensuite, le texte met en lumière et commente uniquement certains points de la publication.

Dans une première section, le choix de la souche, des matériaux, du potentiel et du milieu utilisé est justifié.

La deuxième section présente l'étude des phénomènes en oxydation. Les expériences ont été effectuées en bioréacteurs électrochimiques à trois électrodes. Des méthodes électrochimiques telles la chronoampérométrie et la voltammétrie cyclique, mais aussi des méthodes d'analyses de microscopie, telles la microscopie à épifluorescence à champ large, la microscopie confocale laser ou électronique à balayage ont été mises en oeuvre. Toutes ces méthodes ont été présentées dans le chapitre 2. Les performances de matériaux industriels, tels que les DSA et l'acier inoxydable,

sont comparés à celles d'un matériau couramment utilisé en tant qu'anode de PACM comme le graphite. Par la suite, des études plus précises sur l'acier inoxydable ont été réalisées par spectroscopie d'impédance afin d'éclaircir l'interaction entre la couche passive de l'acier inoxydable et la bactérie.

Enfin, dans une troisième section, les performances de l'acier inoxydable sont confrontées à celles du graphite en tant que matériau de cathode. Comme pour l'étude en oxydation, le même type d'expériences a été mis en œuvre.

1. Justification du choix du système

1.1. La souche *Geobacter sulfurreducens*

La bactérie *Geobacter sulfurreducens* fut isolée en 1994 à la surface de sédiments prélevés dans un fossé souillé d'hydrocarbures. Cette bactérie a pour dimensions $2 \times 3 \times 0,5 \mu\text{m}^3$ (Figure 47). C'est une bactérie appartenant au groupe des δ -proteobacteria, gram négative, non fermentaire, non-motile et anaérobie facultative. Cette bactérie couple l'oxydation de l'acétate à la réduction de divers accepteur d'électrons : citrate de fer, soufre élémentaire, Co(III)-EDTA, fumarate ou malate. De plus, elle est capable d'oxyder l'hydrogène et de réduire le Fe(III). Par contre, elle n'est pas capable de coupler la réduction du Fe(III) avec l'oxydation de l'élément soufre, l'isovalérate, le succinate, l'extrait de levure, le phénol, le benzoate, l'éthanol, le propanol, ou le butanol.



Figure 47 : La souche *G. sulfurreducens* au MET (Microscope électronique à transmission). Barre= 0,2 μm . (Caccavo et al. 1994)

L'électroactivité de cette bactérie fut découverte en 2003 (Bond et al. 2003). Elle a la propriété d'oxyder l'acétate en CO_2 en utilisant comme seul accepteur d'électrons une électrode de graphite. Elle peut aussi réduire le fumarate en succinate en utilisant une électrode de graphite comme donneur d'électrons (Gregory et al. 2004). Comme le génome de *Geobacter sulfurreducens* était connu (Coppi et al. 2001), les études se sont principalement focalisées sur cette souche.

D'autres études ont montré la capacité de certaines bactéries de la famille *Geobacteraceae* à donner des électrons à une électrode (Reimers et al. 2001; Bond et al. 2002; Gregory et al. 2004) (Gregory et al. 2004). Ainsi *Geobacter metallireducens* est capable d'oxyder le benzoate sur une électrode de graphite (Bond et al. 2002) mais aussi de réduire les nitrates en nitrites avec une électrode comme donneur d'électrons (Gregory et al. 2004). *Desulfuromonas acetoxidans* peut oxyder l'acétate sur une électrode de graphite (Bond et al. 2002). Les valeurs des densités de courant obtenues avec les souches de la famille *Geobacteraceae* sont regroupées dans le Tableau 4 du chapitre 1. Les densités de courant obtenues en chronoampérométrie, sous un potentiel imposé de 0,20 V vs. Ag/AgCl, se situent entre 250mA/m² avec la souche *G. metallireducens* et 1,1A/m² avec *G. sulfurreducens*.

Ce transfert d'électrons extracellulaire a déjà été étudié avec des microorganismes qui transfèrent les électrons à des composés insolubles tels que le Fe(III) et le Mn(IV) (Lovley et al. 1987; Myers et al. 1988; Lovley et al. 1996). Toutefois, les mécanismes qui rentrent en jeu dans les transferts électroniques extracellulaires restent flous. Les études menées sur la souche *G. sulfurreducens* montrent que le rôle des cytochromes *c*, tels que l'OmcB (*Outer membrane cytochrome: Omc*) ou des pilis conducteurs appelés *nanowires* est primordial dans la réduction des oxydes de Fe(III) (Reguera et al. 2005). Une souche mutante ne possédant pas les gènes codant pour la production du cytochrome *c* (Mehta et al. 2005) ou celle des *nanowires* (Reguera et al. 2005) s'est avérée incapable de réduire les oxydes de Fe(III). Certains auteurs pensent que ces principes de transfert électroniques extracellulaires peuvent s'appliquer à ceux rencontrés aux interactions bactérie/électrode (Rabaey et al. 2005c; Lovley 2006a) Toutefois, il a été démontré récemment que des bactéries ne possédant pas le gène correspondant au cytochrome *c* OmcB ou aux pilis conducteurs pouvaient transférer des électrons à une électrode (Holmes et al. 2006). En revanche, les niveaux de transcription de l'ARNm de OmcS sont plus élevés lorsque la souche *G. sulfurreducens* se développe sur une anode de PACM que quand la bactérie est cultivée en suspension avec un accepteur d'électrons soluble (Holmes et al. 2006). De plus, une bactérie qui ne possède plus le gène pour le cytochrome OmcS est incapable de produire du courant. Il semblerait donc que le cytochrome OmcS soit nécessaire au premier contact électrique entre l'électrode et la bactérie et suffisant pour le développement d'un biofilm monocouche de bactéries. Dès que le biofilm devient plus épais, les pilis conducteurs seraient nécessaires pour assurer le transfert d'électrons entre les bactéries du biofilm ou entre les bactéries qui ne sont pas en contact direct avec l'électrode et cette dernière. Cette « connexion » directe entre les *nanowires* et l'anode reste à prouver.

Ces résultats montrent que même si les oxydes de Fe(III) et les électrodes représentent des accepteurs d'électrons solides, il peut y avoir des différences significatives entre les voies impliquées dans le transfert d'électron de la bactérie aux oxydes de Fe(III) et aux électrodes.

La bactérie *G. sulfurreducens* a été choisie dans le projet européen EA-BIOFILMS comme une bactérie modèle. Ses propriétés électroactives ayant déjà été démontrées, ceci permettait d'étudier quels étaient les matériaux les plus intéressants comme anode et cathode de PACM et de les comparer à des données déjà parues dans la littérature. Des densités de courant jusqu'à 1,1A/m² ont été obtenues en oxydation (Bond et al. 2003) avec un potentiel imposé de 0,20 V vs. Ag/AgCl et 0,31A/m² (en valeur absolue) en réduction sous -0,50 V vs. Ag/AgCl (Gregory et al. 2004) sur des électrodes en graphite.

1.2. Le choix des matériaux

Pour l'anode, les expériences en laboratoire ont été réalisées sur plusieurs matériaux, à savoir : graphite, DSA et acier inoxydable (paragraphe 2). La comparaison des matériaux de cathodes s'est effectuée entre l'acier inoxydable et le graphite (paragraphe 4). Le graphite a été adopté comme référence afin de pouvoir comparer nos données à celles de la bibliographie où la plupart des expériences se font avec du graphite.

1.2.1. Dimensionally stable anode ou DSA

Les DSA sont à base de titane recouvert d'oxydes de métal (oxydes de tantale et d'iridium Ir/Ta 10 g/m² - ECS International). Elles sont connues comme ayant des propriétés électrocatalytiques remarquables dans les procédés tels que la production d'oxygène et d'hydrogène par électrolyse, la réduction de l'oxygène, ainsi que l'oxydation de combustibles organiques dans les piles à combustible (Trasatti 2000). Ce sont des électrodes très stables même en milieux agressifs. La DSA est un matériau produit industriellement qui existe sous différentes formes. Elles peuvent être fabriquées sous forme de plaques, de filets, de mailles, ... ce qui est un avantage prépondérant lorsque l'augmentation de la surface est le paramètre principal.

Les DSA n'ont encore jamais été utilisées comme anode recouverte d'un biofilm dans une PACM. On note simplement deux précédentes utilisations dans des réacteurs d'électrolyse à courant imposé : une en tant qu'anode non biologique dans un réacteur composé d'une biocathode (Lopez-Lopez et al. 1999) et une seconde en tant que cathode abiotique dans un système possédant une anode biologique (Park et al. 2005). Les DSA dans ces deux cas ne jouaient que le rôle d'électrode auxiliaire.

Le but de cette étude est de tester les potentialités des DSA comme anodes de PACM et de comparer leurs performances à celle du graphite.

1.2.2. Acier inoxydable

Les aciers inoxydables sont des alliages Fe-Cr et Fe-Ni-Cr contenant éventuellement d'autres éléments soit de type interstitiel comme le carbone ou l'azote, soit de type métallique tels que le molybdène, le titane... Le qualificatif "inoxydable" est habituellement attribué lorsque l'alliage présente une concentration minimale de chrome d'environ 11 à 12%.

Les aciers inoxydables sont couramment désignés par leur nom commercial ou selon le système américain AISI (American Iron and Steel Institute) ou encore selon la norme UNS (Unified Numbering System). Pour nos études, l'acier inoxydable utilisé est un acier austénitique, 254 SMO (Outokumpu-Suède) également désigné UNS S31254 (Cr: 19,9%, Ni: 17,8%, Mo: 6,0%, N: 0,2%, C: 0,01%, Fe: complément)

Les aciers austénitiques ou fer-chrome-nickel contiennent 12 à 30 % de chrome et 7 à 30 % de nickel. Ils sont principalement employés dans les environnements humides. L'augmentation de la teneur en chrome et en molybdène, donne à ces aciers une meilleure résistance aux solutions agressives. Les aciers austénitiques sont plus ou moins résistants à la corrosion généralisée, à la corrosion par crevasse et à la corrosion par piqûre, selon la quantité d'éléments d'alliage. Pour augmenter la résistance de l'acier dans les environnements contenant des chlorures à l'origine de la corrosion par piqûre et par crevasse, il est nécessaire d'augmenter la quantité de chrome, de molybdène. De plus, plus la teneur en nickel est élevée plus le risque de corrosion sous contrainte est réduit. Un des aciers les plus résistants est le 254 SMO (Outokumpu) qui a beaucoup de succès dans les installations de dessalement d'eau de mer, ou les industries de procédés localisées en bord de mer.

Les aciers inoxydables ont la particularité de se recouvrir d'un film d'oxydes dit film passif, leur conférant une bonne résistance à la corrosion. L'épaisseur des couches d'oxydes est généralement comprise entre 1 et 10 nm. L'ensemble des travaux montrent que les caractéristiques des couches d'oxydes dépendent fortement des conditions de formation (Jin et al. 1990; Schmuki et al. 1998): la composition de l'alliage, la nature du milieu environnant, le pH, la température, les traitements de surface (mécanique, chimique ou électrochimique ...). Par exemple, l'augmentation du potentiel auquel se forme la couche d'oxydes augmente l'épaisseur du film (Okamoto 1973; Olefjord et al. 1982; Olefjord et al. 1985; Castle et al. 1989; Maurice et al. 1994).

D'un point de vue électronique, la nature semi-conductrice du film passif est maintenant reconnue bien que la structure électronique exacte de ces films ne soit pas encore bien définie. Les caractéristiques semi-conductrices de l'acier inoxydable et leur interaction avec un biofilm

électroactif seront détaillées dans le paragraphe 3 décrivant les expériences de spectroscopie d'impédance effectuées en laboratoire.

L'acier inoxydable est étudié depuis de nombreuses années dans le domaine de la biocorrosion. En présence de biofilm, ses propriétés vis à vis de la réduction de l'oxygène sont connues depuis de nombreuses années (Scotto et al. 1985; Mollica et al. 1989) et ont été mises en application dans une PACM par notre équipe (Bergel et al. 2005). L'acier inoxydable a aussi été utilisé en tant que cathode de batteries de mer abiotique possédant des anodes en magnésium ou aluminium qui se dissolvent dans l'eau de mer, jouant le rôle d'« anodes sacrificielles » (Hasvold et al. 1997; Wilcock et al. 1997; Hasvold et al. 1999). Orfei et al. emploient une cathode en acier inoxydable dans leur PACM, toutefois ils ne se focalisent pas sur les phénomènes biologiques se déroulant à la cathode, mais simplement sur la protection cathodique de l'acier inoxydable réalisée grâce au couplage avec une anode en graphite sur laquelle se développe un biofilm (Orfei et al. 2006). Il est important de noter que l'acier inoxydable n'a jamais été utilisé comme anode de PACM.

1.3. Le choix du milieu

Toutes les expériences ont été réalisées dans un milieu semblable au milieu de croissance de *G. sulfurreducens*. Le but des expériences étant de maximiser le transfert électronique entre la bactérie et l'électrode, le milieu doit être limité en accepteur d'électrons (dans le cas d'une oxydation) ou en donneur d'électrons (dans le cas d'une réduction). C'est pourquoi lorsque les expériences sont effectuées en oxydation, pour optimiser le transfert vers l'anode, l'accepteur d'électrons (le fumarate pour *G. sulfurreducens*) est enlevé du milieu. Lorsque les tests sont effectués en réduction, c'est l'acétate (donneur d'électrons) qui est retiré du milieu. Ainsi, l'électrode est le seul accepteur (ou donneur) d'électrons dans le système.

1.4. Le choix du potentiel

En travaillant à potentiel imposé, chaque côté de la pile peut être caractérisé séparément. Cette méthode permet de découpler les phénomènes se déroulant dans la pile, en s'affranchissant des réactions qui ont lieu à l'électrode opposée.

Dans la bibliographie diverses bactéries ou environnements ont été testés en potentiel imposé. *Shewanella putrefaciens* (Kim et al. 1999; Kim et al. 2002), *Shewanella oneidensis* MR-1 (Cho et al. 2007), *Escherichia coli* K12 (Niessen et al. 2004a; Rosenbaum et al. 2005), *Geobacter sulfurreducens* (Bond et al. 2003; Gregory et al. 2004), *Desulfuromonas acetoxidans* (Bond et al. 2002), *Geobacter metallireducens* (Bond et al. 2002; Gregory et al. 2004), *Geopsychrobacter electrodiphilus* (Holmes et al. 2004c), *Desulfobulbus propionicus* (Holmes et al. 2004a), *Gluconobacter oxydans* (Lee et al. 2002),

Rhodobacter sphaeroides (Rosenbaum et al. 2005) ou des milieux naturels comme des sédiments marins (Gregory et al. 2004; Lowy et al. 2006), et des boues provenant d'eaux usées (Rozendal et al. 2006) ont été testées en cellule d'électrolyse. Les souches *G. metallireducens* et *G. sulfurreducens* ont la particularité d'avoir été étudiées en oxydation et en réduction (Gregory et al. 2004) contrairement aux autres bactéries qui ont été testées uniquement en oxydation.

La plupart des articles traitant d'oxydation rapportent des valeurs de potentiel imposé de +0,20 V vs. Ag/AgCl, c'est pourquoi les expériences développées dans cette étude ont été effectuées à cette valeur de potentiel.

Peu d'articles présentent des travaux en réduction. L'article traitant de la réduction du fumarate par *G. sulfurreducens* rapporte des valeurs de potentiel imposé de -0,50 V vs. Ag/AgCl. Des expériences de voltammétries cycliques réalisées sur *G. sulfurreducens* montrent qu'un potentiel de -0,60 V vs. Ag/AgCl semble plus adapté, c'est pourquoi les expériences ont été effectuées à ce potentiel.

2. Comparaison des matériaux d'anodes pour le transfert d'électrons avec *G. sulfurreducens*

Les expériences accomplies afin de déterminer les caractéristiques de chaque matériau vis-à-vis de la catalyse de l'oxydation de l'acétate par *G. sulfurreducens* sont décrites dans les articles inclus dans le manuscrit. Chaque papier est précédé d'une description des travaux effectués ainsi que des principales conclusions.

2.1. Comparaison entre DSA et graphite

Le but de cette étude est de comparer l'efficacité de l'interface matériau/biofilm de *G. sulfurreducens* pour l'oxydation de l'acétate, avec des DSA et du graphite qui est le matériau le plus utilisé dans la littérature. Cependant il est important de noter que suivant la provenance du graphite, les caractéristiques peuvent être assez différentes, et bien sûr engendrer des résultats différents en terme de densités de courant obtenues.

ARTICLE N°1: "DSA to grow electrochemically active biofilms of *Geobacter sulfurreducens*"

<http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2007.10.066>

L'article qui suit a été accepté pour publication dans *Electrochimica Acta*. Il présente les résultats obtenus en réacteur électrochimique à trois électrodes. Plusieurs électrodes de travail ont été introduites dans un même réacteur et connectée à une électrode auxiliaire en platine et une électrode de référence Ag/AgCl. Chaque électrode de travail est polarisée individuellement,

généralement à 0,20 V vs. Ag/AgCl, et le courant traversant chaque électrode de travail est enregistré grâce à un multipotentiostat relié à un PC. Des voltammétries cycliques sont effectuées quotidiennement tout au long de l'expérience.

Dans cet article, les résultats essentiels sont :

- l'obtention de densités de courant très élevées sur graphite et DSA par rapport à la bibliographie. Des densités de courant de l'ordre de 8A/m² et de 5A/m² sont obtenues respectivement sur graphite et DSA. Ces valeurs représentent presque un ordre de grandeur de plus que les valeurs rapportées dans la bibliographie (1,1A/m²) (Bond et al. 2003)

- la différence de densités de courant obtenue sur graphite et DSA n'est pas liée au taux de recouvrement bactérien mesuré sur les électrodes de travail.

- cette différence s'explique par la différence de rugosité des matériaux. Le rapport entre de densités de courant obtenues sur chaque matériau est similaire au rapport de leur rugosité moyenne. Une électrode de graphite qui est 1,75 fois plus rugueuse qu'une DSA fournit 1,6 fois plus de courant (article n°1, Figure 3-A).

- les voltammétries effectuées montre que l'oxydation de l'acétate apparaît sur graphite et DSA à partir de 0,05 V vs. Ag/AgCl.

DSA to grow electrochemically active biofilms of *Geobacter sulfurreducens*

Claire Dumas, Régine Basseguy, Alain Bergel*

Laboratoire de Génie Chimique CNRS-INPT, 5 rue Paulin Talabot, BP 1301, 31106 Toulouse Cedex 1, France

Received 16 July 2007; received in revised form 15 October 2007; accepted 26 October 2007

Available online 7 November 2007

Abstract

Biofilms of *Geobacter sulfurreducens* were grown on graphite and on dimensionally stable anodes (DSA) in medium that did not contain any soluble electron acceptor. Several working electrodes were individually addressed and placed in the same reactor to compare their electrochemical behaviour in exactly the same biochemical conditions. Under constant polarization at 0.20 V versus Ag/AgCl, the electrodes were able progressively to oxidize acetate (5 mM), and average current densities around 5 A m^{-2} and 8 A m^{-2} were sustained for days on DSA and graphite, respectively. Removing the biofilm from the electrodes led the current to zero, while changing the medium by fresh one did not disturb the current when contact to air was avoided. This confirmed that the biofilm was fully responsible for the electro-catalysis of acetate oxidation and the current was not due to the accumulation of compounds in the bulk. Cyclic voltammeteries performed during chronoamperometry indicated that the oxidation started above 0.05 V versus Ag/AgCl. The difference in maximal current values obtained with DSA and graphite was not linked to the biofilm coverage ratios, which were of the same order of magnitude in the range of 62–78%. On the contrary, the difference in maximal current values matched the ratio of the average surface roughness of the materials, $5.6 \mu\text{m}$ and $3.2 \mu\text{m}$ for graphite and DSA, respectively.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Electroactive biofilm; *Geobacter sulfurreducens*; Dimensionally stable anode (DSA); Surface roughness; Microbial fuel cell (MFC)

1. Introduction

Production of electrical current from electrodes placed in microbial cultures was observed nearly a century ago [1]. Attempts to convert the chemical energy of organic matter directly into electrical energy with microbial fuel cells (MFC) were subsequently explored throughout the 20th century [2,3]. The first cells have generally coupled the microbial production of reduced compounds that were further used as reactant for abiotic electrochemical oxidation on the anode surface. This type of fuel cell, which coupled problems related to both microbial fermentation and abiotic electrochemical reaction, were not successful in their day. The discovery at the beginning of the 21st century of bacteria that can transfer the electrons, issued from their metabolism, directly onto solid anodes, represented a basic breakthrough [4–6] which has considerably enhanced MFC power output [7]. Several reviews

have been proposed in the recent flourishing literature on the subject [8–10]. Bacteria isolated from natural consortia have been demonstrated to be able to use an anode as unique electron acceptor without the need for artificial electron mediators. Pure cultures of *Geobacter sulfurreducens* [11], *Geobacter metallireducens*, *Desulfuromonas acetoxidans* [4], *Rhodospirillum rubrum* [5], *Shewanella putrefaciens* [6], *Clostridium butyricum* [12], *Aeromonas hydrophila* [13], *Desulfobulbus propionicus* [9] can thus catalyze the electrochemical oxidation of organic compounds such as acetate, glucose, lactate or alcohols.

Numerous studies have aimed at improving electrode materials, cell design and operating conditions to increase MFC efficiency, mainly with natural microbial consortia [14]. Several types of graphite and carbon anodes have been tested to enhance anode performance: carbon granules [15], carbon cloth and foam [5,16], vitreous carbon [17,18], carbon modified with manganese ions or neutral red [19]. Mn^{4+} modified woven graphite used in a one-compartment MFC with sewage sludge led to 1.75 A m^{-2} current density and 787.5 mW/m^2 power density [19]. The influence of the proton exchange

* Corresponding author.

E-mail address: Alain.Bergel@ensiacet.fr (A. Bergel).

membrane (PEM) has been highlighted in an MFC fed with wastewater. Power output was 28 mW/m² with the membrane, while it reached 146 mW/m² when it was removed. With the addition of glucose, removing the PEM increased power density from 262 mW/m² to 494 mW/m² [7]. The influence of various operating parameters was assessed in a membrane-less MFC: increasing the solution's ionic strength from 100 mM to 400 mM by addition of NaCl resulted in power output increasing from 720 mW/m² to 1330 mW/m². Power generation went from 720 mW/m² to 1210 mW/m² by decreasing the distance between anode and cathode from 4 cm to 2 cm [20].

Cyclic voltammetry (CV) has been carried out to advance understanding of microbial electrocatalysis mechanisms, but most of these studies investigated suspensions of microbial cells [12,13,21–24] or freshly adherent micro-organisms [25]. CV on mature biofilms has been more rarely reported [26].

Several studies have implemented constant potential chronoamperometry with pure cultures to focus on the anode process [6,11,21]. In such conditions, i.e. the working electrode polarized at 0.20 V versus Ag/AgCl, current density values of 0.07 A m⁻², 0.25 A m⁻² and 0.15 A m⁻² have been sustained with *R. ferrireducens* [5], *G. metallireducens* [4] and *D. acetoxidans* [4] biofilms, respectively. *G. sulfurreducens* biofilms gave the highest current densities in the range of 0.16–1.14 A m⁻² on graphite anodes [11].

The purpose of the present work was to assess the capacity of dimensionally stable anode (DSA) to grow effective electrochemically active biofilms and to compare them with graphite anodes, which are commonly used in literature. DSA electrodes are made of a titanium base covered by metal oxides (iridium and tantalum oxides in our case). They have revealed remarkable electrocatalytic properties in many industrial processes such as chlorine, oxygen or hydrogen evolution as well as organic oxidations [27]. They are very stable electrodes even in aggressive media, and are industrially produced in form of plates, nets, meshes, expanded metals, etc. They can be packed more compactly than massive and bulky graphite electrodes, which is a preponderant advantage when increasing the surface area is the key parameter. If they revealed effective in growing electrochemically active biofilms, they would be excellent candidates for scaling up industrial MFC pilots. It may be noted that DSA has already been used successfully in a microbial-catalyzed denitrifying process, but the nitrate-reducing micro-organisms were grown on graphite cathode, and DSA only played the role of an abiotic auxiliary electrode [28]. DSA has also been used successfully to grow electrochemically active biofilms in garden compost [29].

With the view to work in rather standard conditions, similar experiments as presented in Ref. [11] were repeated here: pure cultures of *G. sulfurreducens* were grown with acetate as electron donor in a medium where the anodes, polarized at 0.20 V versus Ag/AgCl, were the sole electron acceptors. The reactors were equipped with several individually addressed working electrodes. This technique, which was implemented here for the first time on microbial electrochemistry, avoided the discrepancies that may be induced by the biochemical conditions. It should be now

more systematically used when comparing different electrode materials.

2. Experimental

2.1. Media and growth conditions

G. sulfurreducens strain PCA (ATCC 51573) was purchased from DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen). The growth medium contained (per litre): 0.1 g KCl, 1.5 g NH₄Cl, 2.5 g NaHCO₃, 0.6 g NaH₂PO₄, 0.82 g acetate, 10 mL vitamin mix (ATCC MD-VS), and 10 mL trace mineral mix (ATCC MD-TMS). The medium was autoclaved and completed with a filtered (0.2 μm) solution of sodium fumarate for a final concentration of 8 g/L.

Incubations were done at 30 °C during 5 days in the incubation medium. The number of planktonic cells was evaluated through the absorbance at 620 nm. Absorbance was transformed into cell forming units per millilitre (CFU mL⁻¹) using the calibration formula:

$$[\text{CFU mL}^{-1}] = \text{OD}_{620\text{nm}} \times 472,067 \quad (1)$$

established with measurements in Petri dishes under a N₂/CO₂ atmosphere.

The reactor medium, used in the electrochemical reactor, was the same as the incubation medium, except that it lacked sodium fumarate and contained sodium acetate at a final concentration of 0.41 g/L (5 mM). After its transfer into the reactor, this reactor medium was flushed with N₂-CO₂ (80–20%) to remove oxygen for at least an hour, the flow was then reduced during the experiments. Cells (5%, v/v) were then injected into the electrochemical reactor when the optical density at 620 nm in the incubation medium was around 0.3 (i.e. around 142,000 CFU mL⁻¹).

2.2. Electrodes and reactor

The electrochemical reactor contained approximately 2 L of reactor medium with a 0.5 L headspace (total volume = 2.5 L). The top of the reactor comprised seven sampling ports, and the body two inlet and outlet ports. The junction between the top and the body of reactor was sealed with a clamping ring. Sampling ports were sealed with butyl stoppers. Each electrode was drilled, tapped and a titanium wire was screwed into them to ensure the electrical connection. The titanium wires were shielded with thermoretractable sheaths and were introduced from the top through a holed seal in the sampling port. The electrodes were 5 cm × 2.5 cm × 0.5 cm sheets of graphite (Goodfellow), and 5 cm × 2.5 cm × 0.1 cm, 4.5 cm × 2.5 cm × 0.1 cm or 2.5 cm × 1 cm × 0.1 cm sheets of dimensionally stable anodes (DSA, ECS International Electrochemical Services).

Before each experiment, graphite electrodes were washed for an hour in 1N HCl, and another hour in 1N NaOH to remove possible biomass contamination. DSA were electrolysed at 200 A m⁻² for 5 h in 0.1 M H₂SO₄. Counter electrode

Table 1
Operating parameters and main results from the five reactors

Reactor number	Name	Surface area (cm ²)	10% of maximum current density (day)	Day of maximum current density	Maximum current density (A m ⁻²)	Stability days (75% of maximum current density)
1	DSA.1.1	12.5	3.4	5.7	4.8	4 → 8
	DSA.1.2	11.5	3.6	5.7	5	5 → 8
2	GR.2.1	12.5	0.5	3	7.8	1 → 5
	GR.2.2	12.5	0.5	2	8 (saturation)	1 → 5
3	GR.3.1	12.5	1.4	5	8	2 → 7
	DSA.3.1	12.5	2	5	5.3	3 → 7
4	DSA.4	2.5	5.4	14.7	8.3	10.7 →
5	DSA.5	2.5	5	15.6	8.4	10.8 →

was a platinum grid made up with 0.5 mm diameter wires (90% Pt–10% Ir, Platecxis). The platinum grid was cleaned by means of red-hot heating flame. The Ag/AgCl reference electrode was made with a 1.5 mm diameter silver wire dipped into a HNO₃ solution and then immediately transferred into saturated KCl.

2.3. Electrochemical measurements

Electrochemical experiments were carried out using one to three working electrodes (graphite or DSA) dipped in the same reactor and connected to the same auxiliary (platinum grid) and reference electrodes through a multi-potentiostat (model VMP1 or VMP2, software EC-Lab v.8.3, Bio-Logic SA). A silver/silver chloride (Ag/AgCl) electrode was used as reference, and all potential were expressed with respect to this reference throughout the paper. The potential of the reference electrode in the reactor medium was around $E_{(Ag/AgCl)} = 0.31$ V/SHE. Each working electrode was monitored independently by means of an N-STAT device (Bio-Logic SA). Control samples of electrode materials were sometimes placed in the reactor but not connected to the electrochemical set-up. The working electrodes were maintained at 0.20 V and current was recorded every 300 s. Acquisition was suspended periodically to perform cyclic voltammeteries (CVs) at 2 mV s⁻¹ or 10 mV s⁻¹. At the end of experiments, electrode surfaces were observed by epifluorescence microscopy. In some cases, the biofilm was removed from the electrode surface by scratching it with paper wet with ethanol, the electrode was then rinsed with distilled water and replaced in the reactor medium for performing CV.

2.4. Microscopy methods

2.4.1. Epifluorescence microscopy

At the end of experiment, electrodes were removed from the reactor, stained with a solution of 0.03% orange acridine (A6014, Sigma) for 10 min, then rinsed with distilled water and air dried. Unless otherwise stated, pictures were taken using a Carl Zeiss Axiotech 100 microscope equipped for epifluorescence with HBO 50/ac mercury light source and Zeiss 09 filter (excitor AP 450-490, reflector FT 510, barrier filter LP 520). Image acquisition and processing was achieved with a monochrome digital camera (Evolution VF) and the software Image-Pro Plus v.5.

2.4.2. Scanning electron microscopy

Scanning electron microscopy was accomplished on clean electrodes after pre-treatment (protocol described in Section 2.2). Image acquisition was effected with a SEM LEO 435 VP (diaphragms used were 30 μm, 50 μm and 700 μm). Data were analysed using LEO UIF software.

2.4.3. Surface roughness analysis

The surface morphology and roughness of the clean electrodes (protocol described in Section 2.2) were characterized using a white light interferometer Zygo New View 100 OMP-0348K monitored with a MetroPro software. The measurements were carried out with a sampling distance of 100 μm from the coupon surface for both electrode materials. Surface topographies with features up to 100 μm high can be determined with a vertical resolution down to 0.1 nm. The method was used to characterize the average roughness (R_a) of the surfaces.

3. Results and discussion

The electrodes (pre-treated as described in Section 2.2) were placed in reactors containing 2 L (reactors 1–3) or 0.5 L (reactors 4 and 5) sterile reactor medium and were individually polarized at 0.20 V versus Ag/AgCl. The reactors were inoculated (5%, v/v) with *G. sulfurreducens* previously grown in incubation medium for 5 days at 30 °C. Cyclic voltammograms (CV) were recorded just before inoculation and then periodically during the experiment. Five experiments were carried out following the same procedure. A few coupons that were not polarized were also set in some reactors. All electrodes showed the same general shape of current evolution, as represented in Fig. 1: an initial lag period followed by sigmoid increase and final stabilisation. The parameters describing the curves were gathered in Table 1: the day when 10% of maximum current density was reached, the day when current density achieved its maximum value, maximum current density and current stability, i.e. the period when current density remained higher than 75% of its maximum value.

3.1. DSA and graphite anodes under chronoamperometry

The two dimensionally stable anodes (DSA) implemented in reactor 1 exhibited exactly the same evolutions in current

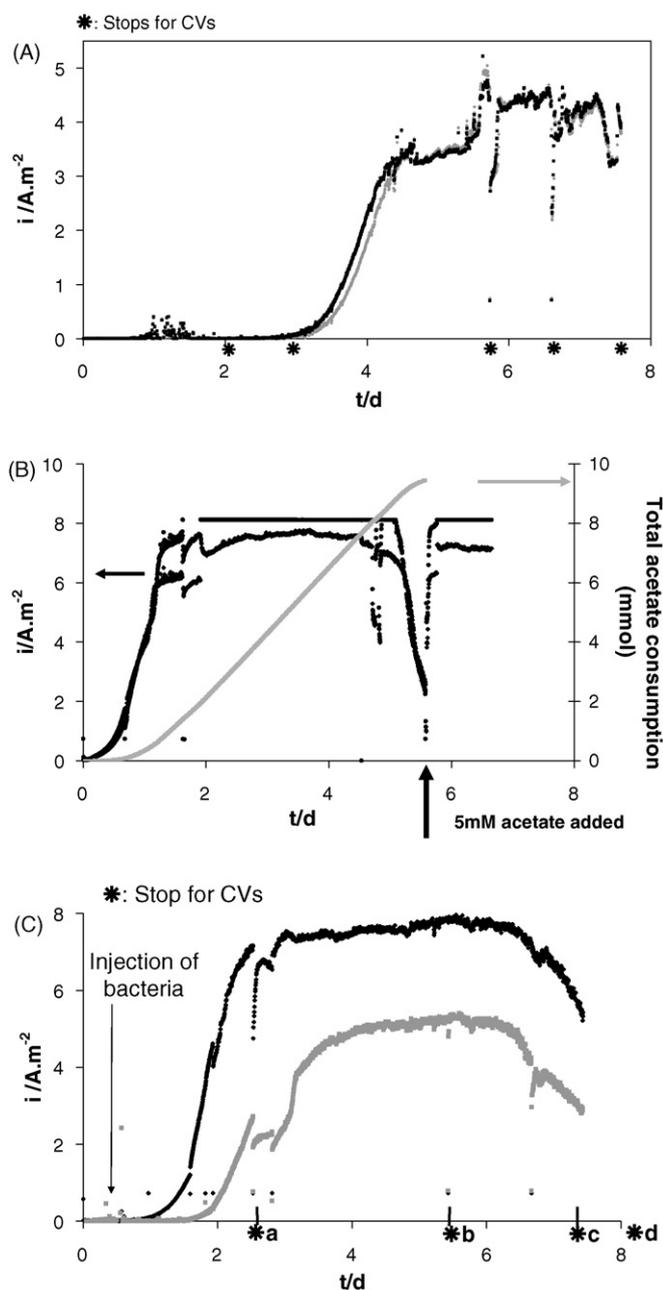
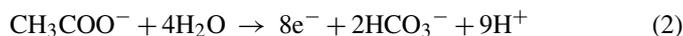


Fig. 1. Evolution of the current density with time on DSA and graphite electrodes exposed to *Geobacter sulfurreducens* culture and polarized at +0.20 V vs. Ag/AgCl. Injection of 5% (v/v) of bacteria; medium containing 5 mM acetate as electron donor and no electron acceptor; stars (*) indicate the interruptions for CV recording. (A) Reactor 1 with two DSA electrodes (■: DSA1.1; ◆: DSA1.2), bacteria inoculated at day 0. (B) Reactor 2 with two graphite electrodes (GR2.1 and GR2.2), bacteria inoculated at day 0. The acetate consumption (mmol) was derived from current integration. (C) Reactor 3 with a DSA and a graphite electrode (■: GR3.1; ◆: DSA3.1), bacteria inoculated at day 0.12 (i.e. 3 h).

density versus time (Fig. 1A) although they were individually addressed. The current started to increase a few days after inoculation, reaching an average plateau around 4.4 A m^{-2} , which remained stable for more than 2 days, with maximum peaks up to 4.8 A m^{-2} .

Two graphite anodes were tested in the same way in reactor 2. Current density began to increase after only 1 day of culture,

reaching a maximum value in the range $7.5\text{--}8 \text{ A m}^{-2}$ after 2 or 3 days for both electrodes (Fig. 1B). This maximum value was limited for electrode GR2.2 because of the saturation threshold of the electronic set-up at 10 mA. Current density was stable for 4 days and dropped dramatically on day 5. It has been demonstrated in the same conditions that *G. sulfurreducens* oxidizes acetate to CO_2 with eight electrons exchanged:



transferring directly these electrons to the anode [11].

Assuming the same reaction pathway, the number of mole of acetate consumed by electrochemical reaction was derived from the integration of the current supplied by the two electrodes, as reported in Fig. 1B. Current integration indicated that around 9 mmol acetate should be consumed at day 5, which suggests that the current decrease starting at this date was due to acetate depletion. According to current integration, the 10 mmol acetate that were contained initially in the reactor (5 mM in 2 L medium) should be completely consumed at day 5.6, exactly when current fell to zero. Addition of 5 mM acetate to the medium, made the current density fast increase close to maximum value, confirming that the current decrease was due to the complete consumption of acetate. These results are consistent with the high coulombic efficiency of *G. sulfurreducens* in catalysing the electrochemical oxidation of acetate, as already reported (98.6%) [11]. It must be noted that the current decrease was sudden and sharp; it did not reveal the gradual decrease proportional to the concentration of reactant that would be expected for a common batch electrolysis. Such behaviour has already been observed with microbial electrocatalysis [11]. It should be drawn that the rate of microbial electrocatalysis is not controlled by a common electrochemical kinetics, but rather by a kinetics related to the metabolic processes of the adherent cells, which should not be directly proportional to the concentration of the substrate (here acetate).

The differences in current densities obtained with graphite and DSA electrodes were confirmed by implementing in the same reactor two electrodes of different materials (reactor 3, Fig. 1C). The graphite anode led to higher current, around 8 A m^{-2} , while DSA sustained around 5.3 A m^{-2} . As observed by comparing reactors 1 and 2, the growth phase confirmed to be faster on graphite.

3.2. Medium changing experiments

Experiments 4 and 5 were carried out in a 0.5 L reactor with only one 2.5 cm^2 DSA electrode in each reactor, following the same general procedure. In the experiment 4 (Fig. 2A), the current density increased to 4.3 A m^{-2} and was around 2.3 A m^{-2} at the end of day 9. The electrode was then removed from the reactor and placed in a new one, previously filled with fresh deoxygenated medium (N_2/CO_2). No new inoculation was done. As previously reported [11], current fell to a basal level but restored rapidly. In this second reactor, the current increased to 7.4 A m^{-2} after 1 day, then stabilising at values higher than 8 A m^{-2} . Stirring for 1 day with a magnetic barrel did not have

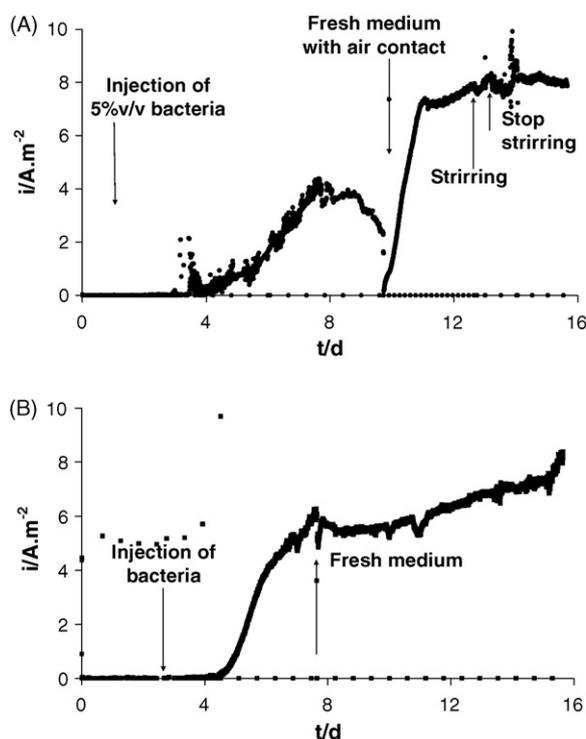


Fig. 2. Evolution of the current density with time on DSA electrodes polarized at $+0.20$ V vs. Ag/AgCl exposed to *G. sulfurreducens* culture, and effect of medium renewal by a fresh one (with 5 mM acetate as electron donor and no electron acceptor). (A) Electrode was taken out of the reactor 4 and placed in a fresh medium. Air-contact was not avoided. (B) Electrode was kept in the reactor 5 under N_2/CO_2 atmosphere during the medium replacement.

any effect on the current value, indicating that mass transfer of acetate in the solution was not a rate limiting step.

In experiment 5, when the current was stabilised around 6 A m^{-2} (Fig. 2B), the reactor was purged keeping it below the N_2/CO_2 atmosphere. It was immediately refilled with fresh medium that had previously been deoxygenated so as to avoid contact with air. In this case, the current was not disturbed by the change in medium. The sharp current decrease that was observed in the previous experiment should consequently be due to transient introduction of air into the reactor. This last experiment also pushed away the assumption that hydrogen resulting from water electrolysis on the auxiliary electrode might oxidize on the biofilm-covered anode, and so increase artificially the current measured [30]. Moreover, all experiments were performed here under continuous N_2/CO_2 bubbling in order to avoid this possible artefact due to hydrogen cycling.

In reactors 4 and 5, the current densities obtained in the fresh media were always higher than the ones obtained in previous experiments. It may be explained by the occurrence of antagonist phenomena: (i) the increase of biofilm effectiveness with time, due to the increase of the number of active cells or to higher electron transfer rates, (ii) the depletion of acetate and (iii) accumulation of products and metabolites in the bulk that may inhibit the active cells. Before medium renewal, the slow decrease in acetate concentration and possible accumulation of inhibiting compounds may be more or less balanced by the slow increase in biofilm effectiveness. This resulted in a cur-

rent density plateau. The medium renewal restored the acetate concentration at the initial value of 5 mM and may also remove possible inhibiting compounds, the intrinsic effectiveness of the biofilm was no longer masked by the operating conditions and it was consequently able to supply maximal current values.

3.3. Cyclic voltammetry (CV) on DSA and graphite anodes

CV performed at 10 mV s^{-1} on the graphite electrode (GR2.2, Fig. 3A) at day 0 just before bacteria injection in the reactor 2 showed a clear redox peaks around -0.44 V (-0.13 V/SHE). Their height proportional to scan rate (data not shown) indicated a redox system due to adsorbed compounds, certainly coming from the culture medium. CV performed at 10 mV s^{-1} on day 0.8 (i.e. 19 h) during current increase, when the electrode sustained 2.5 A m^{-2} , revealed two new redox couples at -0.075 V and $+0.150$ V (0.235 V/SHE and 0.460 V/SHE, respectively). It has been proved that several outer membrane cytochromes play a key role in the direct electron transfer of *G. sulfurreducens* to solid electrodes [31]. The cytochrome *c* OmcS has been demonstrated to be involved in the electron transfer to solid electrodes [31] but, to our knowledge, its redox potential has not been determined yet. A redox potential of -0.167 V/SHE has been reported for another *G. sulfurreducens* periplasmic and extracellular cytochrome involved in the Fe(III) reduction [32]. Even if this redox potential has been determined by titration in quite different conditions, the values found here, with more than 400 mV difference, did likely not correspond to this cytochrome. The genome of *G. sulfurreducens* encodes 111 *c*-type cytochromes, which represents a significantly higher number than for all other micro-organisms whose sequence is available [33]. The peak observed here could thus be related to another *c*-type cytochrome or to redox proteins also involved in the electron transfer chain, as already demonstrated [34].

As the current increased during chronoamperometry, a high oxidation current appeared on the CV, which increased and logically masked the peak at -0.075 V. Fig. 3B reports CV performed at 2 mV s^{-1} on the graphite electrode at day 2 when the electrode (GR2.1) sustained 6.9 A m^{-2} . At the end of the experiment, the biofilm was removed from the electrode and put back to the reactor, any oxidation process disappeared. As it has already been shown in a different way [11] the biofilm-driven catalysis was responsible for the whole oxidation reaction and neither planktonic cells nor metabolites were involved in this oxidation process. On the contrary, the reduction reaction, which occurred on both the biofilm-covered and the cleaned electrodes, was certainly due to the reduction of a metabolite produced during electrolysis. In literature, similar oxidation signals have already been observed with biofilms formed in different MFC. A biofilm-covered electrode, formed in a MFC containing potato-processing sludge, revealed redox peaks centred at 0.18 V versus Ag/AgCl when placed in cell-free media, showing that the redox couple was embedded within the biofilm [25]. Similarly, a MFC inoculated with domestic wastewater and fed with acetate revealed peaks around -0.30 V versus Ag/AgCl , which disappeared on CVs carried out in the same solution after biofilm removal from the anode surface [26].

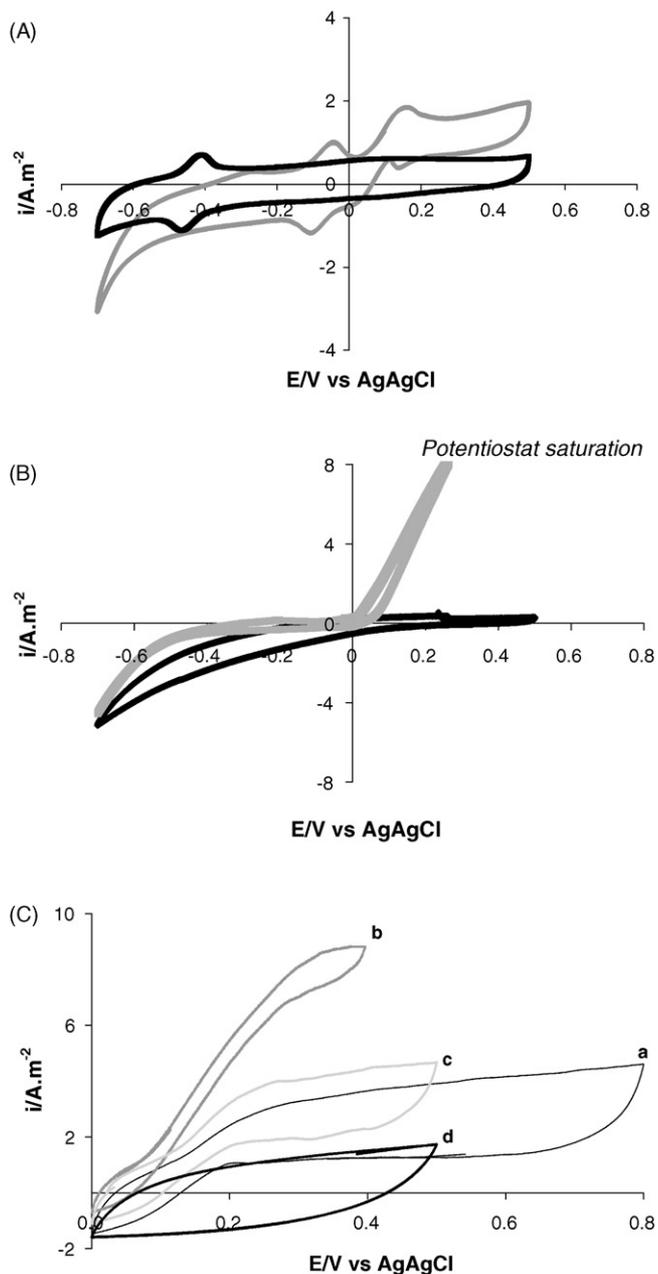


Fig. 3. Cyclic voltammeteries performed during the chronoamperometry experiments. (A) Reactor 2: graphite GR2.2 at 10 mV s^{-1} before bacteria injection (■) (day 0) and after bacteria injection (◆) (day 0.8, i.e. 19 h). Current density sustained on day 0.8 $\approx 2.5 \text{ A m}^{-2}$. (B) Reactor 2: graphite GR2.1 at 2 mV s^{-1} with biofilm (■) on day 2 and after cleaning (◆) on day 8. Current density sustained on day 2 $\approx 6.9 \text{ A m}^{-2}$. CV with the biofilm covered electrode was stopped at a lower upper limit because of the saturation threshold of the potentiostat. (C) Reactor 3: DSA3.1 at 2 mV s^{-1} with a biofilm aged of 2 days (a), 5 days (b), 7 days (c) and after biofilm was removed (d). Biofilm sustained (a) 2.5 A m^{-2} ; (b) 5.2 A m^{-2} ; (c) 2.8 A m^{-2} .

Fig. 3C depicts the CV performed in reactor 3 at 2 mV s^{-1} on the DSA electrode at days 2, 5, 7, and at the end of the experiment with the cleaned electrode dipped again in the reactor medium. The cleaned electrode revealed the common characteristic behaviour of DSA with the charge and discharge of the oxide surface species, without any contribution from dissolved species [35]. In the presence of the biofilm, the scans

revealed a superimposed faradic behaviour, which logically followed evolution in current values that were sustained during chronoamperometry: high current on CV performed at days 2 and 5 and a low current on CV at day 7. As in the case of graphite, the presence of the biofilm was responsible for the whole faradic process. CV performed at 10 mV s^{-1} with DSA did not reveal any redox peak, as was the case with graphite, certainly because of the high charge–discharge basic current. Graphite seems consequently more suitable to carry out analytical studies with the objective to decipher electron transfer pathways. The present work indicated that performing CV during biofilm formation under chronoamperometry may be a promising way in this objective, mainly during the first phase of biofilm growth, as the catalytic effect when increasing tends to mask the small peaks due to adsorbed species.

The different experiments revealed the same behaviour of the biofilms in CVs. Oxidation on DSA started at around 0.05 V and showed a plateau from around 0.35 V . Oxidation started at identical potential values on graphite, with a peak observed at -0.075 V at the beginning of biofilm formation. CV performed in suspension of *G. sulfurreducens* cells have reported in literature, which exhibited an oxidation peak at fairly lower potential values, around -0.20 V versus Ag/AgCl [36]. Nevertheless in this study, cells were suspended in solution and they were grown with Fe(III) as electron acceptor instead of fumarate as done here. It may be suggested that the electrochemical features of *G. sulfurreducens* may be pretty versatile, depending on the operating conditions (composition of the culture medium, nature of the electron acceptor, CV recorded with biofilm-coated electrode or with cell suspension, etc.).

3.4. Assessment of coverage ratios

DSA control coupons that were not connected were placed in reactors 2 and 3. A typical picture obtained by epifluorescence microscopy is reported in Fig. 4. The numerical post-treatment was performed by choosing a threshold in light intensity that divided images into two classes: highly fluorescent areas that reveal bacterial colonization (in white on the post-treated pictures), and low light zones (black in the post-treated pictures) that correspond to non-colonized areas. The biofilm coverage ratio was defined as the ratio of the white area with respect to the total area analysed. The error on the biofilm coverage ratio was assessed by varying the threshold of light intensity, while keeping a representative post-treated image with a visual aspect close to the initial picture. It was only $\pm 2\%$. Pictures were taken on five different spots on each electrode, and an average coverage ratio was extracted with a standard deviation of 2.5% .

The DSA control coupons (not connected) showed scattered bacteria (Fig. 4) and small colonies with average coverage ratios of 12% (reactor 2, not shown) and 8% (reactor 3, Fig. 4). A control coupon of graphite in reactor 3 showed the same scattered bacteria and small colonies with a coverage ratio of 7.4% . The raw pictures revealed light grey areas due to parasite fluorescence, which was probably induced by mushroom-like exopolymer structures that grew above the surface, as particularly visible on Fig. 4. The numerical treatment revealed very

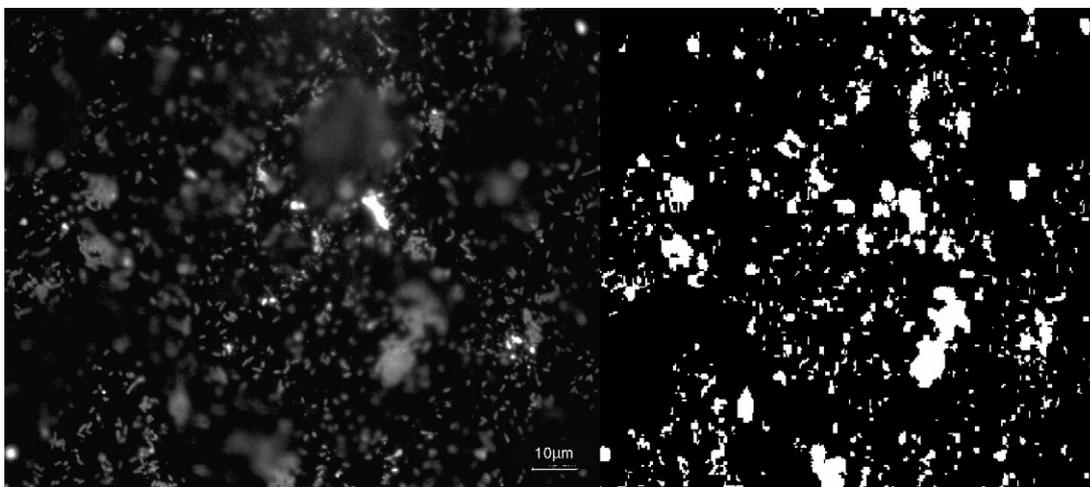


Fig. 4. Microscopic pictures of *G. sulfurreducens* biofilm on control DSA coupon (DSA 3.2) not connected; magnification $500\times$ and numerical post-treatment. White: biofilm-covered surface area (8%), black: free electrode surface area.

efficient in “cleaning” the image from these super-structures, leading to an assessment of the actual coverage ratio.

In the absence of electron acceptor in the reactor medium, the presence of colonies on the surface of not connected coupons was unexpected. It may be assumed that the low colonization observed on the control coupons may be due to the detachment of cells from the anodes contained in the reactor and/or to a basal growth that was maintained by the residual amount of fumarate contained in the inoculum volume. Recording absorbance of the medium as a function of time in reactor 3 indicated a slow continuous growth of planktonic biomass (Fig. 5). Nevertheless, the amount of planktonic cells, around $35,000 \text{ CFU mL}^{-1}$ at the maximum, remained low, confirming that it was only a residual growth. This residual growth diverted a part of the metabolic process from the electron transfer to the electrode.

The connected anodes showed dense biofilms settled on the whole surface area, as shown in Fig. 6 (DSA1.1 and DSA1.2 from reactor 1, which produced 4.8 A m^{-2} and 5 A m^{-2} , respectively). The bacteria formed dense aggregates around $10\text{--}20 \mu\text{m}$ diameter and developed colonization on the whole surface with polymer matrix rising above the focal plan. Defining a strict fron-

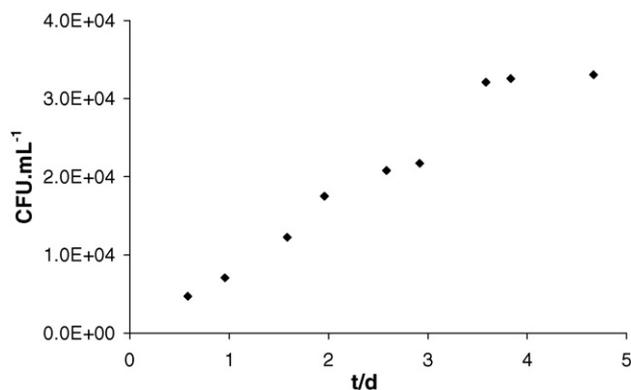


Fig. 5. Evolution of CFU mL^{-1} with time in reactor 3. Absorbance measurements were performed at 620 nm.

tier between colonized and non-colonized areas was less easy, because there were fluorescent cells at several planes above the surface level where the image was focalised, and parasitic fluorescence also resulted from basal adsorption of the staining dye on the biofilm matrix. The assessed error in choosing the light threshold was here of $\pm 7\%$ instead of $\pm 2\%$ for non-connected coupons and a standard deviation of 5%. The anode DSA1.1 showed a coverage ratio of 87% when treated at magnification $100\times$ (Fig. 6A). Magnification $500\times$ lead to a more detailed view and allowed the numerical treatment to make a better distinction between residual light and the fluorescent due to the cell on the electrode surface. The coverage ratio was thus 62% for DSA1.1 (Fig. 6B) and 78% for DSA1.2 (picture not shown). The biofilm formed on a graphite electrode from reactor 2 that sustained 8 A m^{-2} at the end of the experiment had a coverage ratio of 75% and was similar in morphology to the biofilms formed on DSA electrodes. The preponderant part of the biofilm, stained with orange acridine, was green fluorescent (DNA) showing that most part of the bacteria was no longer active, which is logical as the biofilm spent many hours in aerobic condition when analysis were performed.

As a conclusion, the similar biofilm coverage ratios that were obtained on both DSA and graphite anodes cannot explain the significant differences in the current densities that provided both electrodes. In the bibliography, establishing correlations between the current density values and biofilm morphologies or coverage ratios is still in its infancy. The protein quantity contained in the biofilm is an interesting parameter to be correlated with current density [11,30] but it requires scratching the biofilm and cannot give an indication on biofilm coverage ratio. SEM has the great advantage to give detailed pictures, but biofilms have to undergo several dehydrating and preparation steps, which may induce significant modifications in the biofilm structure [7,11]. Here a simpler technique was proposed, which only required a classic microscope, and appeared to give correct assessment of biofilm coverage ratios. Confocal laser scanning microscopy (CLSM) could also be used to perform this method and it seems to be the most elegant technique with the view to

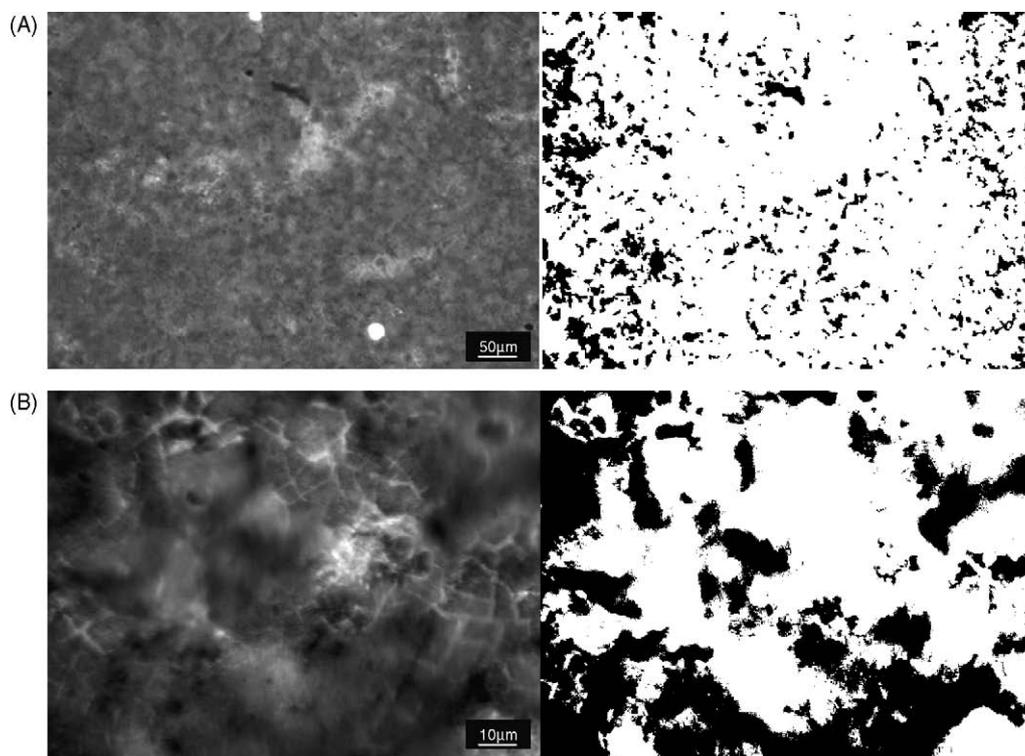


Fig. 6. Epifluorescence microscopy pictures of *G. sulfurreducens* biofilm on DSA electrodes polarized at +0.20 V vs. Ag/AgCl in reactor 1 (DSA1.1) biofilm sustained 4.8 A m^{-2} . (A) Magnification 100 \times , biofilm-covered surface area 87%. (B) Magnification 500 \times , biofilm-covered surface area 62%.

investigate *in situ* biofilm morphology and coverage ratios [30] or even to evaluate biofilm thickness [37].

3.5. Morphology of electrode surfaces

Fig. 7 shows SEM pictures of graphite and DSA electrodes (magnification 2500 \times). Graphite and DSA appeared as rough materials with heterogeneities which seem slightly smaller on graphite. The fine roughness profiles were determined thanks to a light interferometer. The amplitude between the highest and the lowest points of the electrode surface was around $74 \mu\text{m}$ for graphite and $35 \mu\text{m}$ for DSA. Average roughness (R_a) was equal to $5.6 \mu\text{m}$ for graphite and $3.2 \mu\text{m}$ for DSA. The graphite used here was 1.75 times rougher than the DSA surface, while the

current density values (expressed with respect to the geometric surface areas) at 0.20 V were 1.6 times higher for graphite than DSA (around 8 A m^{-2} against 5 A m^{-2}).

It is known that roughness has a crucial effect on bacterial adhesion. Flint et al. [38] reported that adhesion is favoured by entrapment when surface roughness is close to the diameter of bacterial cells. Fouling could consequently be prevented by smoothing the surface roughness from $0.9 \mu\text{m}$ to lower values [39]. Scheuerman et al. concluded that the presence of irregularities increased the quantity of *Pseudomonas aeruginosa* and adherent *Pseudomonas fluorescens* on silicone samples, but that a roughness higher than $10 \mu\text{m}$ had no additional effect [40]. The roughness of the materials presented here were in the order of magnitude of the bacterial dimensions known to be 2–3 μm

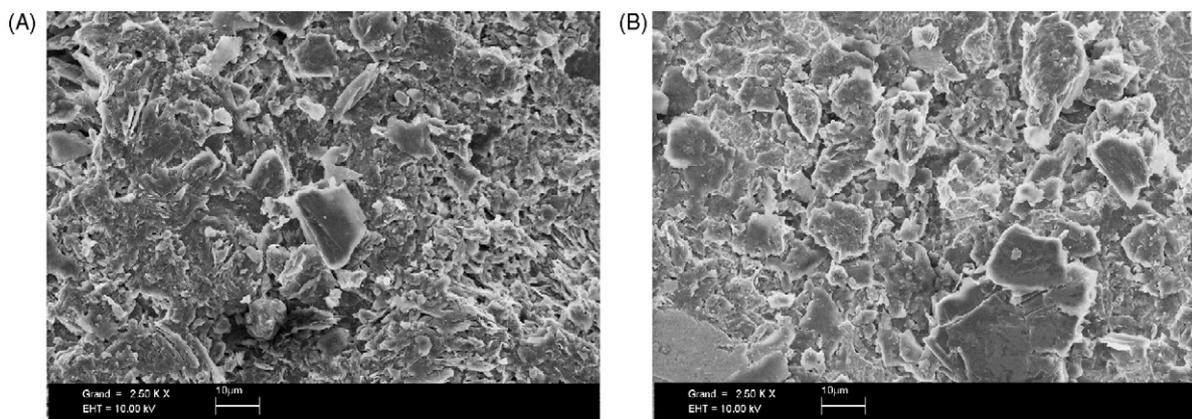


Fig. 7. Scanning electron microscopy (SEM), magnification 2500 \times on clean electrodes of (A) graphite and (B) DSA.

by 0.5 μm [41]. So, when the material roughness is higher, the number of adhered cells per biofilm covered projected surface area might be increased. Therefore it is coherent that the ratio in current densities between graphite and DSA was controlled by the ratio of material roughness. It may be concluded that the higher efficiency of graphite was mainly explained by the higher surface roughness of the surface than by better kinetic properties of the material.

4. Conclusions

Biofilms of *G. sulfurreducens* developed on graphite and DSA electrodes revealed able to sustain high current densities up to 8 A m^{-2} and 5 A m^{-2} , respectively, which was higher than reported before. Actually, the experiments reported elsewhere, which were not aimed at reaching maximal currents, have certainly been stopped before reaching the maximal values [11]. A numerical treatment of the pictures obtained by epifluorescence microscopy was proposed to estimate *in situ* biofilm coverage ratios. This was the first time that a simple method was proposed to assess the ratio of the surface area covered by the biofilm. Indirect measurements have been proposed (e.g. measuring amount of protein) which requires scratching the biofilm and did not give indication on biofilm coverage. From the practical point of view of current production, the surface coverage ratio is a key parameter, which can be used to assess easily the maximum current density, by simple extrapolation to 100% coverage. This method showed here that the coverage ratios obtained with mature biofilms were very similar for graphite and DSA electrodes that were implemented in identical conditions. It was consequently concluded that the differences in the maximal current density values between graphite and DSA were mainly controlled by the surface roughness.

Because of their technological advantages and the capacity they demonstrated here to grow electrochemically active biofilms, DSA electrodes should constitute a suitable material for scaling up microbial fuel cells. Current densities up to 8 A m^{-2} were reached in optimal conditions, i.e. renewing the reactor medium. Optimizing the DSA for MFCs should now progress in increasing their roughness. According to the proportional relationship observed here between roughness values and maximal currents, it may be reasonably hoped that increasing the roughness to 10 μm (limit from which bacterial adhesion was no more affected [40]) should multiply the current by a factor of 3. The similarity between graphite and DSA in terms of maximal current values suggests that the maximal current may be rather independent from their surface composition. Nevertheless, it may be interesting to compare DSA made up with different oxides with the view to shorten the initial growth phase, a feature for which DSA seemed slightly less effective than graphite.

Acknowledgements

This work was financially supported by the Sixth Framework Program of the European Union as part of the project "Electro-

chemically Active Biofilms" NEST (508866). The authors are very grateful for V. Baylac's help (CIRIMAT -Toulouse) for roughness measurements.

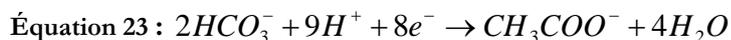
References

- [1] M.C. Potter, Proc. R. Soc. (Lond.) B 84 (1911) 260.
- [2] H.D. Roller, H.P. Bennetto, G.M. Delaney, J.R. Mason, J.L. Stirling, C.F. Thurston, J. Chem. Tech. Biotechnol. 34B (1984) 3.
- [3] S. Suzuki, I. Karube, H. Matsuoka, S. Ueyama, Ann. N. Y. Acad. Sci. 413 (1983) 133.
- [4] D.R. Bond, D.E. Holmes, L.M. Tender, D.R. Lovley, Science 295 (2002) 483.
- [5] S.K. Chaudhuri, D.R. Lovley, Nat. Biotechnol. 21 (2003) 1229.
- [6] B.H. Kim, H.J. Kim, M.S. Hyun, D.H. Park, J. Microbiol. Biotechnol. 9 (1999) 127.
- [7] H. Liu, B.E. Logan, Environ. Sci. Technol. 38 (2004) 4040.
- [8] D.R. Lovley, Microbe 1 (2006) 323.
- [9] D.R. Lovley, Curr. Opin. Biotechnol. 17 (2006) 1.
- [10] B.E. Logan, B. Hamelers, R. Rozendal, U. Schroder, J. Keller, S. Freguia, P. Aelterman, W. Verstraete, K. Rabaey, Environ. Sci. Technol. 40 (2006) 5181.
- [11] D.R. Bond, D.R. Lovley, Appl. Environ. Microbiol. 69 (2003) 1548.
- [12] H.S. Park, B.H. Kim, H.S. Kim, H.J. Kim, G.T. Kim, M. Kim, I.S. Chang, Y.K. Park, H.J. Chang, Anaerobe 7 (2001) 297.
- [13] C.A. Pham, S.J. Jung, N.T. Phung, J. Lee, I.S. Chang, B.H. Kim, H. Yi, J. Chun, FEMS Microbiol. Lett. 223 (2003) 129.
- [14] K. Rabaey, W. Verstraete, Trends Biotechnol. 23 (2005) 291.
- [15] P. Aelterman, K. Rabaey, H.T. Pham, N. Boon, W. Verstraete, Environ. Sci. Technol. 40 (2006) 3388.
- [16] E. Zhang, W. Xu, G. Diao, C. Shuang, J. Power Sources 161 (2006) 820.
- [17] N. Kim, Y. Choi, S. Jung, S. Kim, Biotechnol. Bioeng. 70 (2000) 109.
- [18] N. Kim, Y. Choi, S. Jung, K. Sunghyun, Bull. Korean Chem. Soc. 21 (2000) 44.
- [19] D.H. Park, J.G. Zeikus, Biotechnol. Bioeng. 81 (2003) 348.
- [20] H. Liu, S. Cheng, B.E. Logan, Environ. Sci. Technol. 39 (2005) 5488.
- [21] S.A. Lee, Y. Choi, S. Jung, S. Kim, Bioelectrochemistry 57 (2002) 173.
- [22] K. Rabaey, W. Ossieur, M. Verhaege, W. Verstraete, Water Sci. Technol. 52 (2005) 515.
- [23] K. Rabaey, N. Boon, M. Hofte, W. Verstraete, Environ. Sci. Technol. 39 (2005) 3401.
- [24] Y. Choi, E. Jung, S. Kim, S. Jung, Bioelectrochemistry 59 (2003) 121.
- [25] K. Rabaey, N. Boon, S.D. Siciliano, M. Verhaege, W. Verstraete, Appl. Environ. Microbiol. 70 (2004) 5373.
- [26] H. Liu, S. Cheng, B.E. Logan, Environ. Sci. Technol. 39 (2005) 658.
- [27] S. Trasatti, Electrochim. Acta 45 (2000) 2377.
- [28] H.I. Park, D.K. Kim, Y.-J. Choi, D. Pak, Process Biochem. 40 (2005) 3383.
- [29] S. Parot, M.-L. Délia, A. Bergel, Bioresour. Technol., in press.
- [30] B.E. Logan, J.M. Regan, Trends Microbiol. 14 (2006) 512.
- [31] D.E. Holmes, S.K. Chaudhuri, K.P. Nevin, T. Mehta, B.A. Methé, A. Liu, J.E. Ward, T.L. Woodard, J. Webster, D.R. Lovley, Environ. Microbiol. 8 (2006) 1805.
- [32] S. Seeliger, R. Cord-Ruwisch, B. Schink, J. Bacteriol. 180 (1998) 3686.
- [33] B.A. Methé, K.E. Nelson, J.A. Eisen, I.T. Paulsen, W. Nelson, J.F. Heidelberg, D. Wu, M. Wu, N. Ward, M.J. Beanan, R.J. Dodson, R. Madupu, L.M. Brinkac, S.C. Daugherty, R.T. Deboy, A.S. Durkin, M. Gwinn, J.F. Kolonay, S.A. Sullivan, D.H. Haft, J. Selengut, T.M. Davidsen, N. Zafar, O. White, B. Tran, C. Romero, H.A. Forberger, J. Weidman, H. Khouri, T.V. Feldblyum, T.R. Utterback, S.E. Van Aken, D.R. Lovley, C.M. Fraser, Science 302 (2003) 1967.
- [34] E. Afkar, G. Reguera, M. Schiffer, D.R. Lovley, BMC Microbiol. 5 (2005) 41.
- [35] Y.E. Roginskaya, O.V. Morozova, G.I. Kaplan, R.R. Shifrina, M. Smirnov, S. Trasatti, Electrochim. Acta 38 (2004) 2435.
- [36] J.P. Busalmen, A. Esteve-Nuñez, J.M. Felio Martinez, Proceedings of the 19th Symposium of Bioelectrochemistry Society, Toulouse, France, poster 27A, 2007.

- [37] G. Reguera, K.P. Nevin, J.S. Nicoll, S.F. Covalla, T.L. Woodard, D.R. Lovley, *Appl. Environ. Microbiol.* 72 (2006) 7345.
- [38] S.H. Flint, J.D. Brooks, P.J. Bremer, *J. Food Eng.* 43 (2000) 235.
- [39] L.R. Hilbert, D. Bagge-Ravn, J. Kold, L. Gram, *Int. Biodeter. Biodegr.* 52 (2003) 175.
- [40] T.R. Scheuerman, A.K. Camper, M.A. Hamilton, *J. Colloid Interf. Sci.* 208 (1998) 23.
- [41] F.J. Caccavo, D.J. Lonergan, D.R. Lovley, M. Davis, J.F. Stolz, M.J. McInerney, *Appl. Environ. Microbiol.* 60 (1994) 3752.

Commentaires sur l'article n°1

En considérant, comme cela a été prouvé par Bond et al., que l'oxydation de l'acétate en CO₂ (ou plutôt HCO₃⁻ en solution) fournit huit électrons selon l'Équation 23 (Bond et al. 2003), une estimation de la quantité d'acétate consommé a été effectuée.



La figure 2-A de l'article n°1 montre que quand le courant chute brutalement, la quantité d'électrons consommés correspond à 9mM d'acétate transformé alors que la valeur initiale dans le milieu était de 10mM. L'efficacité faradique s'élève donc à 90%. Cette haute efficacité faradique, obtenue aussi par Bond et al. (Bond et al. 2003) a été discuté par B.Logan qui suppose que de l'hydrogène serait formé à la cathode par hydrolyse de l'eau et s'oxyderait par la suite à l'anode (Logan et al. 2006b). Cependant, nos manipulations sont réalisées sous bullage constant de N₂/CO₂ qui chasse l'hydrogène éventuellement produit, qui en conséquence ne pourrait réagir à l'anode et augmenter la quantité de courant obtenue.

L'établissement de corrélations entre les valeurs de densité de courant et les morphologies du biofilm ou les taux de recouvrement n'en est qu'à ses débuts. Il est intéressant de comparer la quantité de protéines contenues dans le biofilm avec la densité de courant (Bond et al. 2003; Logan et al. 2006b) mais cette méthode exige de détacher le biofilm et ne peut pas donner d'indication sur le taux de couverture de l'électrode. Le MEB a le grand avantage de donner des images détaillées, mais pour réaliser cette observation, les biofilms doivent subir plusieurs étapes de déshydratation et de préparation, qui peuvent induire des modifications significatives dans la structure du biofilm (Bond et al. 2003; Liu et al. 2004). La microscopie confocale laser semble être la technique la plus élégante pour étudier la morphologie et les taux de recouvrement in situ des biofilms (Logan et al. 2006b) ou même évaluer l'épaisseur de biofilm (Reguera et al. 2006). Au cours de cette étude une méthode simple et efficace a été mise au point pour mesurer le taux de recouvrement des bactéries sur les électrodes (article n°1, Figure 5 et 7). Cette technique nécessite simplement un microscope à champ large. La technique consiste à choisir un seuil d'intensité lumineuse qui divise l'image en deux classes : les zones fortement fluorescentes qui traduisent une colonisation bactérienne, ou celles de basses intensités qui présentent des zones non colonisées. Le taux de recouvrement bactérien est calculé comme le rapport entre l'aire colonisée et l'aire totale analysée.

A la fin de chaque expérience, des photographies en épifluorescence et un post-traitement numérique ont permis d'observer les biofilms et d'évaluer le taux de recouvrement de ces derniers sur les électrodes. Les observations montrent qu'un biofilm se développe même sur une

électrode non connectée (article n°1, Figure 5). Il est surprenant d'observer ces quelques bactéries à la surface d'une électrode non polarisée. Le milieu étant exempt de tout accepteur d'électrons, les bactéries pour survivre ont besoin des électrons fournis par l'électrode polarisée. Il est possible qu'au moment de l'injection des bactéries, l'inoculum contienne encore quelques millimoles de fumarate non consommées au cours de la phase d'incubation de 5 jours (la quantité maximale si rien n'était consommé serait égale à 1,25mM). Cette quantité d'accepteur d'électrons restante aurait permis la croissance d'une certaine quantité de bactéries en suspension qui coloniseraient l'électrode non polarisée. Cette hypothèse est plausible mais la quantité d'accepteur d'électrons provenant de l'inoculum reste très peu élevée, et ne garantirait que la croissance d'une faible quantité de bactéries. Il aurait été intéressant de quantifier, au début de chaque expérience, quelle était cette quantité de fumarate restante, ou encore de rincer les bactéries pour être certain qu'aucun accepteur d'électrons ne soit présent dans le réacteur électrochimique après injection de l'inoculum. Cependant, cela n'a pas pu être mis en œuvre car la souche *G. sulfurreducens* est anaérobie et aurait nécessité de travailler sous une hotte anaérobie dont le laboratoire n'est pas équipé. Une autre hypothèse serait que les bactéries adhérentes sur les électrodes polarisées se détachent et viennent coloniser les électrodes non polarisées. L'utilisation d'un kit de fluorochromes *dead/live* aurait donné des informations sur la quantité de bactéries viables présentes sur les électrodes non polarisées qui par la suite aurait pu être comparée à celle obtenue sur une l'électrode polarisée. Il faudra simplement garder en mémoire que la coloration et la visualisation au microscope se font à l'air, la souche étant anaérobie, la quantité de bactéries vivantes serait sous-estimée.

Au cours d'une expérience de chronoampérométrie réalisée sur DSA, le milieu a été remplacé par un milieu « neuf ». Le courant obtenu, qui avant le changement s'élevait à 5A/m², a augmenté jusqu'à 8A/m² après le renouvellement de milieu (article n°1, Figure 4). Ce résultat montre le rôle essentiel des bactéries adhérentes à la surface de l'électrode dans la catalyse de l'oxydation de l'acétate et que le biofilm est responsable de la totalité du courant obtenu. Cependant pourquoi le courant obtenu après le changement de milieu a-t-il augmenté ? Cela pourrait être dû à la conjonction de phénomènes antagonistes : i) l'augmentation de l'efficacité du biofilm avec le temps, due à l'augmentation du nombre de cellules actives ou à des vitesses de transfert plus élevées, ii) la consommation d'acétate, iii) l'accumulation de produits et métabolites dans le réacteur qui pourraient inhiber les cellules actives. Avant le changement de milieu, la faible diminution de la concentration en acétate et l'accumulation possible de produits inhibiteurs sont plus ou moins balancés par l'augmentation de l'efficacité du biofilm. Tout ceci résulte en un plateau de courant. Le changement de milieu permet de retrouver la concentration en acétate à la

valeur initiale de 5mM et d'éliminer les éventuels composés inhibiteurs, l'efficacité du biofilm n'est alors plus masquée par les conditions opératoires et il peut ainsi fournir plus de courant.

Une comparaison des voltammogrammes obtenus sur une électrode recouverte par un biofilm et la même électrode nue (c'est-à-dire après avoir enlevé le biofilm) a permis de confirmer que le phénomène de catalyse électrochimique n'avait lieu qu'en présence du biofilm. Les métabolites que les bactéries pourraient produire ou les bactéries en suspension ne jouent aucun rôle dans la biocatalyse de l'oxydation de l'acétate. Comme cela avait déjà été démontré précédemment (Bond et al. 2003), le transfert électronique entre les bactéries du biofilm et l'électrode se fait bien de manière directe.

Cette expérience corrobore les résultats obtenus lors du changement de milieu montrant que seul le biofilm développé sur l'électrode est responsable du courant.

Les voltammogrammes obtenus à 10mV/s apportent des informations supplémentaires. Des pics d'oxydo-réduction ont été détectés autour de -0,075 V vs. Ag/AgCl i.e. 0,235 V vs. ESH ($E^\circ \text{Ag/AgCl} = 0,31$ vs. ESH dans le milieu de culture utilisé) (article 1, Figure 2-B). Aucune étude n'existe sur le potentiel redox du cytochrome *c* OmcS connu comme étant nécessaire pour la production d'électricité. Toutefois, une étude existe sur le potentiel redox d'un cytochrome périplasmique et extracellulaire de *G. sulfurreducens* impliqué dans la réduction du Fe (III). La valeur de ce potentiel s'élève à -0,167 V vs. ESH (Seeliger et al. 1998). Le potentiel redox obtenu avec les pics présentés ici ne semble pas correspondre à celui du cytochrome *c* présenté dans la bibliographie. Cependant, le génome de la bactérie *G. sulfurreducens* encode 111 cytochromes de type *c*, ce qui représente le plus grand nombre de cytochrome *c* chez les microorganismes dont la séquence est disponible (Méthé et al. 2003). Ainsi, un cytochrome *c* parmi ces 111 pourrait peut-être correspondre au signal détecté sur les voltammogrammes autour de -0,075 V vs. Ag/AgCl. De plus, bien que le rôle de certains cytochromes soit reconnu dans le transfert d'électrons aux oxydes de Fe(III), aucune information sur leur localisation dans la cellule ou leur fonction n'est généralement connue pour la plupart d'entre eux. Les pics observés ici pourraient donc être liés à d'autres cytochromes *c* que ceux déjà répertoriés, ou encore à des protéines redox impliquées dans les mécanismes de transfert d'électrons comme cela a déjà été démontré (Afkar et al. 2005). Par ailleurs, les voltammogrammes effectués à 2mV/s montrent que la catalyse de l'oxydation de l'acétate par *G. sulfurreducens* se produit à partir de 0,05 V vs. Ag/AgCl i.e. 0,36 V vs. ESH sur graphite et DSA (Lovley 2006c). Or, les réactions anodiques des PACMMs se produisent à des potentiels proches de -0,40 V vs. Ag/AgCl i.e. -0,15 V vs. ESH (en eau de mer $E^\circ \text{Ag/AgCl} = 0,25$ V vs. ESH) ce qui représente un potentiel beaucoup plus bas que ceux obtenus avec *G.*

sulfurreducens. Ces résultats laissent penser que les mécanismes d'oxydation de l'acétate qui rentrent en jeu chez *G. sulfurreducens* ne seraient pas les mêmes que ceux impliqués au cours de l'oxydation de la matière organique dans les fonds marins. La bactérie *G. sulfurreducens* principalement rencontrée dans les sédiments d'eau douce, a tout d'abord été étudiée parce qu'elle est très proche génétiquement des *Geobacteraceae* qui colonisent les électrodes dans les sédiments. Il a été montré que les phénomènes se déroulant à la surface de l'électrode enfouie dans les sédiments peuvent être direct ou indirect. Dans le cas d'un transfert électronique direct, les bactéries présentes à la surface de l'anode oxydent la matière organique en CO₂ par exemple et transfèrent les électrons résultant de cette oxydation à l'électrode. Dans le cas d'un transfert indirect, les bactéries oxydent la matière organique et réduisent un composé X_{ox} en X_{red} qui lui-même s'oxyde à l'électrode. Selon la nature des sédiments étudiés, provenant des fonds marins ou d'eau douce (Holmes et al. 2004b), le composé X est supposé dissemblable. Dans les sédiments marins, X_{red} est HS⁻ et la réaction sur l'anode est HS⁻ → S_(s) + H⁺ + 2e⁻ ou HS⁻ + 4H₂O → SO₄²⁻ + 9H⁺ + 8e⁻, alors que dans les sédiments d'eau douce, X_{red} est Fe²⁺ et la réaction serait plutôt 2Fe²⁺ + 3H₂O → Fe₂O₃ + 6H⁺ + 2e⁻ (Reimers et al. 2001).

Toutefois, il a été observé que les voltammogrammes obtenus dans une suspension de *G. sulfurreducens* qui se sont développées préalablement avec du Fe(III) au lieu du fumarate (comme cela est fait ici) présentaient un pic d'oxydation à des valeurs de potentiel autour de -0.20 V vs. Ag/AgCl (Busalmen et al. 2007), valeurs plus basses que celles observées ici. De plus, le fumarate n'est pas présent en grande quantité dans les sédiments marins contrairement au Fe(III) (Esteve-Nuñez et al. 2004). Ainsi les bactéries de l'espèce *Geobacteraceae*, présentes dans les sédiments marins, qui se développent grâce au Fe(III), seraient capables d'oxyder la matière organique à plus bas potentiel et produire du courant.

2.2. Acier inoxydable (254SMO)

ARTICLE N°2: "Electrochemical activity of *Geobacter sulfurreducens* biofilms on stainless steel anodes"

<http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2008.02.056>

L'article qui suit a été soumis à *Electrochimica Acta*. Il présente des expériences effectuées avec des anodes en acier inoxydable, matériau industriel qui, s'il s'avère performant, permettrait une extrapolation plus rapide des PACMs à l'échelle pilote. Pour la première fois, des électrodes en acier inoxydable ont été testées comme anodes dans une cellule électrochimique mettant en jeu des micro-organismes électroactifs. Dans les conditions expérimentales similaires à celles utilisées

pour les électrodes en graphite ou DSA (paragraphe 2.1), plusieurs séries de mesures sur acier inoxydable ont été réalisées et ont montré la reproductibilité des résultats.

Les résultats essentiels sont :

- la valeur du potentiel imposé s'avère influencer la densité de courant. Aucun courant n'est détecté lorsque l'électrode est polarisée en-dessous de +0,20 V vs. Ag/AgCl.

- les densités de courant obtenues sur acier sont plus faibles que celles obtenues sur DSA ou graphite. Les densités de courant obtenues sur acier inoxydable sont inférieures à 0,7A/m² au lieu de 8A/m² pour le graphite ou 5A/m² pour les DSA.

- les mesures de rugosité ainsi que des observations au microscope confocal laser ou électronique à balayage donnent des pistes de réponses sur les écarts de densités de courant obtenues. En effet, l'acier inoxydable présente une rugosité moyenne de 0,3µm qui est 23 fois moins importante que celle du graphite. Toutefois, la densité de courant obtenue est seulement 13 fois plus faible. Théoriquement, augmenter la rugosité de l'acier inoxydable à hauteur de celle du graphite, en utilisant des mousses d'acier par exemple, pourrait amener à des densités de courant situées entre 15 et 37A/m². Ces résultats montrent que l'acier inoxydable bien que défavorisé par une structure lisse semble présenter des performances intéressantes.

1 **Electrochemical activity of *Geobacter sulfurreducens***
2 **biofilms on stainless steel anodes**

3 DUMAS Claire, BASSEGUY Régine, BERGEL Alain^{*}, Laboratoire de Génie Chimique CNRS-INPT
4 5 rue Paulin Talabot - BP 1301, 31106 Toulouse cedex 1 – France
5 Alain.Bergel@ensiacet.fr

6
7
8 **Abstract:**

9 Stainless steel was studied as anode for the biocatalysis of acetate oxidation by biofilms of
10 *G. sulfurreducens*. Electrodes were individually polarized at different potential in the range -
11 0.20 V to +0.20 V vs. Ag/AgCl either in the same reactor or in different reactors containing
12 acetate as electron donor and no electron acceptor except the working electrode. At +0.20 V
13 vs. Ag/AgCl, the current increased after a 2-day lag period up to maximum current densities
14 around 0.7 A.m⁻² and 2.4 A.m⁻² with 5mM and 10mM acetate, respectively. No current was
15 obtained during chronoamperometry (CA) at potential values lower than 0.00 V vs. Ag/AgCl,
16 while the cyclic voltammeteries (CV) that were performed periodically always detected a fast
17 electron transfer, with the oxidation starting around -0.25 V vs. Ag/AgCl. Epifluorescent
18 microscopy showed that the current recorded by chronoamperometry was linked to the
19 biofilm growth on the electrode surface, while CVs were more likely linked to the cells initially
20 adsorbed from the inoculum. A model was proposed to explain the electrochemical
21 behaviour of the biofilm, which appeared to be controlled by the pioneering adherent cells
22 playing the role of "electrochemical gate" between the biofilm and the electrode surface.

23
24 **Key words:** *Geobacter sulfurreducens*, stainless steel, biofilm, electron transfer, microbial
25 fuel cell

26

1. Introduction

The recent discovery of bacteria that can transfer the electrons issued from their metabolism directly to solid anodes have created a new unexpected interest in microbial fuel cells (MFC) [1-4]. different electrochemically active microbial species have been identified and several basic studies have been performed with pure cultures under constant potential chronoamperometry [5-7]. The progressive attachment of the microbial cells onto the anode surface, which is most often polarised at +0.20 V vs. Ag/AgCl, has induced the increase of current density due to the oxidation of a soluble substrate, generally acetate or glucose, up to 0.07 A.m⁻², 0.15 A.m⁻² and 0.25 A.m⁻² with *Rhodospirillum rubrum* [8], *Desulfuromonas acetoxidans* [9] and *Geobacter metallireducens* [9] biofilms, respectively. *Geobacter sulfurreducens* biofilms have given the highest current densities in the range 0.16 A.m⁻² to 1.14 A.m⁻² on graphite anodes [6]. Cyclic voltammetry (CV) has also been performed to progress in the understanding of the microbial electrocatalysis mechanisms, but most of the studies investigated suspensions of microbial cells [7, 10-13] or freshly adherent microorganisms [14]. CVs on mature biofilms has been more rarely reported [15]. Anodes are almost exclusively made of graphite, in some cases the surface modification with redox mediators have shown significantly increase of the electron transfer rate [16].

The purpose of this work was to contribute deciphering the electron transfer pathway and to assess the suitability of stainless steel as electrode material to support microbial anodes. It has already revealed very efficient to support microbial cathodes [17]. It is a well mastered industrial material, presents high mechanical properties, long-term resistance and is commercially available under many different compositions and morphologies. If it also revealed efficient to support microbial anodes, it would represent a promising solution to scale-up industrial microbial fuel cells.

To work in controlled conditions and to compare our results with previous data reported in literature on graphite electrodes, a similar experimental procedure than the one developed by

1 Bond et al. was chosen: biofilms were grown with pure culture of *Geobacter sulfurreducens*
 2 on anodes polarised at +0.20 V vs. Ag/AgCl [6]. The electrochemical reactors were filled with
 3 culture medium that did not contain any electron acceptor in order to force the cells to
 4 transfer the electrons they produce to the anode; acetate was used as the electron donor
 5 that underwent the microbially-catalysed electrochemical oxidation. In the current state of the
 6 art, only a raw electrochemical scheme can be proposed to explain the biofilm-driven
 7 catalysis of acetate electrochemical oxidation, where acetate undergoes a metabolic
 8 oxidation, followed by direct transfer of the electrons from the microbial cells to the anode:

9 *On the electrode surface:*



11 *In the biofilm:*



13

14 2. Experimental

15 2.1. Media and growth conditions

16 *G. sulfurreducens* strain PCA (ATCC 51573) was obtained from DSMZ. Incubations were
 17 done at 30°C during 5 days in the common growth medium already described elsewhere [6],
 18 which contained 50mM sodium fumarate as electron acceptor and 10mM acetate as electron
 19 donor. Unless otherwise stated, the electrochemical reactors were filled with the same
 20 medium, except that it lacked sodium fumarate. Reactors were flushed with a N₂-CO₂ (80%-
 21 20%) stream during at least one hour, a lower flow was then maintained during the
 22 experiments. The electrochemical reactor was inoculated (5% v/v) with cell suspensions that
 23 had an optical density at 620nm around 0.3 (*i.e* 142 000 CFU.mL⁻¹).

24

1 **2.2. Electrodes and electrochemical measurements**

2 The body of the electrochemical reactor comprised two inlet and outlet ports and the top
3 seven holes to set-up the electrodes and the gas flowing system. The junction between the
4 top and the body of reactors was sealed with a clamping ring. Each working electrode,
5 1x2.5x0.1cm³ pieces of stainless steel (UNS31254¹), was drilled, tapped and a titanium wire
6 was screwed on it. Before experiments, stainless steel coupons were cleaned with an
7 ethanol/acetone (50–50%) mixture to dissolve organic adsorbed species, and with a
8 fluoridric/nitric acids (2–20%) solution to dissolve the oxide layer. The platinum counter
9 electrode (grid with 0.5mm diameter wire) was cleaned by red-hot heating flame. Reference
10 electrode was a silver/silver chloride wire. Its potential in the growth medium was around
11 0.31 V vs. SHE. All potential values are expressed with respect to this Ag/AgCl electrode
12 throughout the paper.

13
14 One to four working electrodes (SS) were dipped in the same reactor and connected to the
15 same auxiliary and reference electrodes through a multi-potentiostat (VMP1 or VMP2,
16 software EC-Lab v.8.3, Bio-Logic SA). Each working electrode was individually polarized and
17 the associated current registered thanks to a N-STAT device (Bio-Logic SA). Cyclic
18 voltamograms (CV) were recorded at 10 mV.s⁻¹ just before inoculation and then periodically
19 during the experiment.

21 **2.3. Microscopy and surface analysis**

22 At the end of experiment, electrodes were removed from the reactor, stained with a solution
23 of 0.03% orange acridine (A6014, Sigma) for 10 minutes, rinsed with distilled water and air
24 dried in the dark. Pictures were taken with a Carl Zeiss AxioTech 100 microscope equipped
25 for epifluorescence with HBO 50/ac mercury light source and Zeiss 09 filter (excitor AP 450-
26 490, reflector FT 510, barrier filter LP 520). Image were acquired with a monochrome digital

¹ Composition Cr : 19,9%, Ni : 17,8%, Mo : 6,0%, N : 0,2%, C : 0,01%, Fe : complément

1 camera (Evolution VF) and post-treated with the software Image-Pro Plus v.5. Some pictures
2 were also taken with a Leica confocal microscope SP2 (IFR 40 –Castanet Tolosan –France)
3 The average surface roughness (Ra) of the pre-treated electrodes was characterized using a
4 white light interferometer Zygo New View 100 OMP-0348K.

5

6 3. Results

7 Four stainless steel electrodes were placed in the same reactor and polarised at -0.20 V, -
8 0.10 V, +0.00 V and +0.20 V with respect to the same Ag/AgCl reference electrode. The
9 reactor medium (2L) contained 10mM acetate but no electron acceptor. It was inoculated
10 (5% v/v) 1 hour after the beginning of the polarization with a *Geobacter sulfurreducens*
11 suspension previously grown as described in Material and method section. After around two
12 days latency, the current density on the electrode polarised at +0.20 V started to increase
13 and reached 2.4 A.m⁻² on day 7.6 (Figure 1). Since this time, current density fell dramatically
14 and remained at 0.1 A.m⁻² during the last two days. No current was recorded for the three
15 other electrodes that were polarized at lower potential values (Figure 1), indicating that the
16 catalysis of the acetate oxidation could not occur at potential lower or equal to +0.00 V.

17

18 CVs were performed at 10 mV.s⁻¹ just before and just after inoculation and then every 24
19 hours on each electrode during chronoamperometry. CV recording disturbed the current
20 transiently but it recovered rapidly its value after a few minutes back under constant
21 polarization. CVs recorded before and just after the inoculum injection were flat, indicating
22 that no redox process occurred. Then all CVs exhibited exactly the same general shape,
23 whatever the imposed potential value during the chronoamperometry, with a clear reduction
24 process and a flat oxidation wave (Figure 2). The maximum of the oxidation wave occurred
25 between 0.05 and 0.12 V with similar current density values. For instance, at day 7.6 current
26 densities were 10.2, 12.0, 9.7 and 10.5 A.m⁻² for the electrode polarised at +0.20, +0.00, -
27 0.10 and -0.20 V, respectively. The potential of inversion between reduction and oxidation
28 was also very stable around -0.25 V. CVs did not exhibit any significant difference with

1 respect to the potential imposed during chronoamperometry. In order to follow the evolution
2 in CVs as a function of time, the current densities obtained daily on the CVs at +0.20 V are
3 reported on Figure 3. No oxidation was detected just after injecting the inoculum, but the CV
4 oxidation current increased quickly close to its maximal value since the first day and kept
5 high values until the end of the experiment. CVs did not reproduce the exponential current
6 increase that was observed during chronoamperometry from day 2 to day 7, and they were
7 also not sensitive to the drastic perturbation observed at day 7 on the chronoamperometry. It
8 can be concluded that CV and chronoamperometry addressed different phenomena.

9
10 At the end of the experiment, the biofilm was removed from the electrode surface by gentle
11 mechanical cleaning and the electrode was set back into the reactor to perform the final CV
12 (Figure 2-A/B). When biofilm was removed from the electrode, the CV recorded with the
13 cleaned electrode that was put back in the reactor was exactly similar to the initial CV
14 performed before inoculation (Figures 2). The biofilm was consequently fully responsible for
15 the reduction and oxidation processes, as it has been previously established in similar
16 conditions with graphite electrodes [6].

17
18 At the end of the experiment, epifluorescence microscopy pictures were taken on each
19 electrode surface on several randomly chosen spots. The pictures reported here were
20 representative of the biofilm spreading out (Figures 4). On the electrode polarised at +0.20 V
21 (Figure 4-A), the biofilm was dense and distributed all over the electrode surface. It
22 recovered around $57 \pm 8\%$ of the electrode surface while the biofilm coverage ratio was
23 around $39 \pm 6\%$ when the initial acetate concentration was equal to 5mM. On the electrodes
24 polarised at lower potentials (Figure 4-B/C), there were only scattered bacteria or a few small
25 clusters on the electrode surface. The biofilm covered around $12 \pm 2\%$ (Figure 4-B), $15 \pm 7\%$
26 (Figure 4-C), $15 \pm 9\%$ (Figure 4-D). On the electrode polarised at -0.20 V, a few large clusters
27 were noticed, as depicted on Figure 4-D, but the biofilm was never covering the entire
28 electrode surface like on an electrode polarised at +0.20 V. The clear difference between the
29 biofilm morphology on the electrode polarized at +0.20 V and the others was consistent with

1 the behaviour of the electrode during chronoamperometry, as only the fully covered electrode
2 supplied current in chronoamperometry. On the contrary, CVs seemed not to be
3 straightforwardly linked to the biofilm coverage since even on the electrodes colonised by a
4 few bacteria, high current densities were detected on CVs.

5
6 As all electrodes were dipped in the same reactor in experiment 1, it might be suspected that
7 the microbial cells observed on the surface of the electrodes that were polarized at low
8 potential values may result from cells that were released from the well-developed biofilm
9 growing on the electrode polarized at +0.20 V. In order to check this assumption the
10 experiment was repeated with four separated reactors in parallel, each containing only one
11 electrode (experiment 2). Each electrochemical reactor contained 0.5L medium with 5mM
12 acetate and were inoculated at day 0.8 (i.e. 19 hours after starting polarization) with 5% v/v
13 of the same *G.sulfurreducens* culture. The potential was imposed from the beginning of the
14 experiment and was then changed on day 8.9:

- 15 - Electrode A was kept at +0.20 V the whole experiment long,
- 16 - Electrode B: initially at +0.20 V, was set at 0.00 V at day 8.9,
- 17 - Electrode C: initially at -0.20 V was set at +0.20 V at day 8.9,
- 18 - Electrode D: initially at 0.00 V was set at +0.20 V at day 8.9.

19 Electrodes A and B polarized at +0.20 V (Figure 5-A/B) showed similar behaviours: the
20 current density started to increase around two days after inoculation (i.e. on day 3) and
21 reached 0.4 A.m^{-2} and 0.3 A.m^{-2} on day 8.9 for electrode A and B, respectively. As soon as
22 the potential of electrode B was changed (day 8.9), from +0.20 V to +0.00 V, the current
23 density went down to zero, while electrode A that was kept +0.20 V continued slowly to
24 increase up to 0.7 A.m^{-2} on day 19.5. As was observed in experiment 1, electrodes C and D
25 polarized at -0.20 V and +0.00 V gave no current (Figure 5-C/D). One day after the change in
26 potential to +0.20 V, current density increased and reached for both electrodes (C and D)
27 approximately 0.5 A.m^{-2} on day 19.5.

28

1 The CVs performed on the fourth electrodes on day 8.9 before the change in potential were
2 similar to the CVs recorded in experiment 1. A similar flat oxidation wave appeared even with
3 electrodes C and D polarised at low potential values that did not supply any current. At day
4 8.9, just before the potential change, the current densities recorded at +0.20V vs. Ag/AgCl on
5 the CVs were 7.7, 7.0, 7.6 and 8.4 A.m⁻² for electrodes A, B, C and D, respectively. The
6 potential change did not affect these values significantly. When biofilm was removed, the
7 current always went to zero confirming the essential role of biofilm in the oxidation and
8 reduction reactions.

9
10 A third experiment was carried out independently in a 0.5L reactor with 10mM acetate and
11 only one stainless steel electrode polarised at +0.20 V. Inoculation was made at day 4.8. The
12 current density increased since day 6.8 (2 days after inoculation) and reached a maximum
13 value of 1.1 A.m⁻² on day 12.6 (Figure 6). The CV exhibited the same shape as previously but
14 with lower current densities, around 2 A.m⁻² at +0.20 V. At day 13.1 the reactor was purged,
15 keeping it under N₂/CO₂ atmosphere. It was then refilled with fresh medium always
16 containing 10mM acetate. The current was slightly disturbed by the change of medium but
17 returned to a value of 0.8 A.m⁻² after around 20 hours, which remained stable for days. The
18 current was a little bit lower than the value before medium removal, even if electrode was
19 kept under N₂/CO₂ atmosphere, the biofilm was probably affected by the drain of the reactor.
20 As it has already been demonstrated with graphite electrode [6], it was confirmed that the
21 catalysis of acetate oxidation was not linked to the production of a compound that would
22 accumulate in solution.

24 4. Discussion

25 It is now well established that biofilms of *Geobacter sulfurreducens* are able to catalyse the
26 oxidation of acetate transferring directly the electrons to graphite anodes [6]. CVs performed
27 when the biofilm was removed from the electrode surface (experiments 1 and 2) and
28 chronoamperometry after renewing the medium (experiment 3) both confirmed that the

1 biofilm was fully responsible for the catalysis of acetate oxidation. Neither planktonic cells nor
2 products that would accumulate in the bulk were involved in the process.

3

4 The epifluorescent microscopy pictures confirmed that the current supply in
5 chronoamperometry was linked to the formation of a well-developed biofilm (Figure 4-A). On
6 the contrary, potential values lower or equal to 0.00 V vs. Ag/AgCl did not result in current
7 supply and the electrodes exhibited only a very low colonization (Figure 4-B/C/D).
8 Experiment 1, in which all electrodes were dipped in the same reactor, indicated obviously
9 that the difference cannot be attributed to discrepancy in the biological conditions, but only to
10 the value of the applied potential. Similarly, it has already been observed that more positive
11 anode potential favours colonization by electrode-reducing microorganisms [14]. The effect
12 of the potential has also been shown on the colonization of graphite anodes by *Shewanella*
13 *oneidensis* MR-1 [18], both on the initial lag time and the maximum current.

14

15 Surprisingly, whenever the electrode was polarised at +0.20 V, since the beginning of the
16 experiment (Figure 5-A/B) or several days after inoculation (Figure 5-C/D), the current
17 increased in the same manner: a lag time of one or two days followed by a sharp increase.
18 Actually, the bacteria inoculated in the medium at day 0.8 in experiment 2 survived during
19 more than 8 days before the potential was changed, although they cannot use the electrode
20 as electron acceptor. Colonization from other electrodes cannot be evoked in experiment 2,
21 as the four reactors were independent. It may be thought that traces of fumarate remaining in
22 the inoculum could enable bacteria to survive during a few days. The presence of remaining
23 organic acids in the medium due to inoculum has already been reported [19]. It may also be
24 assumed that potential in the range -0.20 V to 0.00V may be sufficient for the bacteria to
25 survive on the electrode surface, but not to grow on it.

26

27 Under chronoamperometry the maximum current density obtained was around 2.4 A.m⁻²
28 (experiment 1) and 1.0 A.m⁻² (experiment 3) with 10mM acetate, while less than 0.7 A.m⁻²
29 was reached with 5mM acetate (experiment 2). It may be concluded that acetate

1 concentration have a direct effect on bacterial electricity production. This general behaviour
2 was consistent with the data reported elsewhere. Increasing the lactate concentration above
3 5mM has been shown to decrease the lag time and to increase the peak of current obtained
4 with *Shewanella oneidensis* MR-1 [18]. *G.sulfurreducens* has given current density around
5 0.5 A.m^{-2} on a graphite electrode maintained at +0.20 V vs. Ag/AgCl with acetate at or below
6 2mM, and the current rose up to 1.1 A.m^{-2} with 10mM [6]. Under +0.52 V vs. SHE,
7 *Geopsychrobacter electrodiphilus* [20] have sustained 88.9 A.m^{-2} for the reduction of 2mM
8 fumarate and the current density reached 1214.3 A.m^{-2} with 10mM. These results evidenced
9 the importance of substrate concentration in current production, even if a straightforward
10 relationship cannot be evoked. Nevertheless, this conclusion should be qualified as the
11 experiments reported in the literature have rarely been repeated in the same conditions to
12 get a really sure relationship. For instance, experiments that were repeated here in similar
13 conditions (data not shown) revealed an opposite behaviour with current densities of 0.55
14 A.m^{-2} with 10 mM acetate and 1.6 A.m^{-2} with 5mM. Actually, other parameters like the ratio of
15 the number of cells inoculated with respect to the electrode surface area, and mainly the
16 biological quality of the strain, linked for instance to the number of replicates, may have an
17 important effect. It was also observed that acetate has a drastic inhibiting effect on the
18 current at concentration of 50mM (data not shown).

19

20 In identical experimental conditions (inoculation of *G.sulfurreducens*, imposed potential +0.20
21 V vs. Ag/AgCl, 5mM acetate in the medium) we have found in previous experiments current
22 densities around 8.0 A.m^{-2} and 5.0 A.m^{-2} with graphite and dimensionally stable anodes
23 (DSA®), respectively [21]. These values have appeared to be directly correlated to the
24 average surface roughness of the materials of $5.6\mu\text{m}$ and $3.2\mu\text{m}$ for graphite and DSA,
25 respectively. The average roughness of stainless steel electrode was measured here close
26 to $0.29\mu\text{m}$. Flint et al. claimed that bacterial adhesion is favoured by entrapment on material
27 surfaces that present surface roughness close to the size of microbial cells [22]. It might be
28 expected that the results might be improved by increasing the surface roughness, as the
29 average value of $0.29\mu\text{m}$ was significantly less than the size of a microbial cell.

1
 2 CV obviously addressed a different phenomenon than chronoamperometry. CVs were not
 3 sensitive to the potential applied during chronoamperometry. They gave the same results
 4 with the electrodes colonized by small scattered colonies than with the fully developed
 5 biofilm. They exhibited very high currents since the first day after inoculation and did not
 6 reproduce the exponential current increase observed in chronoamperometry. The currents
 7 recorded by CV did not depend on the concentration of acetate. CVs were not sensitive to
 8 the event that provoked the drastic current drop observed on the 7th day in experiment 1: the
 9 chronoamperometry did no longer supply any current, while CVs were not affected. Finally,
 10 the most surprising difference may be that CV always indicated that the oxidation process
 11 started around -0.25 V, while chronoamperometries at -0.20, -0.10 and 0.00 V gave
 12 absolutely no current.

13
 14 It may be concluded that CV addressed adherent cells that are able to exchange electrons
 15 with the electrode. This transfer is fast with a redox potential around -0.25 V. The number of
 16 cells that are able to achieve this electron transfer did not vary in a large extend during the
 17 experiment since the first day after inoculation. These cells or small colonies should
 18 consequently mainly result from adhesion of cells contained in the inoculum. So it was
 19 sufficient for these cells to survive on the electrode surface to maintain the high currents
 20 recorded during CV. These high currents may be due to the fast charge/discharge of the
 21 electrons that were stored in the adherent cells:



23 and they do not require the full activity of the metabolic pathways. Even when the full
 24 metabolism of acetate oxidation was active at +0.20 V, CV at 10 mV.s⁻¹ were not affected by
 25 the metabolic process, which corresponded to a too low time-scale with respect to the fast
 26 direct electron exchange (equation 3). The absence of the oxidation of acetate at low
 27 potential values during chronoamperometry suggests that the cells can drive this reaction
 28 only when they get a redox state (N) high enough ($N > N_{\text{threshold}}$). Equations 1 and 2 should
 29 thus be written:

1 Finally, it must be noted that a clear difference occurred between the electrochemical
2 behaviour of the biofilms formed here on stainless steel, and similar biofilms formed
3 previously on graphite and DSA anodes [21]. On graphite and DSA, CVs recorded during
4 chronoamperometry followed the evolution of the chronoamperometry. It means that the
5 oxidation peak started on CV around the same potential value as with chronoamperometry
6 (around 0.05 V vs. Ag/AgCl) and the current recorded by CV increased as a function of time,
7 with a proportional relationship with the current obtained under chronoamperometry. The
8 behaviour revealed here was thus related to specific features of the initial adsorption of the
9 cells on stainless steel surface.

10

11 5. Conclusions

12 The general aim of the work in progress in the laboratory consists in defining optimal
13 materials that could be used in large scale MFC for long term operation. In this framework,
14 stainless steel was checked here because of its large industrial availability, mechanical
15 properties, long-term resistance to corrosion and reasonable cost. It gave here lower current
16 densities than graphite or DSA checked previously in identical conditions, but the lower
17 average surface roughness might be detrimental to the stainless steel electrodes checked
18 here. Comparing chronoamperometry, cyclic voltammetry, surface coverage ratios and
19 biofilm morphology led to propose a model for the electron transfer that underlined the role of
20 "electrochemical gate" played by the first adherent cells. It seems that cell adhesion that took
21 place in the first hours controlled in a large extend the further electron transfer process. The
22 electrochemical efficiency of the stainless steel/biofilm interface might consequently be
23 improved by optimising the initial adhesion of pioneering cells on the electrode surface.

24

25 Acknowledgments

26 This work was financially supported by the Sixth Framework Program of the European Union
27 as part of the project "Electrochemically Active Biofilms" NEST (508866). The authors are

1 most grateful for technical contributions from Luc Etcheverry, engineer CNRS, Laboratoire de
2 Génie Chimique (Toulouse, France).

3

4 References :

- 5 [1] D.R. Lovley, *Microbe* 1 (2006) 323
- 6 [2] D.R. Lovley, *Nat. Rev. Microbiol.* 4 (2006) 499
- 7 [3] B.E. Logan, B. Hamelers, R. Rozendal, U. Schroder, J. Keller, S. Freguia, P.
8 Aelterman, W. Verstraete, K. Rabaey, *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 5181
- 9 [4] K. Rabaey, W. Verstraete, *Trends Biotechnol.* 23 (2005) 291
- 10 [5] B.H. Kim, H.J. Kim, M.S. Hyun, D.H. Park, *J. Microb. Biotech* 9 (1999) 127
- 11 [6] D.R. Bond, D.R. Lovley, *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (2003) 1548
- 12 [7] S.A. Lee, Y. Choi, S. Jung, S. Kim, *Bioelectrochemistry* 57 (2002) 173
- 13 [8] S.K. Chaudhuri, D.R. Lovley, *Nat. Biotechnol* 21 (2003) 1229
- 14 [9] D.R. Bond, D.E. Holmes, L.M. Tender, D.R. Lovley, *Science* 295 (2002) 483
- 15 [10] H.S. Park, B.H. Kim, H.S. Kim, H.J. Kim, G.T. Kim, M. Kim, I.S. Chang, Y.K. Park,
16 H.I. Chang, *Anaerobe* 7 (2001) 297
- 17 [11] C.A. Pham, S.J. Jung, N.T. Phung, J. Lee, I.S. Chang, B.H. Kim, H. Yi, J. Chun,
18 *FEMS Microbiol. Lett.* 223 (2003) 129
- 19 [12] K. Rabaey, N. Boon, M. Hofte, W. Verstraete, *Environ. Sci. Technol.* 39 (2005) 3401
- 20 [13] Y. Choi, E. Jung, S. Kim, S. Jung, *Bioelectrochemistry* 59 (2003) 121
- 21 [14] K. Rabaey, N. Boon, S.D. Siciliano, M. Verhaege, W. Verstraete, *Appl. Environ.*
22 *Microbiol.* 70 (2004) 5373
- 23 [15] H. Liu, S. Cheng, B.E. Logan, *Environ. Sci. Technol.* 39 (2005) 658
- 24 [16] D.A. Lowy, L.M. Tender, J.G. Zeikus, D.H. Park, D.R. Lovley, *Biosens. Bioelectron.*
25 21 (2006) 2058
- 26 [17] C. Dumas, R. Basséguy, A. Bergel, *Electrochim. Acta* In press

- 1 [18] E.J. Cho, A.D. Ellington, *Bioelectrochemistry* 70 (2007) 165
- 2 [19] K.B. Gregory, D.R. Bond, D.R. Lovley, *Environ. Microbiol.* 6 (2004) 596
- 3 [20] D.E. Holmes, J.S. Nicoll, D.R. Bond, D.R. Lovley, *Appl Environ Microbiol.* 70 (2004)
- 4 6023
- 5 [21] C. Dumas, R. Basséguy, A. Bergel, *Electrochim. Acta* In press
- 6 [22] S.H. Flint, J.D. Brooks, P.J. Bremer, *J. Food Eng.* 43 (2000) 235
- 7 [23] Thauer R.K., Junkermann K., Decker K., *Bacteriol. Rev.*(1977) 100
- 8 [24] D.A. Finkelstein, L.M. Tender, J.G. Zeikus, *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 6990
- 9 [25] D.E. Holmes, S.K. Chaudhuri, K.P. Nevin, T. Mehta, B.A. Methé, A. Liu, J.E. Ward,
- 10 T.L. Woodard, J. Webster, D.R. Lovley, *Environ. Microbiol.* 8 (2006) 1805
- 11 [26] G. Reguera, K. D. McCarthy, T. Mehta, J. S. Nicoll, M. T. Tuominen, D. R. Lovley,
- 12 *Nature* 435 (2005) 1098.
- 13 [27] Y. A. Gorby, S. Yanina, J. S. McLean, K. M. Rosso, D. Moyles, A. Dohnalkova, T. J.
- 14 Beveridge, I. S. Chang, B. H. Kim , K. S. Kim, D. E. Culley, S. B. Reed, M. F. Romine, , D.
- 15 A. Saffarini, E. A. Hill, L. Shi, D. A. Elias, D. W. Kennedy, G. Pinchuk, K. Watanabe, S. I.
- 16 Ishii, B. Logan, K. H. Nealson, J. K. Fredrickson. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103. (2006)
- 17 11358.
- 18

1 Figure Captions:

2

3 *Figure 1: Current density vs. time on stainless steel (experiment 1). Initial acetate*
4 *concentration 10 mM, injection of bacteria 1 hour after the beginning of polarization.*

5 - ■ SS polarised at +0.20 V vs. Ag/AgCl.

6 - ■ : SS1.2 polarised at -0.10 V vs. Ag/AgCl.

7 *Perturbation in current every 24h were due to CV recording.*

8

9 *Figure 2 : Evolution of CVs (10 mV.s^{-1}) on stainless steel electrode (experiment 1): (.....)day 2.9,*
10 *(....)day 7.6 (—)at the end of the experiment after biofilm removal with the cleaned electrode*
11 *back in the reactor. A: electrode polarised at +0.20 V vs. Ag/AgCl*

12 *B: electrode polarised at -0.10 V vs. Ag/AgCl.*

13

14 *Figure 3 : Evolution of the current density at +0.20 V vs. Ag/AgCl from the CVs performed during*
15 *experiment 1 ● on the electrode polarized at -0.10 V vs. Ag/AgCl and ○ on the electrode polarized at*
16 *+0.20 V vs. Ag/AgCl. Last values were recorded after biofilm removal.*

17

18 *Figure 4: Epifluorescent microscopy of the electrodes at the end of experiment 1; polarization at (A)*
19 *+0.20 V vs. Ag/AgCl, (B) -0.10 V vs. Ag/AgCl; (C) 0.00 V vs. Ag/AgCl ; (D) -0.20 V vs. Ag/AgCl*

20

21 *Figure 5: Current density vs. time on stainless steel electrode (experiment 2). Initial acetate*
22 *concentration 5mM, injection of bacteria on day 0.8 (19 hours).*

23 - A: electrode polarised at +0.20 V vs. Ag/AgCl;

24 - B: polarised at +0.20 V vs. Ag/AgCl from day 0 to day 8.9, then at +0.00 V vs. Ag/AgCl to the end.

25 - C: polarised at -0.20 V vs. Ag/AgCl from day 0 to day 8.9, then at +0.20 V vs. Ag/AgCl to the end.

26 - D: polarised at +0.00 V vs. Ag/AgCl from day 0 to day 8.9, then at +0.20 V vs. Ag/AgCl to the end.

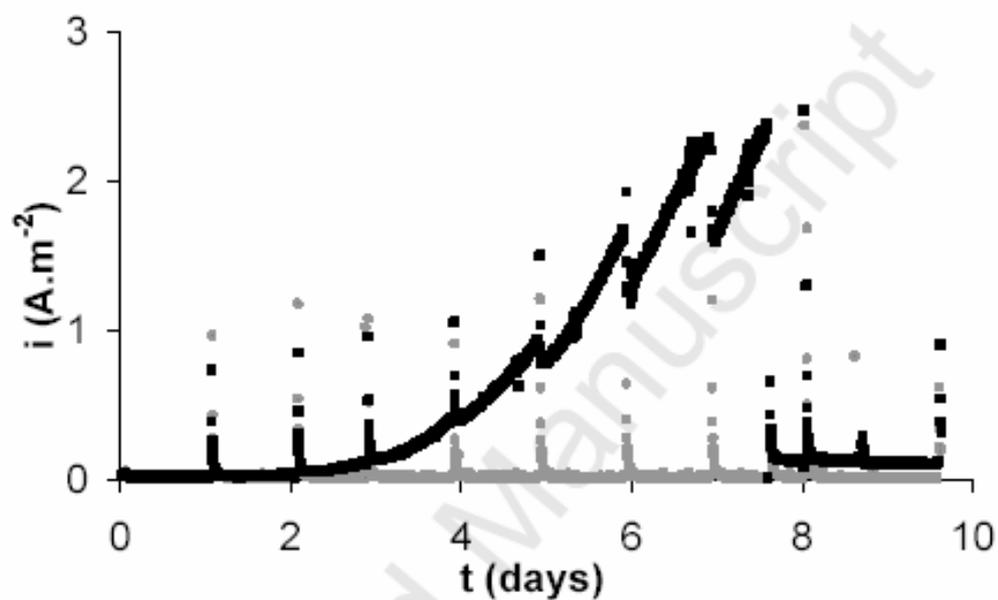
27

28 *Figure 6: Evolution of the current density on stainless steel polarised at +0.20 V vs. Ag/AgCl with*
29 *10mM acetate (experiment 3). The inoculation was made at day 4.8 and the medium was replaced*
30 *with fresh medium on day 13.1.*

Figure(s)

ACCEPTED MANUSCRIPT

1 Figures



2

3 Figure 1

4

5

6

7

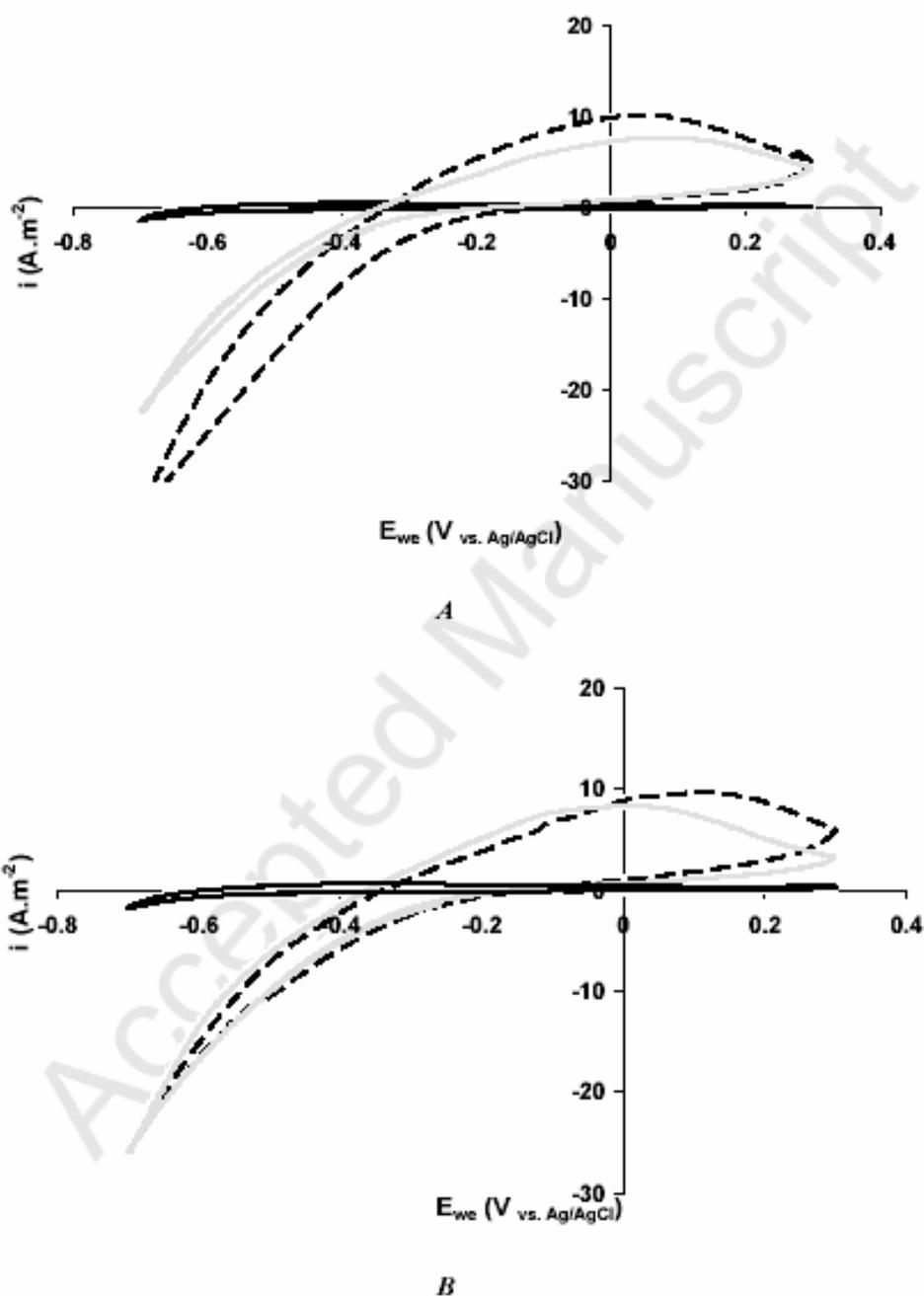
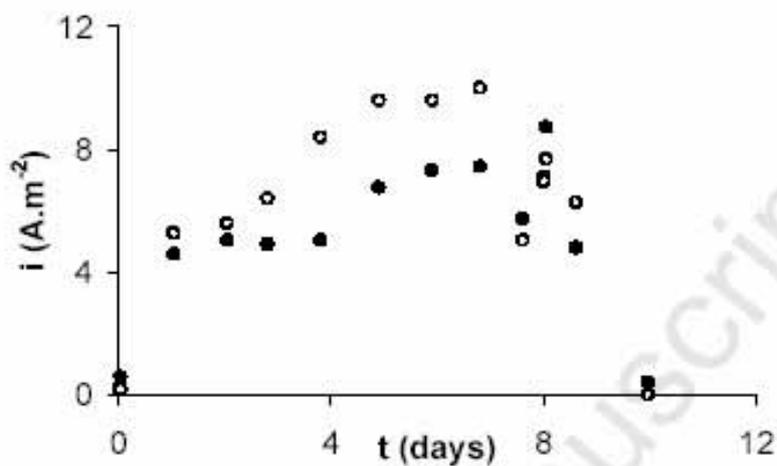


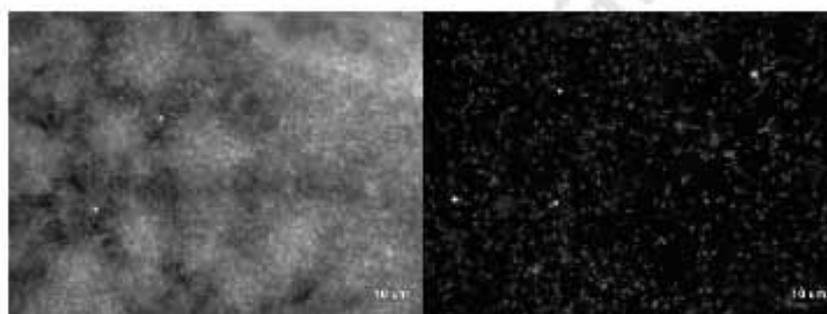
Figure 2

ACCEPTED MANUSCRIPT



1

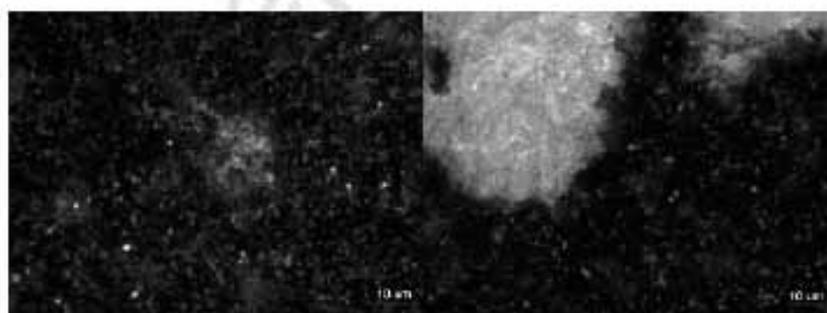
2 Figure 3



3
4

A

B



5
6

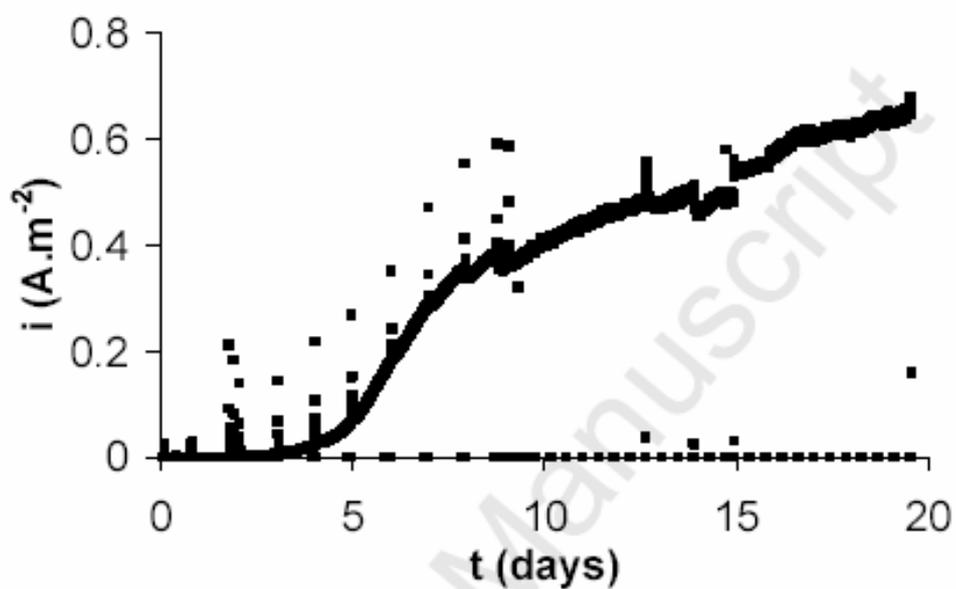
C

D

7 Figure 4

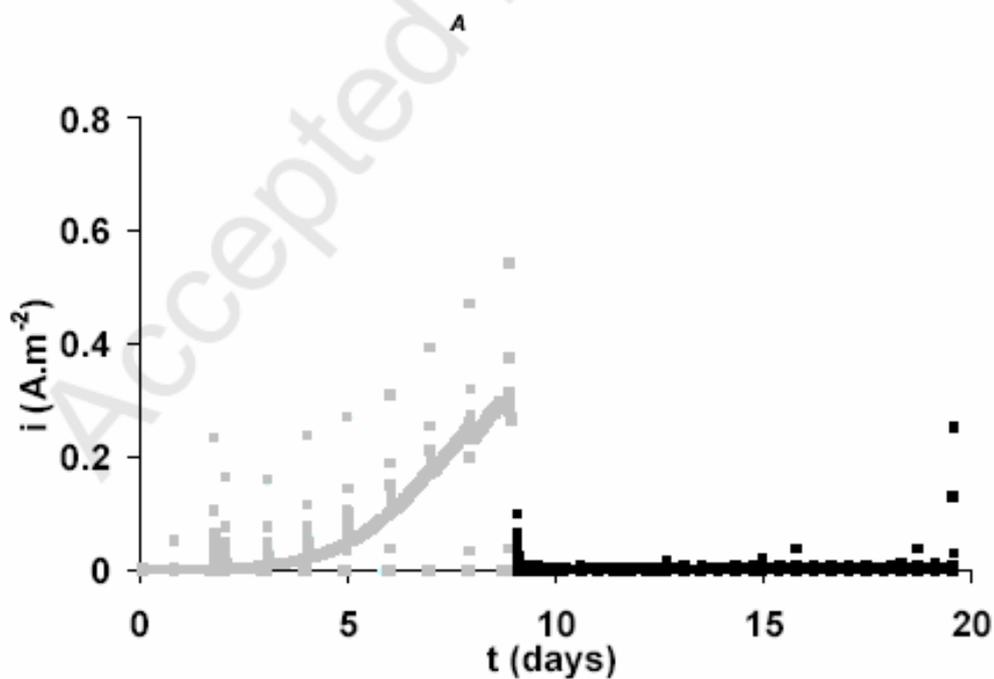
8

1



2

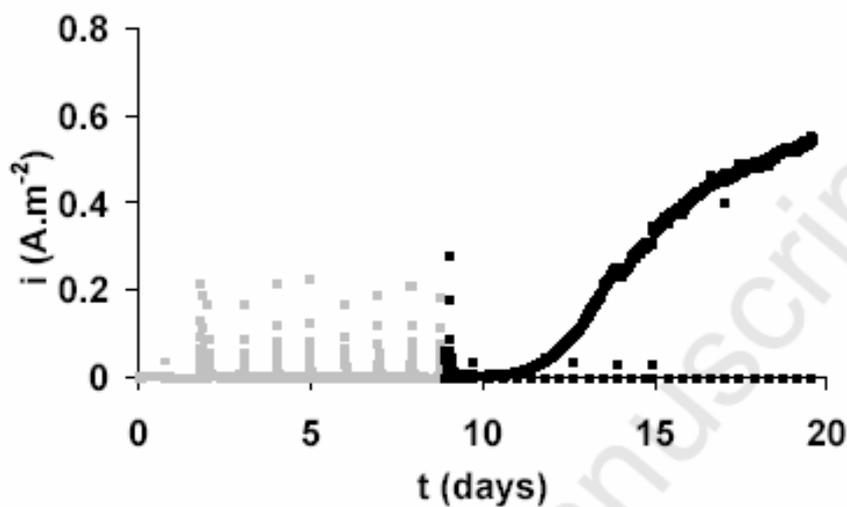
3



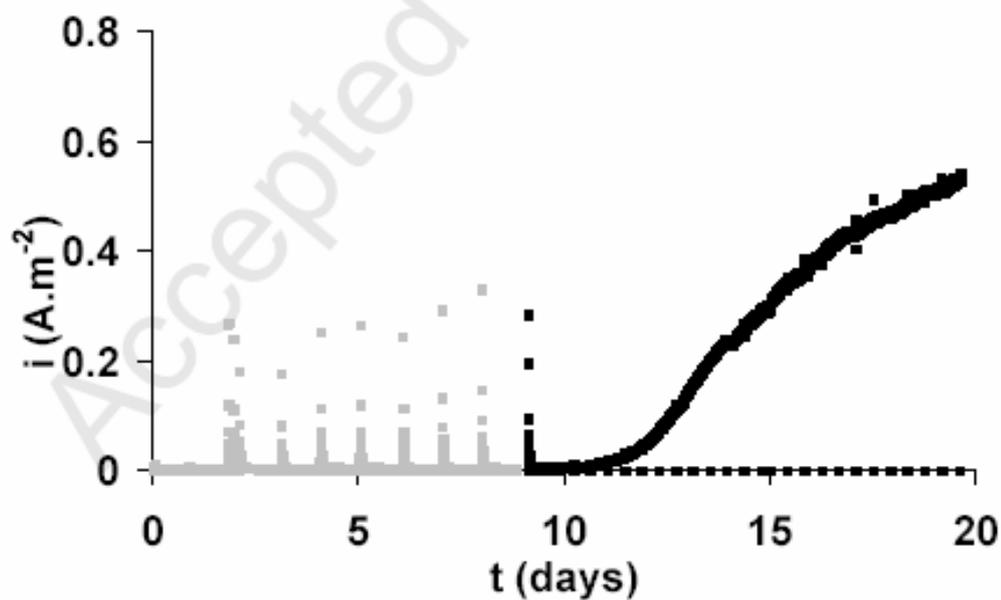
4

5

B

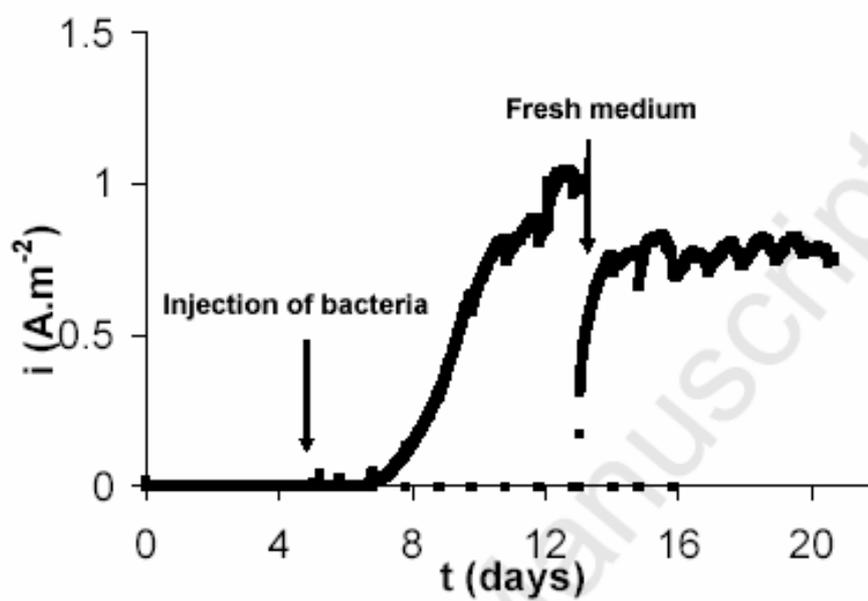


1
2
3



4
5

6 Figure 5



1

2 Figure 6

3

Commentaires sur l'article n°2

Lorsque les électrodes sont polarisées à +0,20 V vs. Ag/AgCl, le courant augmente rapidement quelques jours après l'injection des bactéries, puis l'augmentation se fait plus lentement sans pour autant se stabiliser (article n°2, Figure 1 et 5).

En chronoampérométrie, la densité de courant maximum obtenue est autour de 2,4A/m² (article n°2, expérience 1) et 1,0A/m² (article n°2, expérience 3) avec 10mM d'acétate et moins de 0,7A/m² avec 5mM de substrat. Ainsi, la concentration en acétate a une influence directe sur la production de courant. Ces résultats sont en accord avec la bibliographie. Bond et al. montrent que *G. sulfurreducens* fournit 0,5A/m² sur une électrode de graphite polarisée à +0,20 V vs. Ag/AgCl pour une concentration en substrat inférieure ou égale à 2mM et que ce courant augmente jusqu'à 1,1A/m² lorsque la concentration s'élève à 10mM (Bond et al. 2003). Bien qu'aucune relation de proportionnalité directe ne puisse être établie, la concentration en substrat semble être un paramètre important pour la production de courant. De plus, lorsque la concentration en acétate dépasse 50 mM, le courant chute de façon brutale (Figure 48). Ce phénomène a été attribué à une inhibition par le substrat.

Des expériences supplémentaires, dans lesquelles seule la concentration en substrat varierait seraient nécessaires pour vérifier le rôle de la concentration en substrat dans la production de courant. Par exemple, une expérience (présentée dans le paragraphe 3.2 de ce chapitre) rapporte une densité de courant maximale de 1,6A/m² pour 5mM d'acétate. En fait, d'autres paramètres peuvent influencer la valeur de la densité de courant obtenue tels que :

- i) le rapport entre la quantité exacte de bactéries inoculées dans le réacteur et la surface d'électrode,
- ii) la qualité de l'inoculum c'est-à-dire le nombre de fois où les bactéries ont été repiquées et stockées.

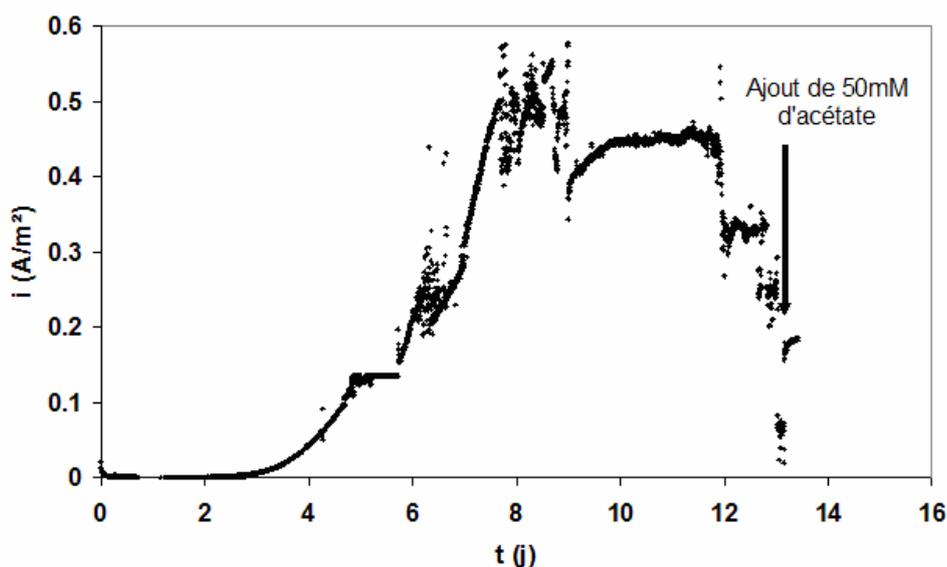


Figure 48 : Densité de courant en A/m² obtenue sur une électrode d'acier inoxydable polarisée à +0,20 V vs. Ag/AgCl. Injection de *G. sulfurreducens* (5%v/v) à t=0

Les observations des biofilms en microscopie à épifluorescence montrent que sur une électrode d'acier inoxydable polarisée à +0,20 V vs. Ag/AgCl, le biofilm est développé sur la surface de l'électrode et se présente sous forme d'agrégats (article n°2, Figure 4-A). Le taux de recouvrement moyen du biofilm sur cette électrode est de $57,1 \pm 7,6\%$ pour une concentration initiale de 10mM en acétate. On peut noter que lorsque la concentration initiale en acétate est de 5mM, le taux de recouvrement moyen se situe autour de $38,7 \pm 6,4\%$. Ce taux de recouvrement est plus faible que celui obtenu sur graphite et DSA dans les mêmes conditions expérimentales, i.e. avec la même concentration initiale en substrat et le même potentiel imposé. En effet, le taux de recouvrement moyen sur graphite était situé entre 62 et 78%.

La valeur du potentiel imposé influence aussi les valeurs de densité de courant. En chronoampérométrie, en-dessous de +0,20 V vs. Ag/AgCl soit 0,51 V vs. ESH, la bactérie n'est pas capable d'oxyder l'acétate sur acier inoxydable. Dans l'expérience 1 de l'article, aucun courant n'est détecté sur les électrodes polarisées en-dessous de +0,20 V vs. Ag/AgCl. Dès que le potentiel est basculé à +0,20 V vs. Ag/AgCl autour du 9^{ème} jour, le courant augmente. Il est surprenant de voir que les bactéries qui ont été injectées au jour 0,8 peuvent survivre pendant environ 8 jours sans aucun accepteur d'électrons dans le milieu et sans utiliser l'électrode. L'hypothèse présentée en 2.1 d'un développement de bactéries grâce aux millimoles de fumarate restante dans l'inoculum peut aussi être avancée. Une autre hypothèse pourrait être que des potentiels inférieurs à +0,20 V vs. Ag/AgCl permettraient aux bactéries de survivre à la surface

de l'électrode mais elles ne pourraient pas se développer. Pour vérifier cette hypothèse, il faudrait polariser une électrode à un potentiel inférieur à +0,20 V vs. Ag/AgCl dans un réacteur et injecter les cellules lavées puis changer le potentiel imposé à +0,20 V vs. Ag/AgCl après quelques jours.

Si l'on suppose que les bactéries ont pu survivre grâce aux quelques millimoles de fumarate restantes de l'inoculum, au 9^{ème} jour, quand le potentiel de l'électrode est basculé à +0,20 V vs. Ag/AgCl, les bactéries trouvent un accepteur d'électrons plus avantageux que le fumarate d'un point de vue énergétique et transfèrent les électrons à l'électrode (article n°2, Figure 5 C/D). En effet, le potentiel redox du couple fumarate/succinate vaut $E^\circ = +0,033$ V vs. ESH, l'électrode, elle, est polarisée à 0,51 V vs. ESH. Les bactéries oxydent l'acétate en CO_2 ($E^\circ_{\text{acétate}/\text{CO}_2} = -0,29$ V vs. ESH) et obtiennent les électrons nécessaires du fumarate ou de l'électrode. Dans le premier cas, le gain énergétique s'élève à 0,323 V ($\Delta U = 0,033 - (-0,29) = 0,323$ V) tandis qu'avec une électrode polarisée le gain s'élève à 0,80 V ($\Delta U = +0,51 - (-0,29) = 0,80$ V) (Figure 23 du chapitre 2). Toutefois, en poursuivant dans ces considérations thermodynamiques, cela signifierait que le fumarate est moins avantageux du point de vue énergétique pour la bactérie dès que l'électrode est polarisée à plus de 0,033V/ESH soit -0,277 V vs. Ag/AgCl. Or nos expériences montrent que les bactéries ne sont pas capables de transférer les électrons à une électrode polarisée à moins de 0,20 V vs. Ag/AgCl. La thermodynamique seule ne permet pas de comprendre les mécanismes. La cinétique des phénomènes de transfert est aussi très importante. De plus, il faut aussi considérer l'intervention du métabolisme des micro-organismes qui possède sûrement une cinétique lente par rapport aux phénomènes électrochimiques. Certains auteurs proposent que les micro-organismes conservent une partie significative (pas moins de 95%) d'énergie potentielle libérée par l'oxydation de l'acétate pour leur propre intérêt métabolique (Finkelstein et al. 2006). Une telle théorie pourrait expliquer en partie pourquoi même si le transfert d'électrons est possible, il n'apparaît pas en-dessous +0.20 V vs. Ag/AgCl.

Les voltammogrammes tracés à 10mV/s au cours de l'expérience 1 de l'article présentent des allures similaires quel que soit le potentiel auquel est polarisée l'électrode (article n°2, Figures 2). Les électrodes A, B, C et D sont toutes polarisées dans un même réacteur à +0,20 V vs. Ag/AgCl, +0,20 V vs. Ag/AgCl, -0,20 V vs. Ag/AgCl et +0,00 V vs. Ag/AgCl pendant les neuf premiers jours. Seules les électrodes A et B fournissent du courant en chronoampérométrie. Les densités de courant enregistrées au cours des voltammétries cycliques à +0,20 V vs. Ag/AgCl sont égales à 7,7, 7,0, 7,6 et 8,4A/m² pour les électrodes A, B, C et D respectivement. Ces résultats sont confirmés au cours de l'expérience n°2 présentée dans l'article. Ceci montre bien

que le phénomène détecté par voltammétrie cyclique (CV) est différent de celui détecté par chronoampérométrie (CA). De plus les voltammogrammes indiquent un phénomène d'oxydation qui démarre à -0,25 V vs. Ag/AgCl alors qu'en-dessous de +0,20 V vs. Ag/AgCl aucune oxydation n'est détectée par CA. Il faut noter que sur DSA et graphite les mêmes phénomènes étaient observés par CA et CV. En effet, les densités de courant obtenues en CVs suivent l'évolution de la CA.

Un modèle de transfert électronique sur acier inoxydable est donc proposé (article n°2, Figure 7). Quand l'état redox des premières bactéries adhérentes permet l'activation des voies métaboliques, le biofilm se développe autour de ces cellules, qui joue le rôle des "portails électrochimiques" à la surface de l'électrode. Les autres cellules ne peuvent certainement pas échanger directement et rapidement les électrons avec l'électrode, sinon le courant enregistré par CV augmenterait lorsque le biofilm se développe. On peut supposer que les cellules qui se développent autour des "portails électrochimiques" transfèrent les électrons à ces cellules « portails » par des pili conducteurs (Reguera et al. 2005). En effet, il a été démontré que les pili conducteurs étaient présents dans les biofilms fournissant des courants élevés. De plus, il a été prouvé que le transfert direct d'électrons entre les bactéries et l'électrode s'effectue par des cytochromes extra membranaires, cependant le transfert direct via les pilis conducteurs reste à démontrer (Holmes et al. 2006). En conclusion, il convient de noter que les biofilms observés sur les électrodes polarisées à 0,20 V vs. Ag/AgCl semblent être organisés en cercles de diamètre de 20 μ m environ, ce qui pourrait indiquer une organisation d'agrégats autour d'une cellule jouant le rôle de « portail électrochimique » (article n°2, figure 4-A).

Résultats complémentaires n'apparaissant pas dans l'article

Enfin, pour continuer les expériences avec des électrodes industrielles, le procédé a été répété avec une grille d'acier inoxydable 316L dans un milieu de culture contenant 10mM d'acétate. Cette électrode possède la même surface géométrique que les électrodes testées précédemment (2,5cm²) mais une surface développée supérieure estimée à 2,5x1,5 cm².

Pendant les premiers jours, le potentiel est fixé à 0,00 V vs. Ag/AgCl, puis le potentiel est basculé à 0,10 V vs. Ag/AgCl à partir du jour 5,6 jusqu'à la fin de l'expérience (jour 8). En fait, l'acier 316L qui constitue la grille est plus sensible à la corrosion par piqûres aux potentiels anodiques que ne l'est le 254SMO utilisé dans les expériences précédentes. La concentration élevée en chlorure est connue pour être un agent principal de la corrosion par piqûre. La concentration totale en chlorure dans le milieu étant ici de 29mM, il a été préféré de ne pas augmenter le potentiel à +0,20 V vs. Ag/AgCl comme cela avait été effectué précédemment avec le 254SMO.

À 0,00 V vs. Ag/AgCl, aucun courant n'est détecté, dès que le potentiel a été modifié à 0,10 V vs. Ag/AgCl, le courant augmente jusqu'à 3A/m² de surface géométrique (Figure 49). Une expérience menée en parallèle sur une plaque d'acier 254SMO polarisée à +0,20 V vs. Ag/AgCl, dans les mêmes conditions (concentration initiale en acétate 10mM) donnait une densité de courant maximum de 2,6A/m² (article n°2, Figure 1). Avec la grille de 316L, le même ordre de grandeur de densité de courant est obtenu mais à un potentiel plus faible de 0,10 V vs. Ag/AgCl. En augmentant le potentiel à 0,20 V vs. Ag/AgCl, des valeurs de courant plus élevées seraient peut-être obtenues, cependant comme précisé ci-dessus, il faut rester vigilant aux risques de corrosion à de tels potentiels. Ces résultats, s'ils sont confirmés seraient intéressants pour une utilisation de l'acier inoxydable en pile. Utiliser ce type de grille permettrait d'accroître les performances tout en conservant un encombrement minimum.

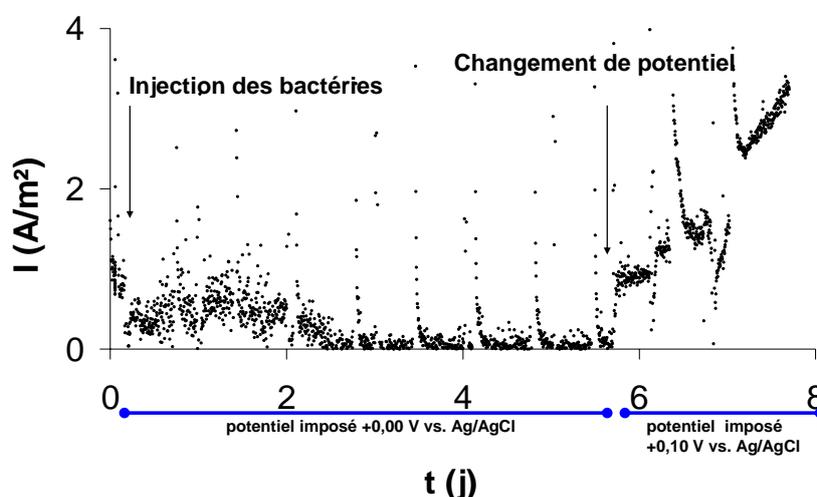


Figure 49 : Évolution de la densité de courant sur une grille d'acier 316L (2,5 cm² de surface géométrique) polarisée à +0,00 V vs. Ag/AgCl, puis à +0,10 V vs. Ag/AgCl à partir du jour 5.7. L'injection des bactéries a été effectuée au jour 0,2 dans un milieu contenant 10mM d'acétate.

2.3. Perspectives

Les densités de courant obtenues sur DSA et graphite sont plus importantes que celles rapportées dans la bibliographie. Les différences entre les valeurs de courant détectées sur les matériaux ont été corrélées aux différences de rugosité des matériaux. L'acier inoxydable n'a certes pas permis d'obtenir des densités de courant aussi importantes que le graphite ou les DSA, mais des analyses plus poussées, telles que celles réalisées par voltammétries cycliques, ou des analyses de rugosité, montrent que les performances de l'acier sont relativement bonnes. En effet, l'oxydation de l'acétate se produit à plus bas potentiel sur l'acier inoxydable que sur les deux autres matériaux. Augmenter la surface active en augmentant la rugosité permettrait d'atteindre des performances égales voire supérieures à celles du graphite ou des DSA. De la même façon, implanter des grilles de DSA dans des PACMs permettrait d'accroître le courant obtenu tout en profitant des atouts

industriels de ce type de matériau. Cependant, ce ne sont que des extrapolations. Des expériences supplémentaires sur des mousses ou grilles de 254SMO devraient être effectuées afin de vérifier si de fortes valeurs de courant peuvent être atteintes.

Dans la suite de ce chapitre, l'intérêt s'est porté sur l'interaction bactérie/électrode. Le paragraphe qui suit présente les expériences de spectroscopie d'impédance visant à étudier l'évolution des couches d'oxydes de l'acier inoxydable au cours du développement d'un biofilm électroactif de *G. sulfurreducens*.

3. Étude des propriétés semi-conductrices des couches passives sur acier inoxydable en présence de biofilm électroactif.

Le but de ces expériences est d'étudier l'éventuelle évolution de la couche passive de l'acier inoxydable sous l'effet du biofilm électroactif de *G. sulfurreducens*. Est-ce qu'une bactérie qui transfère directement les électrons à la surface de l'électrode et provoque ainsi une augmentation du courant traversant le matériau, contribue à modifier les couches passives de l'acier inoxydable? L'objectif était de tracer des courbes de Mott-Schottky pour suivre l'évolution de la couche passive au cours du temps et du développement du biofilm électroactif à la surface d'électrodes en acier inoxydable polarisées à +0,20 V vs. Ag/AgCl. Afin de déterminer à quelle fréquence les expériences devaient être effectuées, des spectres d'impédance ont été tracés. Les courbes de Mott-Schottky sur acier inoxydable sont habituellement tracées pour une valeur de fréquence située entre 1000 et 2000Hz (Hakiki et al. 1995; Da Cunha Belo M. et al. 1998; L'Hostis et al. 2003). La gamme de fréquence choisie pour effectuer les mesures encadre ces valeurs et s'étend de 100 à 100000Hz. Les mesures sont faites avant l'injection, après l'injection des bactéries et jusqu'à la croissance d'un biofilm mature.

3.1. État de l'art

Les études des propriétés électriques des films passifs (mesures de capacité) (Hakiki et al. 1995; Da Cunha Belo M. et al. 1998) montrent que ceux-ci ont des propriétés conductrices différentes selon les conditions expérimentales, le potentiel ou la composition du matériau.... Par exemple, la couche interne du film passif, enrichie en oxyde de chrome a un comportement de semi-conducteur de type p alors que la couche externe, enrichie en oxydes de fer a un comportement de type n (Tableau 10).

Oxide region	Composition	Thickness
Outer	$\text{Ni}_{0.75} \text{Fe}_{2.25} \text{O}_4$	~ 40 nm
Intermediate	$\text{Ni}_{0.75} \text{Fe}_{2.25} \text{O}_4 + \text{Fe}_3 \text{O}_4$	~ 80 nm
Inner	$(\text{Cr}_2 \text{O}_3 + \text{FeCr}_2 \text{O}_4) + \text{Fe}_3 \text{O}_4$	~ 80 nm
	metallic substrate	

Tableau 10 : Composition de la couche passive de l'acier inoxydable 316L (Hakiki et al. 1995)

Les courbes de Mott-Schottky montrent que le semi-conducteur de type p domine dans la région des potentiels inférieurs au potentiel de bande plate, alors que le semi-conducteur de type n domine aux potentiels supérieurs (Figure 50). La valeur du potentiel de bande plate est déterminée par l'intersection avec l'axe des abscisses pour les deux types de semi-conducteurs. Cette intersection n'est pas toujours visible sur les tracés expérimentaux. Les mêmes auteurs montrent que lorsque la couche d'oxydes est formée sous polarisation, la valeur du potentiel influence la pente des droites de la région de semi-conducteur de type n. Plus le potentiel imposé est cathodique, plus les pentes des courbes diminuent. Les oxydes de la couche externe se réduisent et font perdre le caractère semi-conducteur du film pour le rendre plus conducteur.

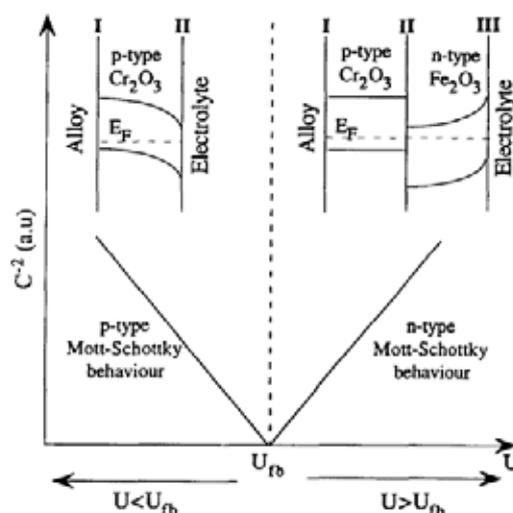


Figure 50 : Représentation schématique des modèles de la structure électronique des couches passives formées sur acier inoxydable (304L et alliage Fe-Cr). Ces modèles sont étudiés par mesures de capacité à des potentiels plus hauts ou plus bas que le potentiel de bande plate (U_{fb}). (Hakiki et al. 1995)

Un acier exposé dans l'eau de mer voit son potentiel libre (ou potentiel de corrosion) augmenter (Scotto et al. 1996), ce phénomène est appelé ennoblissement. Certains auteurs rapportent que cette augmentation de potentiel libre est liée à l'activité bactérienne qui modifierait les couches d'oxydes de l'acier (Maruthamuthu et al. 1996).

Des études en laboratoire, visant à simuler l'action de biofilms naturels sur acier inoxydable 316L, ont été réalisées en utilisant de l'« eau de mer artificielle biochimique » c'est-à-dire une eau contenant les principaux constituants de l'eau de mer naturelle (NaCl, MgCl₂, Na₂SO₄, CaCl₂, KCl, NaHCO₃) auxquels est ajouté un système enzymatique (glucose + glucose oxydase) qui catalyse l'oxydation du glucose. L'enzyme oxyde le glucose et réduit l'oxygène pour libérer du peroxyde d'hydrogène et un acide. Le peroxyde d'hydrogène se réduit à la surface de l'électrode. Cette réaction favoriserait l'augmentation des courants cathodiques (paragraphe 4.6.2 du chapitre 1). Des études de Mott-Schottky confirment que la couche d'oxydes sur l'acier 316L exposé à une « eau de mer artificielle biochimique » se comporte comme un semi-conducteur de type n (L'Hostis et al. 2003). Une augmentation de la densité de donneur d'électrons sur l'acier 316L a aussi été constatée, la couche d'oxydes dans ce cas possède un caractère plus conducteur.

L'étude menée ici par spectroscopie d'impédance, apparaît à notre connaissance comme la première étude sur des électrodes délivrant du courant en conditions contrôlées (potentiel imposé) visant à la compréhension des interactions biofilms électroactifs/matériaux. En effet, la plupart des études d'impédance en présence de biofilms sont effectuées afin de déterminer l'influence des biofilms sur la corrosion des matériaux. Ils étudient l'acier tel qu'il est dans son environnement naturel, c'est-à-dire en potentiel libre. Les articles se focalisent sur l'influence des bactéries, telles des bactéries sulfato-réductrices (BSR) souvent dénoncées en corrosion anaérobie, et en particulier sur la corrosion de l'acier inoxydable (Sheng et al. 2007). Il faut noter que bien que les biofilms développés sur l'électrode provoquent quelques transferts électroniques de part leur activité (paragraphe 4.6.2 du chapitre 1), aucun fort courant ne traverse l'électrode. Les études sont réalisées en potentiel libre dans une gamme de fréquences de 1mHz à 100kHz (Sheng et al. 2007).

Les résultats obtenus en spectroscopie d'impédance, par l'analyse des diagrammes de Nyquist à l'aide de circuits équivalents, donnent des informations sur l'interface biofilm/électrode, notamment sur la formation du biofilm et ses caractéristiques. Sheng et al. montrent ainsi qu'un biofilm marin et un biofilm de *D.desulfuricans* sur une électrode d'acier ne se forment pas de la même manière et n'évoluent pas non plus de la même manière avec le temps (Sheng et al. 2007). Les bactéries marines s'attachent à l'électrode, forment un biofilm qui grossit, puis se détache. Ensuite, de nouvelles bactéries adhèrent à nouveau à l'électrode. En revanche, un biofilm de *D.desulfuricans* s'accumule au cours du temps sur l'électrode. Des différences de morphologies ont aussi été constatées : le biofilm marin se révèle compact alors que le biofilm de *D.desulfuricans* est poreux. Les analyses par spectroscopie d'impédance permettent en outre de déterminer la

présence d'un dépôt de sulfure de fer (FeS) sur l'électrode au cours de la formation du biofilm marin.

Gonzalez et al. présentent l'influence d'un biofilm de bactéries provenant de l'eau de mer sur la corrosion de l'acier inoxydable 316L (González et al. 1998). Les résultats obtenus par spectroscopie d'impédance montrent que la résistance de la couche passive diminue avec le temps d'exposition à l'eau de mer et le développement du film biologique. La couche passive devient moins protectrice et, par conséquent, la résistance à la corrosion diminue. Les circuits équivalents ont permis de montrer que le biofilm devenait plus poreux avec le temps, et ont également mis en évidence des phénomènes de diffusion. La diminution de la résistance de diffusion au cours du temps est attribuée à la présence de bactéries « enlacées » et de produits de corrosion, éléments constatés sur l'acier au cours d'observations au MEB, qui permettent l'accès à la surface libre du métal.

Les mesures d'impédance se sont déjà révélées comme un outil puissant pour la détection des biofilms (Muñoz-Berbel et al. 2006). Muñoz et al. modélisent les interfaces à l'aide d'une résistance (de l'électrolyte) mise en série d'un élément à phase constante (*constant phase element* : CPE). L'élément qui caractérise le CPE, généralement noté Q, est noté Kdl par les auteurs, et représente l'inverse de Q. Les auteurs constatent qu'au cours de l'adhésion des bactéries et de la formation du biofilm, Kdl diminue. Les résultats montrent que Kdl augmente après le nettoyage de l'électrode pendant 20 minutes avec du peroxyde d'hydrogène à 30%. Selon les auteurs, les mesures d'impédance fournissent une technique facile, reproductible, et économique pour suivre la formation de biofilm dans les réseaux d'eau potable. En outre, les mesures d'impédance peuvent être utiles pour surveiller l'efficacité du nettoyage d'une surface recouverte par les biofilms.

Zuo et al. étudient la protection d'un acier par un biofilm de *Bacillus subtilis* WB600 et constatent par impédance que lorsque des antibiotiques sont ajoutés pour détruire le biofilm, l'action protectrice de ce dernier disparaît : des piqûres apparaissent après quelques heures (Zuo R. et al. 2005).

En ce qui concerne les biofilms électroactifs, quelques articles rapportent des tests de spectroscopie d'impédance afin de déterminer, par exemple, les limitations de leur PACM. He et al. ont ainsi caractérisé les éléments prépondérants de la résistance interne de leur PACM (He et al. 2006b). Dans une gamme de fréquence de 1 à 100 kHz, la résistance de l'électrolyte apparaît comme étant l'élément qui limite les performances de la pile. Selon les auteurs, pour diminuer la résistance interne, des améliorations doivent être faites sur le *design* des réacteurs. Les équipes de Verstraete et de Logan ont démontré que réduire la distance entre les électrodes, diminue la résistance interne (Liu et al. 2005a; Rabaey et al. 2005b). Un article récent présente les études par

spectroscopie d'impédance effectuées afin de mesurer les pertes ohmiques au niveau de l'anode d'une PACM à cathode tournante (He et al.).

Le paragraphe qui suit présente les résultats des expériences de spectroscopie d'impédance réalisées sur des électrodes d'acier inoxydable en présence de biofilm de *G. sulfurreducens* au cours de l'oxydation de l'acétate.

3.2. Résultats

Afin d'étudier l'évolution de la couche d'oxydes sur l'acier inoxydable au cours de la catalyse de l'oxydation de l'acétate par *G. sulfurreducens*, l'anode a été polarisée à +0,20 V vs. Ag/AgCl. Comme dans les expériences précédentes (paragraphe 2), le courant reste égal à zéro en absence de bactéries puis augmente rapidement quelques jours après l'injection des bactéries (jour 15), jusqu'à atteindre 1,6 A/m² et ce pour 5mM d'acétate dans le milieu (Figure 51).

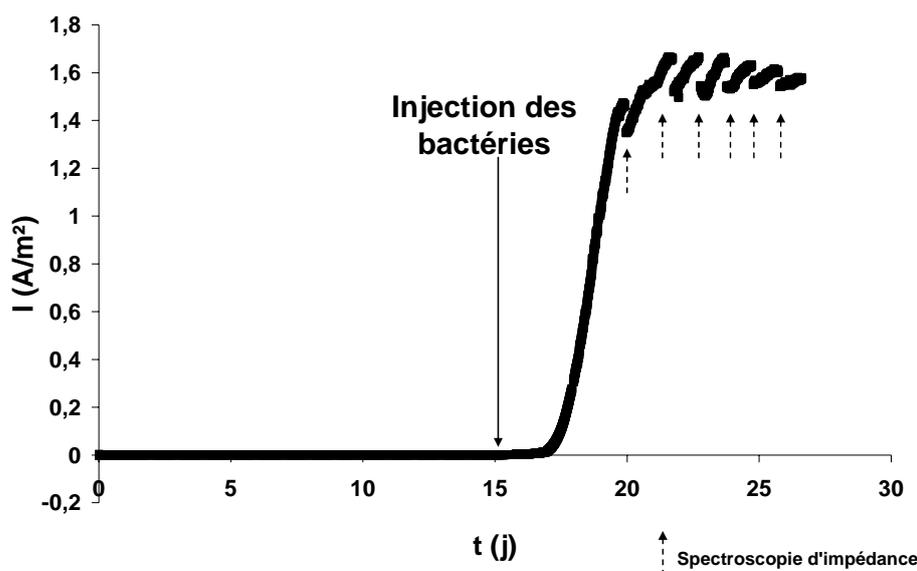


Figure 51 : Évolution de la densité de courant, en A/m², en fonction du temps, en jours, sur une électrode d'acier inoxydable polarisée à +0,20 V vs. Ag/AgCl en présence de *G. sulfurreducens* dans un milieu de culture contenant 5mM d'acétate

Des mesures par spectroscopie d'impédance (de 100 à 100000Hz) à potentiel imposé ont été effectuées toutes les 24 heures, avec une amplitude de perturbation de 10mV. Les mesures de Mott-Schottky ont aussi été effectuées quotidiennement à trois fréquences différentes (100, 200 et à 1000Hz) pour des potentiels allant de -0,50 à 0,50 V vs. Ag/AgCl, avec la même amplitude de perturbation. Seules les mesures effectuées à 200 et 1000Hz sont présentées dans ce

manuscrit. Bien que les mesures ne durent que quelques secondes, on peut constater que lorsque le biofilm est mature, il est affecté par ces mesures d'impédance, le courant chute après chaque mesure mais retrouve une valeur maximale après quelques heures (Figure 51 après environ 17 jours). À la fin de l'expérience, au jour 30, le biofilm est retiré de l'électrode mécaniquement à l'aide d'un papier humide imbibé d'éthanol, l'électrode est rincée à l'eau distillée, puis replacée dans le milieu pour les dernières analyses de spectroscopie d'impédance.

3.2.1. Influence du biofilm sur les diagrammes d'impédance

Les mesures d'impédance effectuées ont permis de tracer des diagrammes de Nyquist ($-Z_j=f(Z_r)$) présentées en Figure 52 et Figure 55, de Bode en Figure 53-A et B ($\text{Phase}=f(\text{freq})$ et $\text{Log}(|Z|)=f(\text{freq})$).

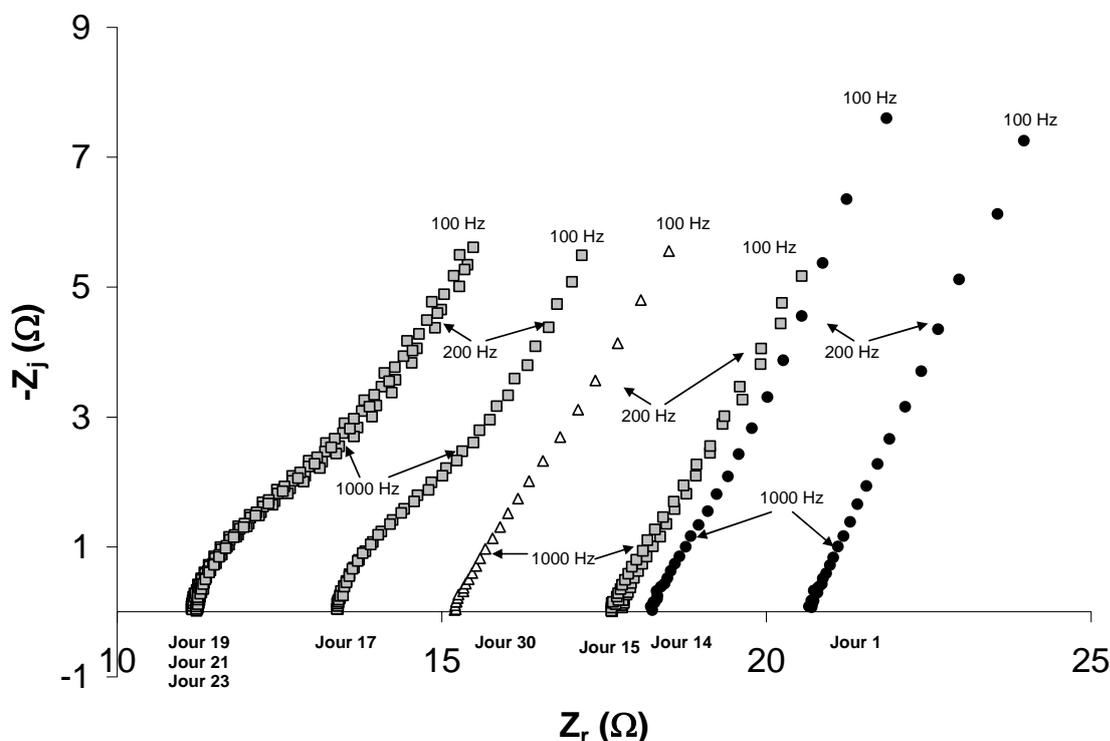
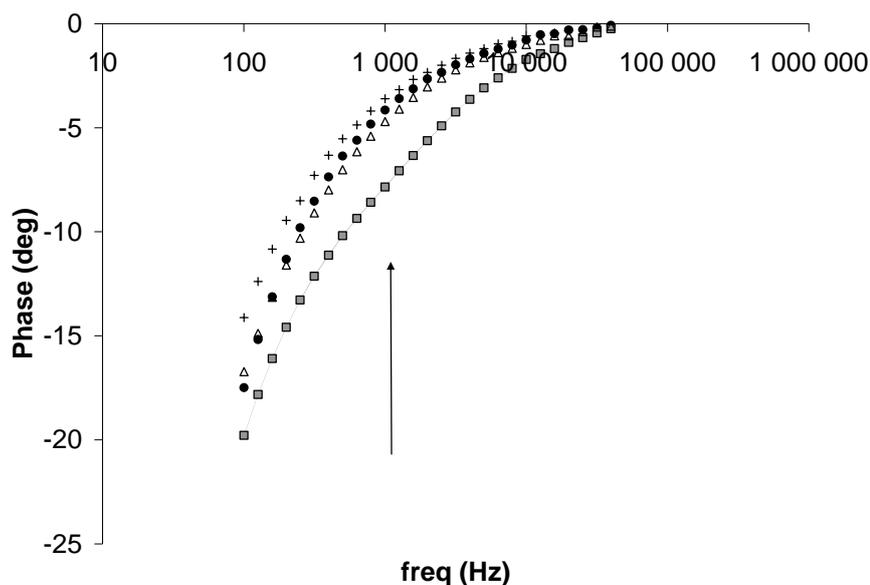
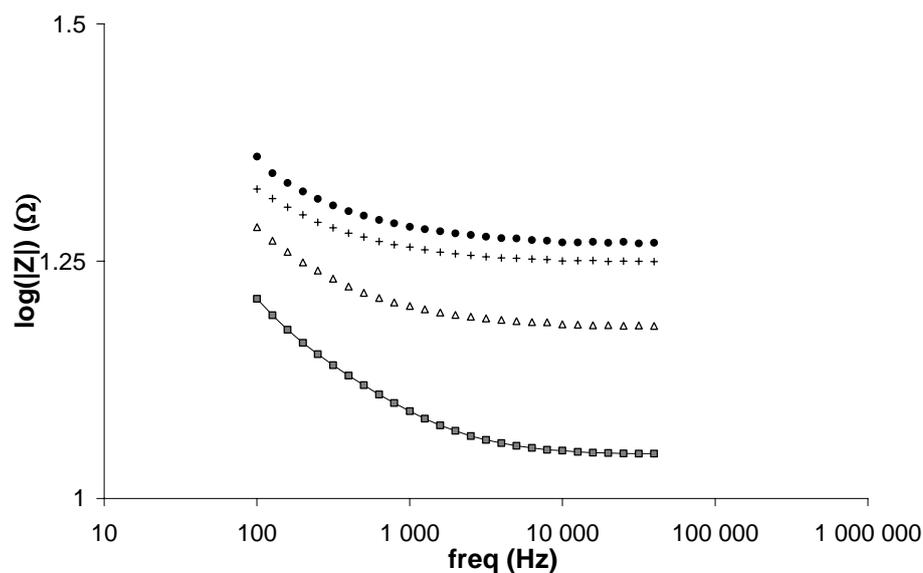


Figure 52 : Diagramme de Nyquist. Évolution de l'impédance du système électrode / biofilm. L'électrode en acier inoxydable est polarisée à +0,20 V vs. Ag/AgCl. La gamme de fréquence d'étude est [100Hz - 100000Hz]. Les courbes sont tracées : ● avant l'injection des bactéries (jours 1 et 14) ; ■ avec un biofilm mature développé sur l'électrode fournissant du courant (jours 17,19,21,23); et Δ lorsque le biofilm est retiré de l'électrode (jour 30).



A



B

Figure 53 : Diagramme de Bode. L'électrode en acier inoxydable est polarisée à +0,20 V vs. Ag/AgCl. La gamme de fréquence d'étude est [100Hz -100000Hz]. Les courbes sont tracées : ● avant l'injection des bactéries (jour 9) ; + tout de suite après l'injection des bactéries (jour 15); ■ avec un biofilm mature développé sur l'électrode fournissant du courant (jour 21); et Δ lorsque le biofilm est retiré de l'électrode (jour 30).

A : Tracé de la phase en degré, en fonction de la fréquence. La flèche sur la Figure 53-A représente le point d'inflexion caractéristique de la présence d'une constante de temps supplémentaire.

B : Tracé de $\log |Z|$ en fonction de la fréquence en échelle logarithmique

Sur le diagramme de Nyquist (Figure 52), au départ le système en l'absence de bactéries est représenté par une droite inclinée. Au jour 1, la résistance de la solution, représentée par l'intersection avec l'axe des réels, est autour de 21 Ω . Au jour 14, juste avant l'inoculation, la droite inclinée est identique à celle du jour 1, elle est simplement translatée jusqu'à une valeur de résistance proche de 18,7 Ω . Immédiatement après l'inoculation au jour 15, la pente de la droite reste identique, la valeur de la résistance est proche de 17,6 Ω . Il faut noter que du jour 1 à 15, aucun courant n'est détecté sur la courbe de chronoampérométrie. Au jour 17 en revanche, lorsque le courant commence à augmenter, la résistance de la solution diminue et se situe autour de 11,1 Ω . Le système n'est plus uniquement représenté sur les diagrammes de Nyquist par une droite inclinée mais un demi-cercle vient s'ajouter aux hautes fréquences entre 1 et 10 kHz. La droite qui apparaît aux fréquences les plus basses semble posséder la même pente que celle en absence du biofilm. Le phénomène additionnel rencontrés aux hautes fréquences peut être observé sur les courbes de phase (Sheng et al. 2007). En effet, un point d'inflexion supplémentaire (noté par la flèche sur la Figure 53), et par conséquent une nouvelle constante de temps est observée autour de 1000Hz sur la Figure 53. À partir du jour 19, les courbes n'évoluent plus, cela correspond au moment où le courant commence à se stabiliser. Dès que le biofilm est enlevé, aucun courant n'est plus détecté (jour 30), le demi-cercle aux hautes fréquences disparaît et le système est à nouveau représenté par une droite inclinée.

Ces résultats ont été modélisés par des circuits équivalents à l'aide du logiciel Zview. Avant l'injection des bactéries, le système peut être représenté par un circuit équivalent constitué d'une résistance R_s , représentant la résistance de la solution, en série avec un élément à phase constante CPE_{PL} (*constant phase element*) (Figure 55).

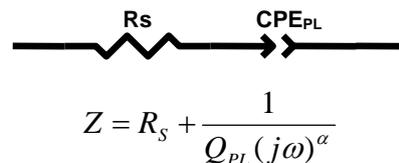


Figure 54 : Circuit équivalent représentant le système en l'absence de bactéries. R_s : Résistance de l'électrolyte, CPE_{PL} : élément à phase constante

La présence d'un CPE s'explique par les effets de dispersion en fonction de la fréquence, et les variations de propriétés de la couche d'oxydes selon la normale à la surface. Le CPE_{PL} représente le comportement de l'interface couche passive/solution. Aucune résistance n'a été mise en parallèle de ce CPE car pour un métal passif la résistance du film passif est grande et de l'ordre de la dizaine de $M\Omega.cm^{-2}$. Cette valeur n'avait aucune influence sur le système. La simulation,

représentée sur la Figure 55, montre que le CPE_{PL} a pour caractéristique $Q_{PL}=1,24.10^{-3} \Omega^{-1}.s^{\alpha}$ et $\alpha_{PL}=0,71$.

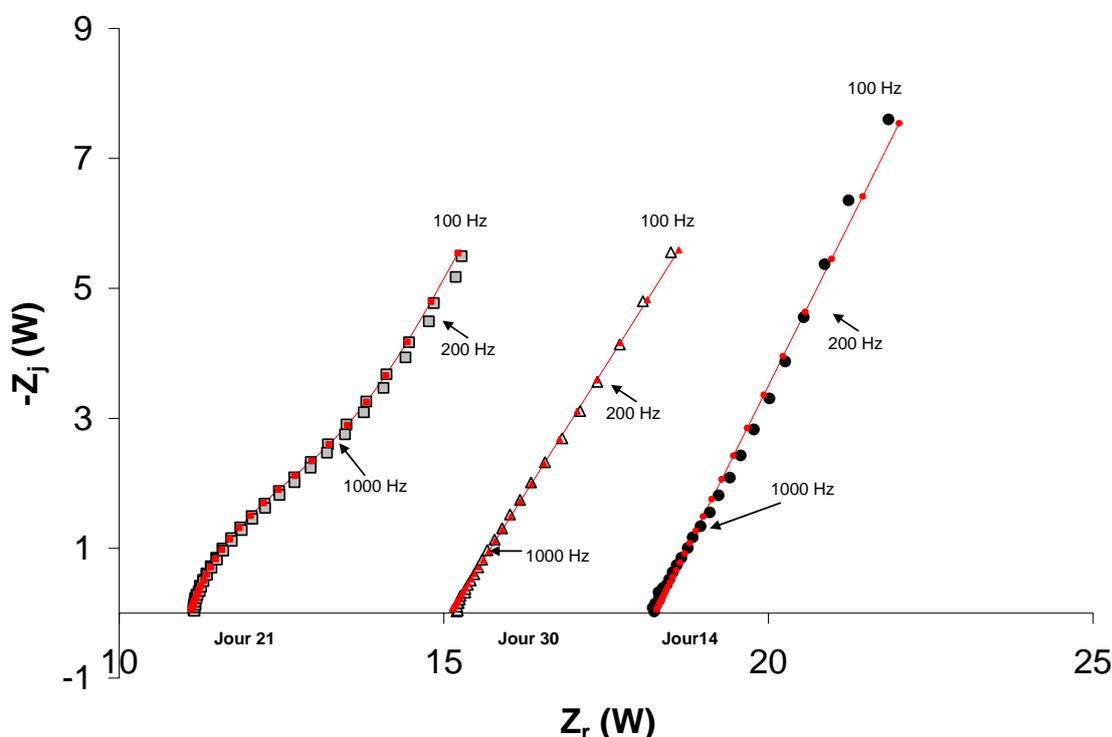


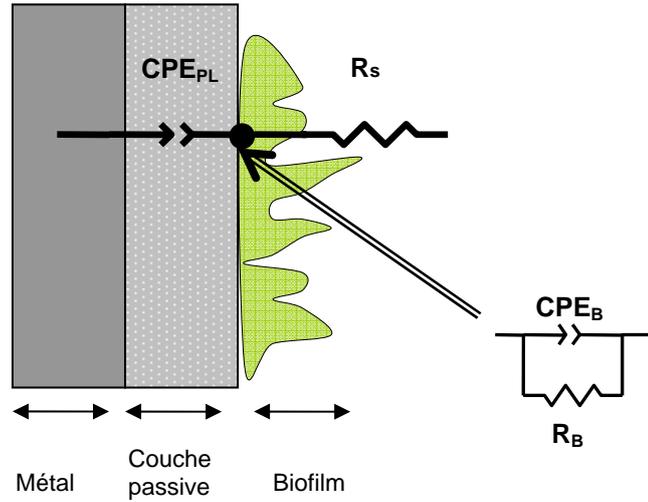
Figure 55 : Diagramme de Nyquist comparant les résultats expérimentaux aux résultats de la modélisation par circuits équivalents. Les courbes sont tracées :

- au jour 14, avant l'injection des bactéries : ● résultats expérimentaux, —●— simulation
- au jour 21, avec un biofilm mature développé sur l'électrode fournissant du courant : ■ résultats expérimentaux, —■— simulation
- au jour 30, lorsque le biofilm est retiré de l'électrode : Δ résultats expérimentaux, —▲— simulation

Après l'injection des bactéries et au cours de la formation du biofilm, le système peut être modélisé par le CPE_{PL} en série avec un circuit CPE_B/R_B constitué d'un CPE en parallèle avec une résistance qui représente le biofilm et l'interface de ce dernier avec la solution (Figure 56). La résistance de la solution diminue jusqu'à $11,1 \Omega$. Cette diminution peut être due à une importante concentration ionique dans le biofilm qui se développe à la surface de l'électrode.

Le CPE_{PL} a pour caractéristique $Q_{PL}=2,00.10^{-3} \Omega^{-1}.s^{\alpha}$ et $\alpha_{PL}=0,70$, ces valeurs sont très proches de celles obtenus quand l'électrode n'était pas recouverte par le biofilm. Ceci signifie que la couche d'oxydes, représentée par le CPE, n'est pas modifiée par la présence du biofilm. Par ailleurs, la valeur de Q_B capacité du biofilm est évaluée à $321 \mu\Omega^{-1}.s^{\alpha}$ avec $\alpha_B = 0,9$, et la résistance R_B est faible et égale à $1,6 \Omega$. Dans les articles de la bibliographie, le biofilm est représenté par un

CPE, dont les caractéristiques se situent entre $1 \mu\Omega^{-1}.s^\alpha$ et environ $100 \mu\Omega^{-1}.s^\alpha$ pour des biofilms de quelques semaines (González et al. 1998; Sheng et al. 2007). Le biofilm électroactif étudié ici semble posséder des caractéristiques de capacité plus élevées.



$$Z = R_s + \frac{1}{Q_{PL}(j\omega)^{\alpha_{PL}}} + \frac{R_B}{1 + R_B Q_B(j\omega)^{\alpha_B}}$$

Figure 56 : Circuit équivalent représentant le système en présence d'un biofilm mature sur l'électrode capable de fournir $1,6A/m^2$. R_s : Résistance de l'électrolyte, CPE_{PL} : *constant phase element* de la couche passive, R_B : Résistance du biofilm, CPE_B : *constant phase element* du biofilm

Le paramètre Q du CPE n'a pas de sens physique. La valeur de la capacité correspondante peut être estimée à partir des valeurs des paramètres Q et α suivant la méthode de Brug-den Eeden (Marconnet 2007). La résistance basse fréquence est déterminée par interpolation de la boucle capacitive, c'est-à-dire l'intersection, à basse fréquence, avec l'axe des abscisses. La capacité du biofilm peut être calculée à l'aide de la formule de Brug-den Eeden en prenant $R_{BF} = R_B$ et $\alpha = \alpha_B$:

$$C_{brug} = (Q.R_{BF}^{(1-\alpha)})^{\frac{1}{\alpha}}$$

A l'aide de cette formule, la valeur de la capacité équivalente du biofilm est estimée à $C_{B\text{équiv.}} = 138\mu F$. La fréquence caractéristique de ce système CPE_B/R_B du biofilm peut être estimée grâce à la formule suivante $1/(2\pi R_B C_{B\text{équiv.}})$ à 721Hz. Cette fréquence se situe dans la gamme de fréquence où apparaissait un point d'inflexion supplémentaire sur la courbe de phase (Figure 53-A).

Il est important de noter que le comportement CPE utilisé dans la formule de Brug-den Eeden est lié à des variations des propriétés du film dans le plan de la surface utile. La formule de Brug s'adapte donc bien au biofilm dont le développement est hétérogène sur la surface de l'électrode. Par contre, cette formule ne peut pas être appliquée à une couche d'oxydes. En effet, il a été

démontré auparavant que le comportement en impédance locale des films passif est de type CPE, ce qui indique une variation des propriétés du film d'oxydes dans la direction normale à la surface utile.

Lorsque le biofilm est enlevé de la surface de l'électrode et que cette dernière est placée à nouveau dans le milieu, les diagrammes de Nyquist peuvent être modélisés par le premier modèle (Figure 55). La résistance de la solution est un peu plus élevée que celle obtenue sur une électrode avec biofilm (15,1 Ω). Les caractéristiques du CPE restent proches de celles citées précédemment $Q_{PL}=2,42.10^{-3} \Omega^{-1}.s^{\alpha}$ et $\alpha_{PL}=0,64$.

Le Tableau 11 regroupe les valeurs des différents paramètres des circuits équivalents correspondant aux simulations représentées sur la Figure 55.

	Avant l'injection	Avec biofilm mature	Après retrait du biofilm
$R_s (\Omega)$	18,7	11,1	15,1
$R_s (\Omega.cm^2)$	37,4	22,2	30,2
$Q_{PL} (\Omega^{-1}.s^{\alpha})$	$1,24.10^{-3}$	$2,00.10^{-3}$	$2,42.10^{-3}$
$Q_{PL} (\Omega^{-1}.s^{\alpha}.cm^{-2})$	$4,9.10^{-4}$	$8,0.10^{-4}$	$9,7.10^{-4}$
α_{PL}	0,71	0,70	0,64
$Q_B (\Omega^{-1}.s^{\alpha})$		321.10^{-6}	
$Q_B (\Omega^{-1}.s^{\alpha}.cm^{-2})$		$128,4.10^{-6}$	
$C_{Béquivé} (F)$		$138 .10^{-6}$	
$C_{Béquivé} (F.cm^{-2})$		$55,2.10^{-6}$	
α_B		0,90	
$R_B(\Omega)$		1,6	
$R_B(\Omega.cm^2)$		3,2	
χ^2	$3,2.10^{-4}$	$1,3.10^{-4}$	$9,7.10^{-5}$

Tableau 11: Valeurs moyennes des paramètres des circuits équivalents représentant le système électrode/biofilm et du χ^2 représente la variance, qui permet de caractériser la dispersion des données du modèle par rapport aux données expérimentales.

En synthèse, il apparaît donc qu'avant l'injection des bactéries, le système couche passive de l'acier/solution se comporte comme un CPE. Le CPE traduit l'hétérogénéité de la surface de

l'acier selon la normale à la surface. Le système se comporte comme une capacité seule présentant une dispersion en fonction de la fréquence, traduite par le terme α .

Lorsque les bactéries forment un biofilm mature sur l'électrode, le système ne se comporte plus uniquement comme un CPE mais il est nécessaire d'ajouter, en série un autre CPE_B et une résistance R_B en parallèle qui caractérisent l'influence du biofilm. Les caractéristiques du film passif CPE_{PL} restent inchangées, signifiant que le biofilm n'a pas d'influence sur la couche passive de l'acier. La résistance R_B du biofilm est faible et ne limite pas le transfert de charges. Ceci correspond bien aux forts courants obtenus sur l'acier (Figure 51). La valeur du Q_B est du même ordre de grandeur que celles obtenues dans la bibliographie.

Quand le biofilm est enlevé de l'électrode, le système est à nouveau caractérisé par un CPE représentant la couche passive de l'acier. Les valeurs caractéristiques, Q_{PL} et α_{PL} , restent quasiment identiques tout au long de l'expérience, que le biofilm soit présent ou non sur l'électrode. Cela montre que le biofilm n'influence pas la structure électronique de la couche d'oxydes du matériau.

Le système CPE_B/R_B apparaît en série du CPE_{PL}, lorsque le biofilm est présent et surtout lorsque le courant traverse l'électrode. Les diagrammes de Nyquist montrent aussi que le système CPE_B/R_B n'est visible qu'aux hautes fréquences, au-dessus de 1000Hz. Les analyses de la couche passive de l'acier en présence de biofilm peuvent donc être faussées si elles sont effectuées au-dessus de 1000Hz. Des fréquences inférieures à 1000Hz devront être utilisées pour analyser la couche passive de l'acier. Ici, dans la gamme de fréquences étudiée, le comportement de la couche passive ne change pas en présence du biofilm. Ceci peut être dû au fait que l'électrode est polarisée. En effet, les études sont faites à potentiel imposé et non en circuit ouvert comme dans la plupart des études précédentes. Dans la bibliographie, les auteurs notent que la couche passive de l'acier est influencée par la croissance d'un biofilm sur le matériau. L'activité bactérienne pourrait faire varier le potentiel libre du matériau (paragraphe 4.6.2 du chapitre 1), et ainsi influencer le comportement semi-conducteur de la couche passive. Dans notre cas, c'est le potentiostat qui impose le potentiel, le fait qu'un biofilm électroactif se développe sur l'acier ne semble pas modifier la couche passive.

Au cours de cette étude les valeurs du paramètre Q_{PL} du CPE évoluent peu et sont de l'ordre de $2.10^{-3} \Omega^{-1}.s^{\alpha}$. Ces valeurs sont très élevées. Dans la littérature les valeurs habituelles se situent autour de $1.10^{-5} \Omega^{-1}.s^{\alpha}$ (Marconnet 2007; Sheng et al. 2007). Le CPE présenté ici, représenterait peut-être un phénomène plus complexe qui n'englobe plus uniquement le phénomène capacitif de la couche d'oxydes. De plus, les valeurs du facteur α_{PL} sont faibles. Habituellement, ce facteur

se situe entre 0,8 et 0,9 (Marconnet 2007). Cependant, des valeurs plus faibles entre 0,6 et 0,7 ont été rencontrées en présence de biofilm de plusieurs semaines (35 jours)(Sheng et al. 2007). De faibles valeurs de α indiquent que la couche passive est très poreuse. Dans notre étude, α_{PL} diminue avec le temps de polarisation. La couche d'oxydes formée serait donc de plus en plus hétérogène (dispersion plus large des temps de réponse). Des valeurs de α_{PL} faibles entraînent une grande variation de la capacité pour une petite gamme de fréquences. Ainsi, les valeurs du paramètre Q, calculées ici, peuvent être faussées du fait que les graphes n'ont été tracés qu'à des fréquences supérieures à 100Hz.

3.2.2. Mott-Schottky à 200Hz et à 1000Hz

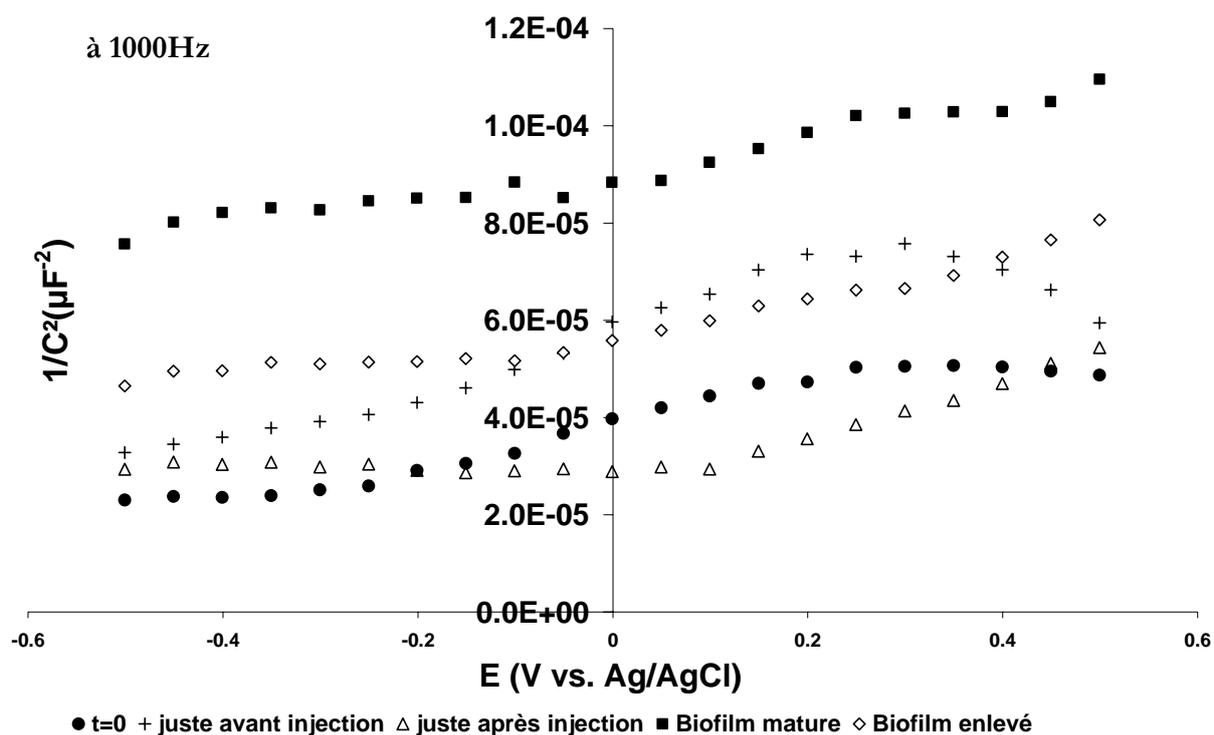
Les courbes de Mott-Schottky permettent de caractériser la capacité globale du système et les caractéristiques semi-conductrices du matériau d'électrode. De plus, les mesures se font très rapidement et ne perturbent pas le système étudié.

La Figure 57-A présente des courbes de Mott-Schottky ($C^2 = f(E)$) réalisées à 200 et 1000Hz sur une gamme de potentiels de -0,50 V vs. Ag/AgCl à 0,50 V vs. Ag/AgCl, pour cinq jours différents : en début d'expérience, immédiatement avant l'injection des bactéries, juste après l'injection des bactéries, lorsque le biofilm développé sur l'électrode est mature et enfin lorsque le biofilm est enlevé de la surface de l'électrode en la frottant avec un papier humide.

À 1000Hz, à $t=0$, la courbe est horizontale de -0,50 à -0,20 V vs. Ag/AgCl puis la pente devient positive jusqu'à 0,35 V vs. Ag/AgCl environ, enfin jusqu'à 0,50 V vs. Ag/AgCl la pente s'inverse et devient négative (Figure 57). Juste avant l'injection des bactéries c'est-à-dire après 14 jours de polarisation, la courbe est similaire à la précédente, mais décalée vers des valeurs plus élevées de C^2 . Immédiatement après l'injection des bactéries avant que le biofilm ne se développe, la courbe est horizontale de -0,50 à +0,10 V vs. Ag/AgCl environ puis la pente devient positive. Lorsque le biofilm est mature, la courbe présente une pente positive mais légèrement plus faible sur toute la gamme de potentiel. Quand le biofilm est enlevé de la surface de l'électrode, la courbe est similaire à celle obtenue juste après l'injection des bactéries.

À 1000Hz, l'allure de la courbe et la pente des courbes semblent influencées par la présence de bactéries dans le milieu (pente positive puis légèrement négative sans bactéries, pente toujours positive avec bactéries). De plus, la capacité de charge d'espace paraît affectée par la présence d'un biofilm à la surface de l'électrode, la valeur de C est plus faible lorsqu'un biofilm mature est présent à sa surface (Tableau 12).

À 200Hz, à t=0 et avant l'injection des bactéries, les courbes se superposent, la pente des courbes est légèrement positive entre -0,50 et -0,20 V vs. Ag/AgCl, puis augmente entre -0,20 et +0,35 V vs. Ag/AgCl et enfin s'inverse et devient négative (Figure 57-B). Juste après l'injection des bactéries, la courbe est horizontale entre -0,50 et +0,10 V vs. Ag/AgCl, puis devient positive. Lorsque le biofilm est mature, la pente de la courbe est positive sur toute la gamme de potentiel. Lorsque le biofilm est enlevé, la courbe est similaire à celle obtenue immédiatement après l'injection des bactéries mais décalée vers des valeurs de C^{-2} plus élevées.



A

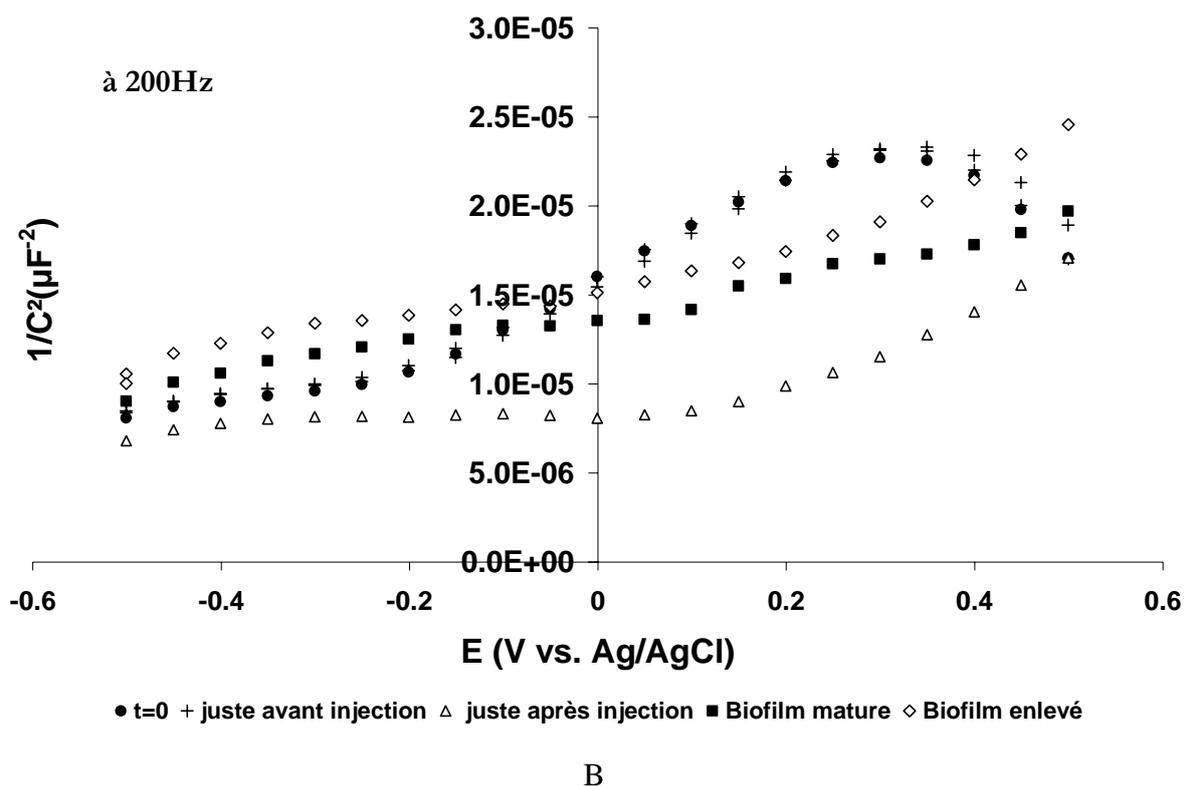


Figure 57 : Évolution de la capacité de charge d'espace en fonction du potentiel en V vs. Ag/AgCl, à A. 1000Hz et B. 200Hz.

À 200Hz, l'allure des courbes semble également affectée par la présence des bactéries dans le milieu de culture. Cependant, le développement du biofilm sur l'électrode n'affecte que peu la valeur de la capacité (Tableau 12).

		t=0	Avant l'injection	Juste après l'injection	Biofilm mature	Après avoir enlevé le biofilm
1000Hz	$C^{-2} (\mu F^{-2})$	4.10^{-5}	6.10^{-5}	$3 \text{ à } 5.10^{-5}$	9.10^{-5}	6.10^{-5}
	C (μF)	158	129	141 à 182	105	129
	C ($\mu F.cm^{-2}$)	63,2	51,6	56,4 à 72,8	42	51,6
200Hz	$C^{-2} (\mu F^{-2})$	$1 \text{ à } 2.10^{-5}$	$1 \text{ à } 2.10^{-5}$	$0,75 \text{ à } 1,5.10^{-5}$	$1,5.10^{-5}$	$1 \text{ à } 2,5.10^{-5}$
	C (μF)	223 à 316	223 à 316	258 à 365	258	200 à 316
	C ($\mu F.cm^{-2}$)	89,2 à 126,4	89,2 à 126,4	103,2 à 146	103,2	80 à 126,4

Tableau 12 : Tableau récapitulatif des valeurs de C^{-2} et de C correspondantes depuis le début de l'expérience jusqu'à la croissance d'un biofilm de *G. sulfurreducens* mature sur l'électrode et enfin après avoir enlevé le biofilm

À 1000Hz, l'inverse de la capacité augmente avec le temps et en présence du biofilm. Une hypothèse serait qu'à cette fréquence lorsque le biofilm se développe sur l'électrode le CPE du biofilm viendrait s'ajouter au CPE de la couche passive. Comme les circuits sont en série leur impédance s'ajoute, en l'occurrence, $\frac{1}{Q_{PL}(j\omega)^{\alpha_{PL}}} + \frac{1}{Q_B(j\omega)^{\alpha_B}}$. Ceci correspondrait à l'augmentation observée sur les courbes de Mott-Schottky.

En revanche, à 200Hz, seul le CPE de la couche d'oxydes apparaîtrait. Sur les courbes de Mott-Schottky, l'inverse de la capacité diminue légèrement en présence du biofilm mature. Ceci correspond bien aux valeurs de CPE déterminées par la simulation. En effet, la valeur de Q_{PL} augmente légèrement avec le temps.

D'après les résultats obtenus à l'aide des diagrammes de Nyquist, à une fréquence de 200Hz, c'est la capacité de la couche passive qui serait caractérisée alors qu'à 1000Hz, la capacité du biofilm rentrerait aussi en compte.

Les pentes entre -0,20 et 0,50 V vs. Ag/AgCl sont positives, indiquant que l'acier a tendance à avoir un comportement de type n. Une mesure de la pente par régression linéaire permet de calculer la densité de porteurs de charges c'est-à-dire les électrons dans le cas d'un semi-conducteur de type n. Ce calcul a été effectué avec le logiciel EC-Lab. Toutefois, comme les pentes des courbes présentent de faibles variations, les densités de porteurs de charges ne peuvent donner qu'un ordre de grandeur.

À 1000Hz, la densité de porteurs de charges, sont de l'ordre de 10^{22} cm^{-3} , et augmentent légèrement après l'injection des bactéries. À 200Hz, la densité de donneurs d'électrons est aussi du même ordre de grandeur en l'absence de bactéries, 10^{22} cm^{-3} , mais devient plus importante après l'injection des bactéries, 10^{23} cm^{-3} . Une fois le biofilm enlevé, les valeurs de densité de porteurs de charges sont similaires à celles obtenues juste après l'injection. Ce résultat semble confirmer l'observation effectuée sur les courbes de Mott-Schottky, présentant une pente similaire une fois le biofilm enlevé et juste après l'injection des bactéries.

Cependant, les valeurs de densité de donneurs sont plus importantes que celles mesurées précédemment sur des échantillons placés en circuit ouvert (L'Hostis et al. 2003; Marconnet 2007) (de l'ordre de 10^{18} cm^{-3}).

Les valeurs de capacité obtenues se situent entre 100 et 365 μ F. La capacité de la couche d'oxydes est égale à $C_{PL} = \frac{\epsilon\epsilon_0 S}{d}$ avec S la surface de l'échantillon en contact avec l'électrolyte, d l'épaisseur

de la couche d'oxydes, ϵ_0 et ϵ sont respectivement la perméabilité du vide et la constante diélectrique du semi-conducteur. L'épaisseur du film passif peut donc être estimée. En prenant la constante diélectrique égale à 12, une permittivité du vide de $8,85 \cdot 10^{-12} \text{ F.m}^{-1}$ et une surface d'électrode de $2,5 \text{ cm}^2$, l'épaisseur de la couche d'oxydes se situe entre $7,3 \cdot 10^{-11}$ et $2,6 \cdot 10^{-10} \text{ m}$. Ces valeurs sont beaucoup plus faibles que les valeurs habituellement présentés dans la bibliographie, proches du nm. Les valeurs d'épaisseur de couche sont probablement faussées du fait des valeurs de capacité. En effet, les valeurs du facteur α sont faibles et comme dit précédemment, entraînent une grande variation des valeurs de capacité pour une faible évolution de fréquence. Des mesures à deux fréquences proches donneront des valeurs de capacité assez différentes, du fait des faibles valeurs du facteur α (Tableau 12).

Des valeurs faibles du facteur α ont déjà été rencontrées dans la bibliographie présentant des analyses d'impédance sur des aciers inoxydables (Sheng et al. 2007). Faire des analyses de Mott-Schottky sur les aciers inoxydables semble être délicat. Pour cela, une étude préalable d'impédance en balayage de fréquence est nécessaire, sur une large gamme de fréquences, afin de déterminer à quelle fréquence les tests de Mott-Schottky doivent être effectués.

3.3. Conclusions et perspectives

La technique de spectroscopie d'impédance a été appliquée ici à un domaine nouveau : l'étude de l'interaction des biofilms électroactifs avec une électrode en acier inoxydable polarisée. A notre connaissance aucune expérience de Mott-Schottky n'a été faite lorsqu'un biofilm électroactif se développait sur une électrode.

Les mesures d'impédance se révèlent comme un outil intéressant pour caractériser l'interface électrode/biofilm/solution. Certains auteurs rapportent des tests d'impédance pour étudier des PACMs mais uniquement pour caractériser les éléments de la résistance interne de leur pile. Cette technique n'a jamais encore été utilisée pour l'étude des transferts électroniques à l'interface biofilm/électrode qui délivrent des courants élevés. La simulation par des circuits équivalents permet de déterminer les propriétés et l'influence des différents éléments pour améliorer la compréhension du système.

Les résultats confirment que le potentiel appliqué sur l'électrode contrôle la structure et le comportement de la couche passive de l'acier. Les bactéries électroactives, capables de transférer directement les électrons à l'électrode ne semblent pas modifier la couche d'oxydes.

Certaines études de la bibliographie qui rapportent une influence du biofilm présentent des études en circuit ouvert. Ainsi c'est le biofilm qui se développe sur le matériau qui, de part son activité, modifie l'équilibre électronique du matériau et fait augmenter son potentiel libre

(paragraphe 4.6.2 du chapitre 1). C'est cette augmentation de potentiel qui modifie le comportement semi-conducteur de la couche passive (Maruthamuthu et al. 1996; L'Hostis et al. 2003). Toutefois C. Marconnet qui a étudié l'influence d'un biofilm de rivière sur trois types d'acier en circuit ouvert, rapporte qu'aucune influence n'apparaît sur l'impédance en présence du biofilm et ce quel que soit l'acier utilisé (304L, 316L ou 254 SMO).

Pour compléter cette étude il faudrait effectuer des analyses similaires à des fréquences plus faibles de l'ordre du mHz. En effet, il serait ainsi intéressant de voir quels types de phénomènes seraient détectés à des fréquences plus basses et si l'hypothèse avancée ici, selon laquelle la couche passive d'une électrode en acier polarisée n'est pas modifiée par un biofilm électroactif est vérifiée.

Les spectres d'impédance ont permis de déterminer des valeurs de capacité et de facteur α pour la couche passive qui sont assez différentes des données bibliographiques. Le système décrit comme purement capacitif (CPE seul) serait peut-être plus complexe : des phénomènes de diffusion sont peut-être englobés dans ce CPE. Pour aller plus loin dans l'analyse, des spectres d'impédance à plus basses fréquences devraient être tracés.

D'après ce qui a été vu sur les diagrammes de Nyquist, à 1000Hz le biofilm peut interférer sur les mesures de capacité, à 200Hz en revanche seule la capacité de la couche passive de l'acier est prise en compte. Les courbes de Mott-Schottky, sembleraient donner le même type de tendance. Faire des mesures de spectroscopie d'impédance de Mott-Schottky entre 1000 et 2000Hz qui est une gamme dans laquelle les mesures sont souvent effectuées dans la bibliographie, ne semble pas adéquat sur un acier inoxydable recouvert par un biofilm. En effet, à cette fréquence l'influence du biofilm peut être détectée et la valeur de la capacité de charge d'espace de la couche d'oxydes peut être mal évaluée. De plus, les faibles valeurs du facteur α , entraînent une grande variation de la capacité pour une petite variation de fréquence. Ainsi, faire des analyses de Mott-Schottky, toujours dans la même gamme de fréquences (1000Hz-2000Hz) peut ne pas décrire de façon adéquate la capacité de la couche d'oxydes, une étude préliminaire sur une grande gamme de fréquences semble nécessaire.

Il serait intéressant de vérifier l'augmentation de la capacité de la couche passive avec d'autres manipulations à potentiel imposé. Ceci permettrait de caractériser la couche passive à divers potentiels. Ici, le potentiel imposé de +0,20 V vs. Ag/AgCl est un potentiel favorisant la formation de la couche d'oxydes. On pourrait se placer à des potentiels inférieurs et étudier quelle est l'évolution de la couche d'oxydes et de la capacité du film passif.

Chapitre 3 : Transfert électronique entre *Geobacter sulfurreducens* et une électrode

Les résultats d'impédance présentés sont uniquement des tendances, aucune conclusion ne peut encore être avancée de façon définitive. En effet, cette étude se base sur une seule expérience, à une valeur de potentiel imposé sur l'électrode. De plus, le biofilm est un élément complexe. La méthode de Mott-Schottky et de spectroscopie d'impédance sont des outils précis qui, pour amener des conclusions claires et précises, nécessitent de bien contrôler l'interface électrode/solution ainsi que le milieu environnant. Dans notre cas, les mesures sont faites au cours du développement du biofilm. De plus, le milieu de culture utilisé est un milieu riche, qui évolue au cours de la croissance bactérienne.

Les résultats présentés ici détectent un phénomène lié à la présence du biofilm à hautes fréquences et plus particulièrement lorsque le courant traversant l'électrode augmente. Effectuer des analyses par spectroscopie d'impédance à des fréquences de l'ordre du mHz permettrait de détecter si le biofilm a une influence supplémentaire sur le système à basses fréquences.

4. Comparaison des matériaux de cathode pour le transfert d'électrons avec *G. sulfurreducens*

L'acier inoxydable a été comparé au graphite au cours de la réduction du fumarate en succinate par *G. sulfurreducens*. Le côté cathodique peu étudié dans la bibliographie a été étudié ici pour une meilleure compréhension des mécanismes de transferts électroniques entre l'électrode et le biofilm.

Les principaux résultats de ces expériences ont fait l'objet d'un article soumis à *Electrochimica Acta* qui est inséré dans ce paragraphe. Des expériences complémentaires sont ensuite exposées.

4.1. Acier inoxydable et graphite

ARTICLE N°3: "Microbial electrocatalysis with *Geobacter sulfurreducens* biofilm on stainless steel cathodes"

<http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2007.10.018>

L'article qui suit a été accepté pour publication dans *Electrochimica Acta*. Les expériences ont été effectuées dans un réacteur pouvant contenir 1 à 4 électrodes polarisées en même temps à -0,60 V vs. Ag/AgCl en règle générale. Ainsi les matériaux ont pu être testés dans les mêmes conditions expérimentales et biologiques. Des voltammétries cycliques sont effectuées quotidiennement tout au long de l'expérience.

Le tableau 1 de l'article n°3 détaille les conditions opératoires utilisées au cours des expériences : le numéro des réacteurs, le nombre et le matériau d'électrodes (acier inoxydable désigné par SS et graphite par GR), le potentiel et la date de polarisation, la densité de courant maximale et le jour auquel cette dernière est atteinte.

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

- des densités de courant supérieures sont obtenues sur une électrode en acier par rapport à une électrode en graphite.
- les bactéries adhérentes à la surface de l'électrode sont responsables de la catalyse de la réduction du fumarate
- quelque soit le moment où l'électrode est connectée, le courant évolue de façon similaire à celui obtenu sur une électrode polarisée dès le début.
- la réduction du fumarate apparaît sur les voltammogrammes autour de 0,001 V vs. ESH ce qui est très proche du potentiel redox du couple fumarate/succinate ($E^\circ=0,033$ V vs. ESH).

Chapitre 3 : Transfert électronique entre *Geobacter sulfurreducens* et une électrode

- le courant obtenu avec des potentiels allant de -0.60 V à -0.20 V vs. Ag/AgCl augmente (en valeur absolue) en suivant une loi exponentielle ce qui est habituellement rencontré pour une réaction de réduction électrochimique classique.

Microbial electrocatalysis with *Geobacter sulfurreducens* biofilm on stainless steel cathodes

Claire Dumas, Régine Basseguy, Alain Bergel*

Laboratoire de Génie Chimique CNRS-INPT, 5 rue Paulin Talabot, BP 1301, 31106 Toulouse, France

Received 9 July 2007; received in revised form 2 October 2007; accepted 14 October 2007

Available online 22 October 2007

Abstract

Stainless steel and graphite electrodes were individually addressed and polarized at -0.60 V vs. Ag/AgCl in reactors filled with a growth medium that contained 25 mM fumarate as the electron acceptor and no electron donor, in order to force the microbial cells to use the electrode as electron source. When the reactor was inoculated with *Geobacter sulfurreducens*, the current increased and stabilized at average values around 0.75 A m $^{-2}$ for graphite and 20.5 A m $^{-2}$ for stainless steel. Cyclic voltammetry performed at the end of the experiment indicated that the reduction started at around -0.30 V vs. Ag/AgCl on stainless steel. Removing the biofilm formed on the electrode surface made the current totally disappear, confirming that the *G. sulfurreducens* biofilm was fully responsible for the electrocatalysis of fumarate reduction. Similar current densities were recorded when the electrodes were polarized after being kept in open circuit for several days. The reasons for the bacteria presence and survival on non-connected stainless steel coupons were discussed. Chronoamperometry experiments performed at different potential values suggested that the biofilm-driven catalysis was controlled by electrochemical kinetics. The high current density obtained, quite close to the redox potential of the fumarate/succinate couple, presents stainless steel as a remarkable material to support biocathodes.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: *Geobacter sulfurreducens*; Biofilm; Biocathodes; Stainless steel; Microbial fuel cell

1. Introduction

Research on microbial fuel cells (MFCs) has concentrated mainly on two aspects: deciphering the mechanisms of electron transfer from the bacteria to the electrode [1–3] and improving cell design and electrode materials [4]. Most studies have focused on the anode compartment and papers dealing with microbial cathodes are less numerous [5]. Aerobic microbial cathodes have been devised by mimicking the natural processes identified in aerobic biocorrosion. Following this strategy, microorganisms have been utilized to oxidize soluble metal compounds, such as manganese [6] or iron ions [7], and the metal oxides or hydroxides that are formed are subsequently reduced on the cathode. In these cases, the global process is obviously microbially controlled, but the purely electrochemical step remains abiotic. Also derived from biocorrosion studies, marine biofilms have proved to be able to catalyse oxygen reduction on stainless steel cathodes: implementing the biofilm-

catalysed cathode in a hydrogen PEM fuel cell resulted in an increase of power density from 1.4 mW m $^{-2}$ with a clean stainless steel cathode to 41 mW m $^{-2}$ with the biofilm-covered cathode [8]. Several anaerobic biocathodes have been proposed, using different compounds as the final electron acceptor, such as nitrate [9–10], sulfate, carbon dioxide [11] or fumarate [9]. Gregory et al. have demonstrated that biofilms formed in pure culture of *Geobacter metallireducens* and *Geobacter sulfurreducens* are able to directly use graphite electrodes polarized at -0.50 V vs. Ag/AgCl as the electron source to achieve the reduction of nitrate to nitrite or fumarate to succinate [9].

Our previous studies devoted to the catalysis of oxygen reduction by marine biofilms have highlighted the efficiency of stainless steel to support electrochemically active biofilms [8]. Are the properties of stainless steels linked to marine biofilms only, or would stainless steels offer effective electrocatalytic properties for other kinds of biocathodes? The aim of the present study was to contribute new elements to the discussion of this issue. The two electrode materials were compared using operating conditions very close to the procedure described previously by Gregory et al. [9]. The electrochemical reactors were filled with a culture medium that contained fumarate as

* Corresponding author. Tel.: +33 5 34 61 52 48; fax: +33 5 34 61 52 53.
E-mail address: Alain.Bergel@ensiacet.fr (A. Bergel).

electron acceptor but no soluble electron donor. When inoculated with cultures of *Geobacter sulfurreducens*, the microbial species must develop on the cathode surface, the sole source of electrons. The biofilm thus catalysed the electron transfer from the cathode to fumarate, which was reduced to succinate.

2. Experimental

2.1. Media and growth conditions

G. sulfurreducens strain PCA (ATCC 51573) was purchased from DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen). The growth medium contained (per litre): 0.1 g KCl, 1.5 g NH₄Cl, 2.5 g NaHCO₃, 0.6 g NaH₂PO₄, 0.82 g acetate, 10 ml vitamin mix (ATCC MD-VS), and 10 ml trace mineral mix (ATCC MD-TMS). The medium was autoclaved and completed with a filtered (0.2 μm) solution of sodium fumarate for a final concentration of 8 g L⁻¹. Incubations were done at 30 °C during 5 days in the growth medium. The number of planktonic cells was evaluated through the absorbance at 620 nm. Absorbance was transformed into cell forming units per millilitre (CFU mL⁻¹) using the calibration formula:

$$[\text{CFU mL}^{-1}] = \text{OD}_{620\text{nm}} \times 472\,067$$

established with measurements in Petri dishes under a N₂/CO₂ atmosphere.

The reactor medium was the same as the growth medium except that it lacked sodium acetate and contained sodium fumarate at a final concentration of 4 g L⁻¹ (25 mM). The reactor was filled with the reactor medium and flushed with N₂-CO₂ (80–20%) for at least 1 h. Bubbling was maintained at a lower flow rate during the experiments. Cells (5%, v/v) were then injected into the electrochemical reactor when the optical density at 620 nm in the growth medium was around 0.3 (i.e. around 142,000 CFU mL⁻¹).

2.2. Electrodes and electrochemical reactor

The electrochemical reactor contained 2 L reactor medium with 0.5 L headspace. Each electrode was drilled, tapped and had a titanium wire screwed onto it. The electrodes were 1 cm × 2.5 cm × 0.1 cm plates of stainless steel (SS) UNS S31254¹ (Outokumpu) or 5 cm × 2.5 cm × 0.5 cm plates of graphite (Goodfellow). Before the experiments, the stainless steel coupons were cleaned with 50–50% ethanol/acetone to dissolve organic adsorbed species, and then with a 2–20% fluoric/nitric acid solution to remove the oxide layer. The graphite electrodes were cleaned with 1 N HCl and then 1 N NaOH to remove possible biomass contamination.

One to four working electrodes (graphite or SS) were set up in each reactor and connected to the same auxiliary (platinum grid, 0.5 mm wires) and silver/silver chloride reference electrodes (Ag/AgCl) through a multi-potentiostat (model VMP1

or VMP2, software EC-Lab v.8.3, Bio-Logic, SA). Each working electrode was individually monitored by a N-STAT device (Bio-Logic, SA). The potential of the reference electrode in the reactor medium was around $E_{(\text{Ag}/\text{AgCl})} = 0.31$ V vs. SHE (standard hydrogen electrode).

2.3. Microscopy methods

At the end of the experiment, the electrodes were stained with a solution of 0.03% orange acridine (A6014, Sigma) for 10 min, then rinsed with distilled water and air dried. Pictures were taken using a Carl Zeiss Axiotech 100 microscope equipped for epifluorescence with an HBO 50/ac mercury light source and Zeiss 09 filter (excitor AP 450–490, reflector FT 510, barrier filter LP 520) and a monochrome digital camera (Evolution VF). Images were processed with the Image-Pro Plus v.5 software.

The average surface roughness (Ra) of the cleaned electrodes was characterized using a white light interferometer Zygo New View 100 OMP-0348K.

3. Results

3.1. Comparison between graphite and stainless steel electrodes (reactors 1 & 2)

Two stainless steel (SS) and two graphite (GR) electrodes were put in a single electrochemical reactor (reactor 1). The reactor medium was the same as the growth medium, except that it did not contain any electron donor in order to oblige the cells to use the electrodes as the sole possible electron donor. The electron acceptor was fumarate 25 mM. SS1.1 and GR1.1 electrodes were polarized at -0.60 V vs. Ag/AgCl from the beginning of the experiment, while SS1.2 and GR1.2 were initially kept in open circuit and only polarized from day 2.6 (Table 1). No current was detected before bacteria injection, showing that no electrochemical reduction of fumarate occurred in the absence of cells (Fig. 1A). As soon as bacteria were injected, at day 0.6, current densities of 0.006 and 1.35 A m⁻² were measured on the graphite and stainless steel electrodes, respectively. Current increased rapidly on day 4.8 to maximal values in the range of 0.28 ± 0.05 A m⁻² for GR1.1 and 14.8 ± 2.5 A m⁻² for SS1.1, and then stabilized. Electrodes GR1.2 and SS1.2, for which polarization only started 2 days after the injection, immediately gave a current equivalent to that of the electrodes connected from the beginning, with a low current density until day 4.8 and then a fast increase. Fig. 1B presents the cyclic voltammograms recorded at the end of the experiment with the stainless steel electrode SS1.1, which sustained 17.3 A m⁻². The reduction process started around -0.30 V vs. Ag/AgCl and gave a current of 5.7 mA (i.e. 22.8 A m⁻²) at -0.60 V vs. Ag/AgCl. These values were consistent with the values obtained under chronoamperometry. A low oxidation reaction also appeared above -0.30 V vs. Ag/AgCl. The biofilm formed on the electrode surface was then removed by rubbing with wet paper, and the cleaned electrode was put back into the reactor. Cyclic voltammetry was performed again after the reactor had been deoxygenated by N₂/CO₂ bubbling. No redox reaction was observed with the

¹ Composition Cr: 19.9%, Ni: 17.8%, Mo: 6.0%, N: 0.2%, C: 0.01%, Fe: complement.

Table 1
Operating parameters and main results of experiments performed with *G.sulfurreducens* on graphite and stainless steel electrodes in five different reactors NP: Non-polarized

Reactor	Name	Imposed potential (V vs. Ag/AgCl)	Day of polarization	Maximum current density (A m^{-2}) Abs. value	Day of maximum current density	
1	SS1.1	-0.60	0	17.3	6.6	
	SS1.2		2.6	12.3		
	GR1.1		0	0.33		
	GR1.2		2.6	0.23		
2	SS2.1	-0.60	0	16.8	13.3	
	SS2.2		4.0	24.2		
	GR2.1		0	0.66		
	GR2.2		4.0	0.83		
3	SS3.1	-0.60	0	14.1	11.2	
	SS3.2		7.7	15.2		
	SS3.3		11.5	18.2		
	SS3.4		-0.50	15.1		10.1
			-0.40	16.2		5.2
	-0.20	20.0	0			
	0.00	20.1	0			
4	SS4	NP	–	–	–	
5	SS5	-0.60	1.7	11.8 ± 2.5	14.2	

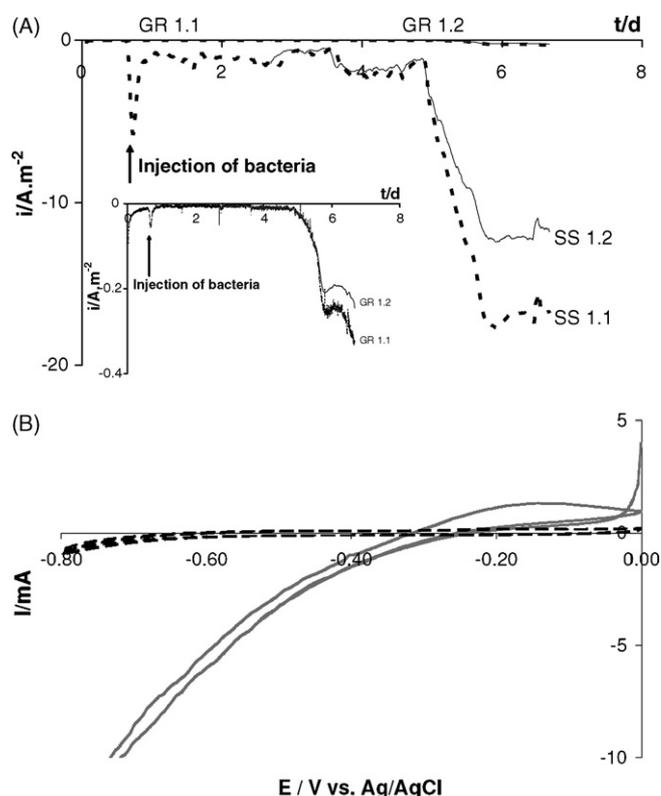


Fig. 1. Graphite (12.5 cm^2) and stainless steel (2.5 cm^2) electrodes exposed to a culture of *G.sulfurreducens* containing fumarate as electron acceptor (25 mM) in reactor 1. (A) Variation of current density with time on electrodes polarized at $-0.60 \text{ V vs. Ag/AgCl}$: SS1.1 & GR1.1 from the beginning, SS1.2 & GR1.2 connected from day 2.6. The insert represents a zoom on the current density variation on graphite electrodes. (B) Cyclic voltammograms at 2 mV s^{-1} on stainless steel electrode SS1.1, with a biofilm sustaining 17.3 A m^{-2} (.....) and after biofilm removal (---).

cleaned electrode, confirming that neither the cells present in solution nor the metabolites produced were involved in the reduction process. The biofilm was required for the catalysis of fumarate reduction to occur.

The same variation of the current density with time was confirmed by repeating the chronoamperometry experiment in reactor 2 (Fig. 2A and Table 1). In reactors 1 and 2, whatever the reactor, the maximal current densities on day 7 were very close and in the range of $15.2 \pm 2.9 \text{ A m}^{-2}$ for SS electrodes and $0.32 \pm 0.08 \text{ A m}^{-2}$ for graphite, showing good reproducibility of the results. Fig. 2B presents the cyclic voltammograms recorded at day 13.3 on SS2.1 and GR2.1, which sustained 24.2 , and 0.83 A m^{-2} , respectively. The reduction process started around $-0.30 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ for stainless steel and $-0.40 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ for graphite. Fig. 3 shows the epifluorescence microscopy pictures that were taken on stainless steel electrodes at the end of this last experiment. The two pictures were representative of the two kinds of morphology observed on the numerous zones examined. Single cells were distinguishable, but bacteria were preponderantly gathered in small (Fig. 3A) or quite large (Fig. 3B) clusters.

To study the influence of the potential, four stainless steel electrodes were placed in reactor 3. Three were polarized at $-0.60 \text{ V vs. Ag/AgCl}$: the first electrode from the beginning, the second from day 7.7 and the third from day 11.5. For these three electrodes, the current density stabilized at very similar values in the range of $16.1 \pm 2.0 \text{ A m}^{-2}$ (Table 1). The fourth electrode was kept in open circuit until day 15.1, after which it was consecutively polarized at -0.50 , -0.40 , -0.20 and $0.00 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ (Table 1 and Fig. 4). The current densities stabilized at 10.1 and 5.2 A m^{-2} for -0.50 and $-0.40 \text{ V vs. Ag/AgCl}$, respectively. At -0.20 and $0.00 \text{ V vs. Ag/AgCl}$, only residual current was detected (less than 0.003 A m^{-2}). These results were consistent with the cyclic voltammeteries (Figs. 1 and 2), which

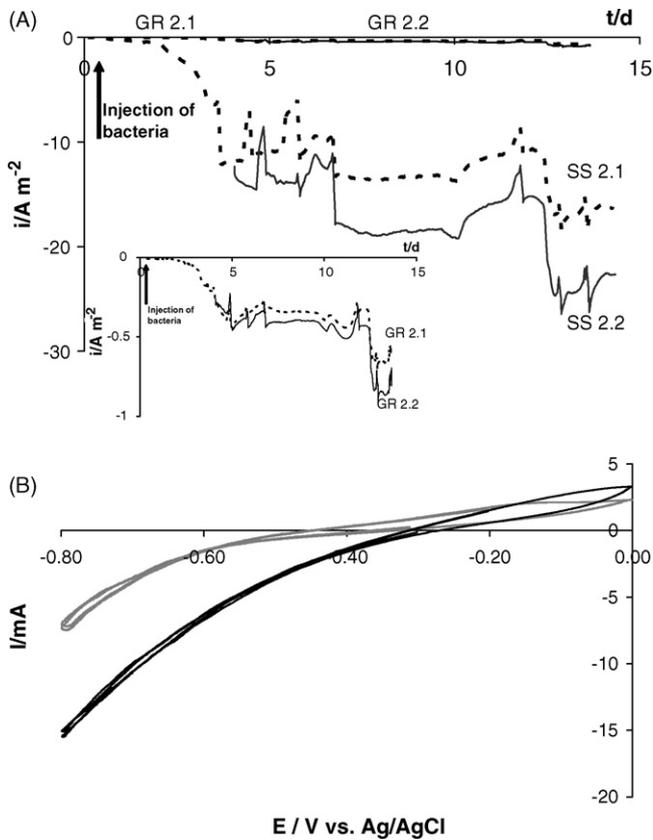


Fig. 2. Graphite (12.5 cm²) and stainless steel (2.5 cm²) electrodes exposed to a culture of *G.sulfurreducens* containing fumarate as electron acceptor (25 mM) in reactor 2. (A) Variation of current density with time on electrodes polarized at -0.60 V vs. Ag/AgCl: SS2.1 & GR2.1 from the beginning, SS2.2 & GR2.2 connected from day 4. The insert represents a zoom on the current density variation on graphite electrodes. (B) Cyclic voltammograms at 2 mV s^{-1} on day 13.3 on stainless steel electrode SS2.1 (—) with a biofilm sustaining 24.2 A m^{-2} and on graphite electrode GR1.2 with a biofilm sustaining 0.83 A m^{-2} (---).

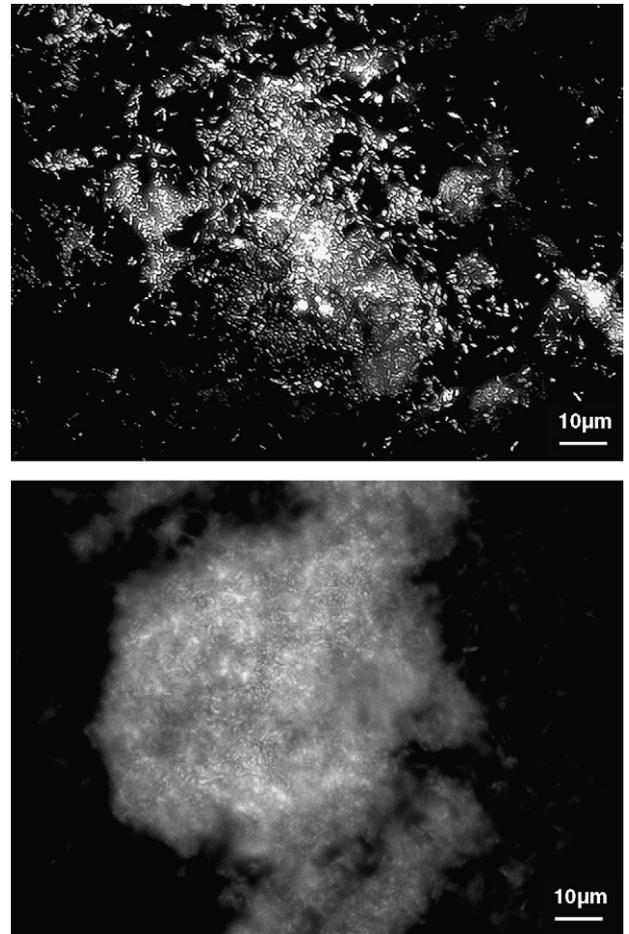


Fig. 3. Epifluorescence microscopy pictures of *G.sulfurreducens* biofilm on stainless steel electrode polarized at -0.60 V vs. Ag/AgCl from reactor 2 (magnification $500\times$), A: SS2.1; B: SS2.2.

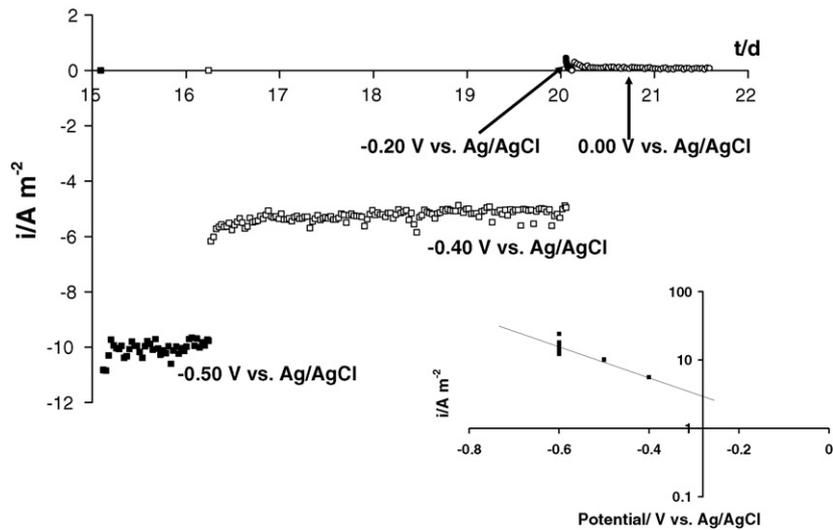


Fig. 4. Variation of the current density on electrode SS3.4 from reactor 3, previously kept in open circuit for 15 days and then consecutively polarized at $\blacksquare -0.50$ V $\square -0.40$ V $\bullet -0.20$ V $\circ 0.00$ V vs. Ag/AgCl. Inset: current density obtained during the different electrolyses performed with stainless steel electrodes (values in Table 1) in logarithmic scale, as a function of potential.

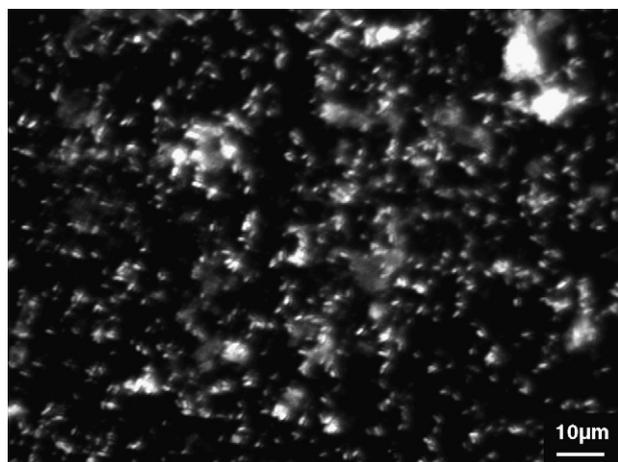


Fig. 5. Epifluorescence microscopy picture of *G.sulfurreducens* biofilm on a non-polarized stainless steel electrode SS4, placed in reactor 4 (magnification 500 \times).

showed the reduction of fumarate starting on a biofilm-covered stainless steel electrode below -0.30 V vs. Ag/AgCl.

Two other experiments were conducted in parallel, in two different reactors (4 and 5), at the same time and with the same *G.sulfurreducens* culture as the inoculum. Each reactor was equipped with only one stainless steel electrode, which was kept in open circuit in reactor 4 and polarized at -0.60 V vs. Ag/AgCl in reactor 5. Comparing the optical density variation at 620 nm on the solution samples taken from both reactors revealed a basal growth rate that, at day 13, led to around 19 800 CFU mL $^{-1}$ in reactor 4 and 32,500 CFU mL $^{-1}$ in reactor 5. As the electrode in reactor 4 was not polarized, the basal growth could only be due to the presence of acetate remaining from the inoculum that was an electron donor for the planktonic cells. The additional growth in reactor 5 may have been due to bacteria that grew on the surface of the polarized electrode (Fig. 3) and were then detached.

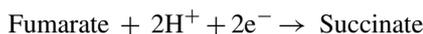
The biofilm observed on the non-connected coupons (Fig. 5) presented clusters that were rather smaller than on the polarized electrode (Fig. 3).

4. Discussion

The current densities reported here with graphite electrodes (maximum values of 0.75 ± 0.08 A m $^{-2}$ in reactor 2) were of the same order of magnitude as, though slightly higher than, the ones reported previously under similar operating conditions [9]. This previous study, which was to our knowledge the first demonstration of the capability of *G.sulfurreducens* to use solid electrodes as electron donors, reported current densities of 0.4 A m $^{-2}$ after successive additions of fumarate (total concentration 40 mM), but at -0.50 V vs. Ag/AgCl instead of the -0.60 V vs. Ag/AgCl used here. The influence of the potential value was clearly demonstrated here by cyclic voltammetry (reactors 1 and 2) and mainly by the successive electrolyses achieved at different potentials (reactor 3).

In the present experiment, the current was stable for more than 2 days at high current densities whereas, in the previous

study, it decreased after around 1 day. The ratio between the total electrode surface areas (where the substrate was consumed) and the medium volume (containing the substrate) was around 15 cm 2 L $^{-1}$ here for reactors 1 and 2, whereas it was more than 77 cm 2 L $^{-1}$ in the previous study. This difference in the surface/volume ratios can explain the longer stability of the current in the experiments reported here, due to a slower consumption of the substrate. Assuming, as previously demonstrated [9], the transformation of fumarate to succinate with 2 electrons exchanged:



the current was integrated from the beginning to the end of experiments 1 and 2. The charges transferred corresponded to 15% and 65% of the initial amount of fumarate in reactors 1 and 2, respectively.

The stainless steel electrodes gave current densities 25 times higher than graphite on the average. Measurements of the surface roughness gave average roughness (Ra) of 5.6 μm for graphite and 0.29 μm for stainless steel. It is generally agreed that higher values of surface roughness favour bacterial settlement, mainly when the roughness values are of the same order of magnitude than the size of microbial cells. Here the roughness should favour biofilm formation on graphite rather than stainless steel. The higher current density obtained on stainless steel can therefore not be explained by difference in the surface area available for biofilm formation. Moreover, as both electrode types (GR and SS) were set up in the same reactor, this difference can only be attributed to the intrinsic properties of the material. It should be concluded that stainless steel has better electrokinetic properties than graphite to support biofilm-driven reduction reactions.

The reduction of fumarate, which started on stainless steel around -0.30 V vs. Ag/AgCl (0.01 V vs. SHE), is quite close to the redox potential of the fumarate/succinate couple in the same conditions, i.e. -0.28 V vs. Ag/AgCl in the culture medium ($E_0 = 0.033$ V vs. SHE at pH 7.0). This phenomenon was observed on graphite at lower potentials around -0.40 V vs. Ag/AgCl (-0.09 V vs. SHE), confirming the efficiency of the stainless steel/*G.sulfurreducens* system. In the inset of Fig. 4, the current density values obtained with stainless steel at the stable plateau of the electrolyses were plotted as a function of the applied potential in logarithmic scale. A Tafel's approach may be suggested. Placing the X-axis at the redox potential of the fumarate/succinate couple (-0.28 V vs. Ag/AgCl) resulted in an exchange current density around 2.6 A m $^{-2}$. The slope of the curve gave a charge transfer coefficient α around 0.03 (with $n = 2$). This low value of α can be attributed to the presence of the space charge layer due to the metal oxides that constitute the surface of stainless steels. It may be suggested that, in this case, the current supplied by the microbial electro-catalysis looks like it follows a traditional exponential kinetics. The microbial process would thus be fully controlled by the electrochemical conditions.

The low current that was observed during the first few days after inoculation may be attributed to the initial amount of cells that adsorbed on the electrode surface. The subsequent exponential increase was certainly caused by the development of the catalytic biofilm of *G.sulfurreducens* on the electrode surface,

as shown by the microscope pictures. Electrodes polarized late gave current as soon as they were connected. As the reactor medium did not contain any electron donors, it is surprising that bacteria managed to survive without being in contact with a polarized electrode. Three hypotheses can be advanced. First, a basal growth occurred thanks to the acetate (electron donor in the growth medium) that remained in the inoculum volume, as demonstrated in reactor 4. Secondly, the succinate resulting from the fumarate reduction on the polarized electrodes may have been used as an electron donor by the bacteria in suspension and the ones adhering to non-connected coupons. A basic current due to the oxidation of succinate has already been brought to light for a medium poor in acetate [12]. Thirdly, cells may have been released from the biofilm formed on the polarized electrodes into the solution and then have colonized the surface of the non-connected electrodes. These two last phenomena should explain the higher concentration of free cells observed in reactor 5, which contained a polarized electrode, than in reactor 4, which only contained a non-connected coupon. Nevertheless, it must be recalled that, as already demonstrated for graphite electrodes [9], the biofilm was responsible for whole current produced by the catalysis of fumarate reduction, as removing the biofilm from the electrode surface and putting the cleaned electrode back into the reactor made the current disappear completely.

Extracellular electron transfer like what occurred at the interface bacteria/electrode has been widely studied in microorganisms that transfer electron to insoluble Fe(III) or Mn(IV) [13–15]. Outer membrane cytochrome (Omc) within the *c*-type family (particularly the *c*-type cytochrome OmcS) or outer membrane protein (Omp) were proven to be involved in the reduction of metals [16–17]. To our knowledge, no investigation has been carried out on the midpoint redox potential of OmcS. However, information was available on the midpoint potential of a periplasmic and extracellular cytochrome *c* involved in Fe(III) reduction, which was found to be around -0.167 V vs. SHE [18]. The studies on cytochromes of microorganisms grown on electrode as electron donor, like it is the case in our study, are rarer. The mechanisms of such bacterial driven transfer from a cathode have not been yet elucidated. The positive potential value ($+0.01$ V vs. SHE), observed on stainless steel in this study, is far from the low redox potentials of cytochrome *c* previously reported which suggested that cytochromes involved here may be different. Indeed, the genome of *G.sulfurreducens* contains 111 genes for *c*-type cytochromes, substantially more than what was found in other organisms whose sequence is available, including the intensively studied Fe(III) reducer *Shewanella oneidensis* [16].

This study confirmed that stainless steel has excellent electrokinetic properties to support biofilm-driven reductions. Such a capacity has already been observed with marine natural biofilms that catalysed efficiently oxygen reduction from potential values around $+0.3$ V/SCE [8]. Obviously, the fumarate/succinate couple has a too high redox potential value to be used for the cathode reaction of fuel cells. It was chosen here only has a model reaction with the objective to compare the electrochemical properties of different electrode materials. As this microbial system has been demonstrated to be fully mastered

in a previous study [9], and it revealed here high differences with respect to the electrode material, it may become a kind of standard model. Moreover, the values of potential checked here may have direct application in bioremediation processes. *G.sulfurreducens* biofilm have demonstrated to catalyse efficiently the reduction of the soluble uranium (VI) to uranium (IV) that precipitated, at potential values of -0.50 V vs. Ag/AgCl [19]. It may be suspected that the current around 0.4 A m⁻² that have been reached on graphite may be significantly increased on stainless steel. Similarly, *G.metalliruducens*, which is close to *G.sulfurreducens*, has been demonstrated to be effective in the electrocatalysis of nitrate to nitrite [9]. It might be hoped that using stainless steel cathode may improve the process effectiveness.

5. Conclusions

A large number of recent studies have made remarkably fast advances concerning the anodes of microbial fuel cells but only a few papers have dealt with biocathodes. Designing new materials or devising new microbial systems for cathodes remains an open challenge in the field of fuel cells or other biofilm-driven processes such as electrochemically assisted bioremediation. Stainless steel was tested here following a procedure already described in the literature, based on the catalysis of fumarate reduction by biofilms formed in pure culture of *G.sulfurreducens*. The current densities obtained were 25 times higher on average than those provided by graphite in the same conditions. Maximal current densities higher than 20 A m⁻² were reached, and the reduction started at potential values quite close to the redox thermodynamic potential. Stainless steel is an industrial material with good mechanical properties, available in a wide variety of forms (grids, meshes, expanded material. . .), which can be easily packed to increase the active surface area, and would allow easy scaling up to large-scale pilots. Moreover, the potential values used in cathode processes protect the stainless steel against corrosion, so that quite cheap types of stainless steels can be used as electrode. Stainless steels should now be considered as very promising materials to support biofilm-catalysed cathodes.

Acknowledgements

This work was financially supported by the Sixth Framework Program of the European Union as part of the project “Electrochemically Active Biofilms” NEST-508866. The authors are very grateful for V. Baylac’s help (CIRIMAT -Toulouse) for roughness measurements and thank Benjamin Erable, postdoctoral researcher in Laboratoire de Génie Chimique (Toulouse, France), for its kind contribution.

References

- [1] D.R. Lovley, *Nat. Rev. Microbiol.* 4 (2006) 499.
- [2] G. Reguera, K.P. Nevin, J.S. Nicoll, S.F. Covalla, T.L. Woodard, D.R. Lovley, *Appl. Environ. Microbiol.* 72 (2006) 7345.

- [3] Y.A. Gorby, S. Yanina, J.S. Mclean, K.M. Rosso, D. Moyles, A. Dohnalkova, T.J. Beveridge, I.S. Chang, B.H. Kim, K.S. Kim, D.E. Culley, S.B. Reed, M.F. Romine, D.A. Saffarini, E.A. Hill, L. Shi, D.A. Elias, D.W. Kennedy, G. Pinchuk, K. Watanabe, S.I. Ishii, B. Logan, K.H. Nealon, J.K. Fredrickson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103 (2006) 11358.
- [4] B.E. Logan, B. Hamelers, R. Rozendal, U. Schroder, J. Keller, S. Freguia, P. Aelterman, W. Verstraete, K. Rabaey, *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 5181.
- [5] Z. He, L.T. Angenent, *Electroanalysis* 18 (2006) 2009.
- [6] A. Rhoads, H. Beyenal, Z. Lewandowski, *Environ. Sci. Technol.* 39 (2005) 4666.
- [7] A. Lopez-Lopez, E. Exposito, J. Anton, F. Rodriguez-Valera, A. Aldaz, *Biotechnol. Bioeng.* 63 (1999) 79.
- [8] A. Bergel, D. Feron, A. Mollica, *Electrochem. Commun.* 7 (2005) 900.
- [9] K.B. Gregory, D.R. Bond, D.R. Lovley, *Environ. Microbiol.* 6 (2004) 596.
- [10] H.I. Park, D.K. Kim, Y.-J. Choi, D. Pak, *Process Biochem.* 40 (2005) 3383.
- [11] D.H. Park, J.G. Zeikus, *J. Bacteriol.* 181 (1999) 2403.
- [12] D.R. Bond, D.R. Lovley, *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (2003) 1548.
- [13] D.R. Lovley, J.D. Coates, E.L. Blunt-Harris, E.J.P. Phillips, T.L. Woodard, *Nature* 382 (1996) 445 (Letters).
- [14] D.R. Lovley, J.F. Stolz, G.L. Nord, E.J.P. Phillips, *Nature* 330 (1987) 252.
- [15] C.R. Myers, K.H. Nealon, *Science* 240 (1988) 1319.
- [16] B.A. Methé, K.E. Nelson, J.A. Eisen, I.T. Paulsen, W. Nelson, J.F. Heidelberg, D. Wu, M. Wu, N. Ward, M.J. Beanan, R.J. Dodson, R. Madupu, L.M. Brinkac, S.C. Daugherty, R.T. Deboy, A.S. Durkin, M. Gwinn, J.F. Kolonay, S.A. Sullivan, D.H. Haft, J. Selengut, T.M. Davidsen, N. Zafar, O. White, B. Tran, C. Romero, H.A. Forberger, J. Weidman, H. Khouri, T.V. Feldblyum, T.R. Utterback, S.E. Van Aken, D.R. Lovley, C.M. Fraser, *Science* 302 (2003) 1967.
- [17] E. Afkar, G. Reguera, M. Schiffer, D.R. Lovley, *BMC Microbiol.* (2005) 5.
- [18] S. Seeliger, R. Cord-Ruwisch, B. Schink, *J. Bacteriol.* 180 (1998) 3686.
- [19] K.B. Gregory, D.R. Lovley, *Environ. Sci. Technol.* 39 (2005) 8943.

Commentaires sur l'article n°3

Avant l'injection des bactéries, aucun courant n'est détecté, prouvant ainsi que la réduction électrochimique du fumarate ne peut se produire en l'absence des cellules (article n°3, figure 1-A). Plus de deux jours après l'injection des bactéries, le courant augmente rapidement puis se stabilise. Les expériences rapportent des densités de courant supérieures sur une cathode en acier inoxydable que sur une en graphite. Dans le réacteur 2, des valeurs en moyenne de $10,5 \pm 3,7 \text{ A/m}^2$ ont été obtenues avec l'acier contre $0,75 \pm 0,01 \text{ A/m}^2$ avec le graphite. Les électrodes ayant été insérées dans le même réacteur, cette différence peut uniquement être attribuée aux propriétés intrinsèques du matériau. Comme précisé dans l'article n°1, selon certains auteurs la rugosité d'un support améliore l'adhésion bactérienne, car elle induit une augmentation de la surface active. Dans le cas de bactéries électroactives, l'augmentation de la rugosité devrait permettre d'obtenir des courants plus élevés. La rugosité moyenne caractérisée à l'aide de R_a (*Roughness average* : rugosité moyenne) se situe autour de $5,6 \mu\text{m}$ et $0,3 \mu\text{m}$ pour les électrodes de graphite et d'acier inoxydable employées dans ces expériences (article n°1 et n°2). Malgré un rapport de rugosité défavorable à l'acier, le courant obtenu est important comparativement à celui obtenu avec le graphite. En conséquence, les densités de courant élevées, obtenues ici sur acier inoxydable, sont probablement dues aux propriétés de l'acier en tant que cathode vis-à-vis des cinétiques de transfert d'électrons.

D'autre part, enlever le biofilm de la surface de l'électrode fait chuter le courant (article n°3, Figure 1-B). Comme démontré précédemment pour les électrodes de graphite (Gregory et al. 2004), ce sont les bactéries adhérentes à l'électrode qui sont responsables de la catalyse de la réduction du fumarate.

Afin d'étudier l'influence de la polarisation, les électrodes constituées du même matériau ont été connectées à différents moments de l'expérience. En effet, trois des électrodes du réacteur 3, ont été polarisées à $-0,60 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ au début, après 7,7 ou 11,7 jours passés en circuit ouvert. Les résultats montrent que, quelque soit le moment où l'électrode est connectée, le courant évolue de façon similaire à celui obtenu sur l'électrode polarisée dès le début (Tableau 1, article n°3). Comme le milieu est appauvri en donneur d'électrons (acétate), il paraît surprenant que les bactéries parviennent à se développer sur une électrode non polarisée. Deux hypothèses ont été avancées. Tout d'abord, il se peut que quelques millimoles de donneur d'électrons soient présentes dans le milieu réactionnel et permettent le développement des bactéries. Cette quantité de donneur d'électrons peut provenir soit de l'acétate non consommé, resté dans le volume d'inoculum injecté en début d'expérience, soit du succinate produit par les bactéries dans le réacteur (produit de la réduction du fumarate). Bond et al. ont déjà mis en évidence un courant

de base dû à l'oxydation du succinate quand le milieu était pauvre en acétate (Bond et al. 2003). La deuxième hypothèse suppose que quelques cellules se détachent du biofilm formé sur les électrodes polarisées et colonisent la surface des électrodes non connectées. Les deux hypothèses expliquent d'ailleurs pourquoi une concentration plus élevée de bactéries planctoniques a été observée dans le réacteur n°5, contenant une électrode polarisée, que dans le réacteur n°4 où l'électrode n'était pas connectée (Figure 58). En effet, dans le réacteur 5 où l'électrode est polarisée, du succinate peut être produit grâce à la réduction du fumarate sur l'électrode, ce succinate peut servir par la suite de donneur d'électrons et permettre le développement des bactéries planctoniques. Il peut aussi y avoir un détachement de certaines bactéries adhérentes à l'électrode.

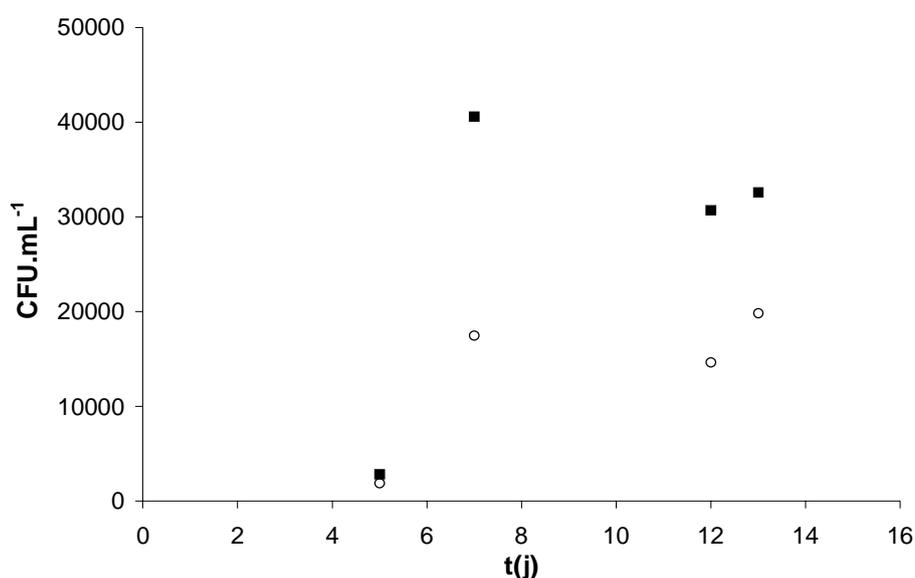


Figure 58 : Comparaison de l'évolution de la densité optique à 620nm au cours du temps, dans le réacteur 4 contenant une électrode non connectée (O) et dans le réacteur 5 où l'électrode est polarisée à -0,60 V vs. Ag/AgCl (■).

La réduction du fumarate qui débute à -0,30 V vs. Ag/AgCl i.e. 0,001 V vs. ESH sur l'acier inoxydable est relativement proche du potentiel redox du couple fumarate/succinate $E^{\circ} = 0,033$ V vs. ESH (à pH=7). Sur le graphite, ce phénomène n'est observé que pour un potentiel plus cathodique, autour de -0,40 V vs. Ag/AgCl i.e. -0,09 V vs. ESH, montrant ainsi l'efficacité du système acier inoxydable/*G. sulfurreducens*.

Les études réalisées sur les cytochromes de bactéries se développant sur une anode et qui rentrent en jeu au cours du transfert électronique extracellulaire ont été décrites dans le paragraphe 2.1. Les études sur les cytochromes de micro-organismes qui se sont développés sur une électrode jouant le rôle de donneur d'électrons, comme c'est le cas dans l'étude présentée ici, sont plus rares. De tels mécanismes de transfert électronique de la cathode à la bactérie n'ont pas encore

été élucidés à ce jour. Le potentiel positif (+0,01 V vs. ESH), observé dans notre cas sur l'acier inoxydable est assez éloigné du potentiel redox du cytochrome *c* trouvé dans la bibliographie ce qui suppose que les cytochromes mis en jeu ne sont pas semblables. Or, le génome de *G. sulfurreducens* contient 111 gènes codant pour les cytochromes *c*. Ce nombre est le plus élevé parmi les micro-organismes dont la séquence est connue. Même chez *Shewanella oneidensis* qui est une bactérie ferriréductrice très étudiée, le nombre de cytochromes découverts est plus faible (Méthé et al. 2003). Ainsi, un cytochrome parmi ces 111 pourrait peut-être correspondre aux potentiels observés ici de -0,30 et -0,40 V vs. Ag/AgCl

Résultats complémentaires n'apparaissant pas dans l'article

Afin d'approfondir quels sont les mécanismes de transfert d'électrons à l'électrode en présence de biofilm, des expériences supplémentaires ont été effectuées. Des prélèvements de milieu ont été réalisés tout au long de l'expérience et analysés par HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) pour déterminer les concentrations en acides organiques. Comme dans les manipulations précédentes, les électrodes étaient polarisées à un potentiel de -0,60 V vs. Ag/AgCl, à différents moments de l'expérience : dès le début, après 5,9 jours et 10,2 jours. Le courant augmente à partir de 6,5 jours et se stabilise autour de $23,4 \pm 2 \text{ A/m}^2$ à partir du jour 10 (Figure 59). Lorsque le milieu est remplacé par un nouveau milieu (jour 13), identique au précédent mais ne contenant aucune bactérie en suspension et une concentration en fumarate de 25 mM, le courant n'est pas affecté. Ce phénomène est identique à celui présenté en oxydation (paragraphe 2.1). Ce sont bien les bactéries adhérentes à la surface de l'électrode qui transfèrent tous les électrons à l'électrode. Ce résultat a aussi été confirmé par les voltammogrammes tracés en présence ou non de biofilm. La réduction du fumarate n'apparaît qu'en présence de bactéries adhérentes (article n°3, Figure 1-B).

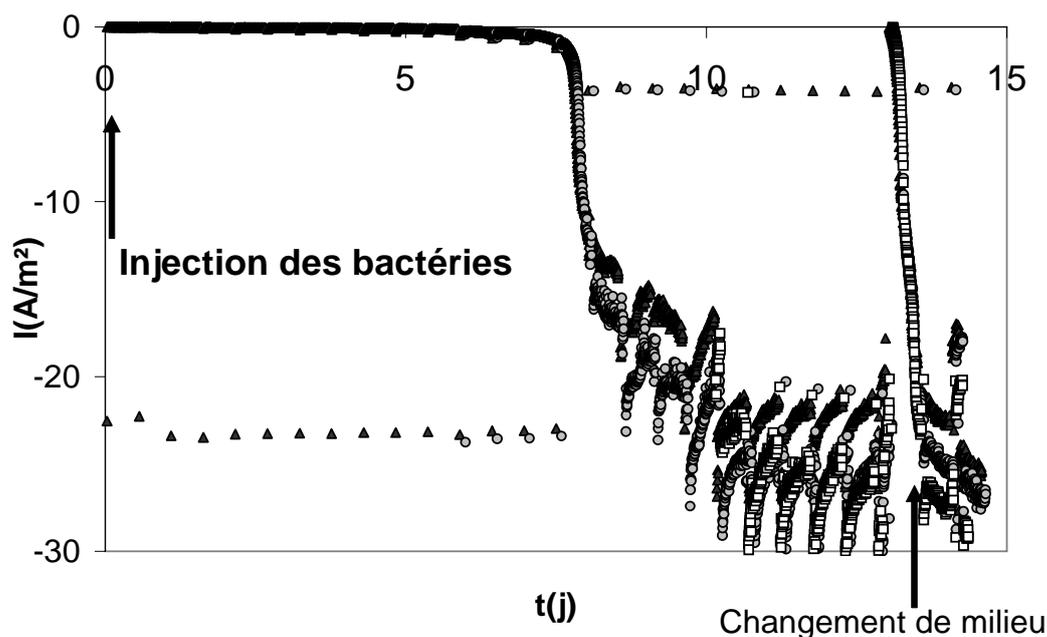
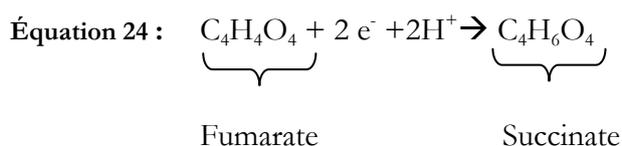


Figure 59 : Évolution de la densité de courant en A/m² sur des électrodes d'acier inoxydable polarisées à -0,60 V vs. Ag/AgCl à ▲ t=0, ● t=5,9 et □ t=10,2 jours.

Au cours de l'expérience, des mesures des concentrations d'acides organiques du milieu par HPLC ont été effectuées au cours des 10 premiers jours. La quantité d'électrons cédés par la cathode aux bactéries, calculée par intégration du courant a ainsi pu être comparée à la concentration en fumarate consommé et à celle en succinate produit.

La réaction de réduction du fumarate en succinate nécessite deux électrons par mole de fumarate :



Sur la Figure 60, il apparaît que la quantité d'électrons transférés par la cathode augmente dès le 2^{ème} jour pour atteindre au 10^{ème} jour près de 37,8 mmol. La concentration en fumarate, qui était au départ de 25 mM soit 50 mmol diminue dès le 2^{ème} jour et atteint 25 mmol au 10^{ème} jour, soit 25 mmol de fumarate consommé. La concentration de succinate produit s'élève à 22,8 mmol au 10^{ème} jour. Le rapport entre la quantité d'électrons cédés par l'électrode et la concentration en succinate produit s'élève à 1,65, celui entre le nombre d'électrons transférés depuis l'électrode et le fumarate consommé est égal à 1,51. Des expériences similaires ont été menées par Gregory et al. (Gregory et al. 2004). Leurs résultats présentent un rapport proche de 1, que les auteurs expliquent par une oxydation partielle du fumarate dans le cycle tricarboxylique.

Ces résultats correspondent à un rendement faradique de 75,5 à 82,5%. Ces rendements élevés avaient aussi été observés au cours de la biocatalyse de l'oxydation de l'acétate par *G. sulfurreducens* (paragraphe 2.1) (Bond et al. 2003).

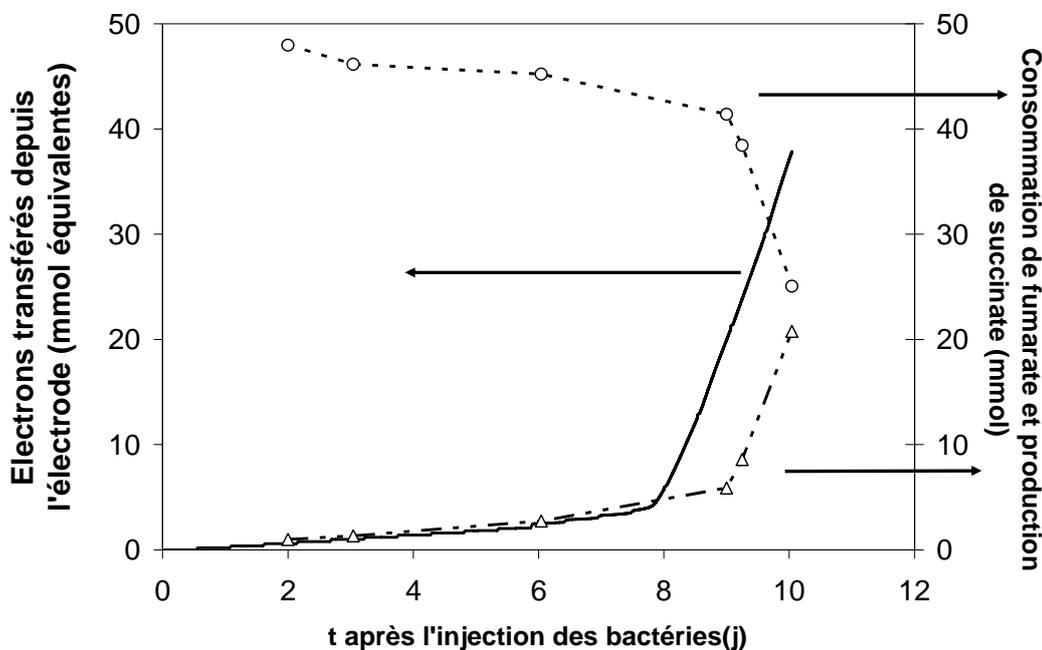


Figure 60 : Quantité d'électrons transférés de l'électrode à la bactérie (en mmol) et concentration de fumarate consommé, et succinate produit (en mmol).

4.2. Perspectives

Les valeurs de densités de courant obtenues ici sur graphite ($0,75\text{A}/\text{m}^2$) ou acier inoxydable ($10,5\text{A}/\text{m}^2$) sont plus élevées que toutes celles rencontrées dans la bibliographie ($0,31\text{A}/\text{m}^2$) (Bond et al. 2003). Les résultats obtenus paraissent alors très intéressants et importants dans le défi actuel des PACMs, qui est de proposer de nouveaux matériaux de cathode en remplacement du platine. De plus, les densités très élevées obtenues sur acier inoxydable, ainsi que les avantages industriels de ce matériau (compact, résistant, existant sous différentes formes...) en font un très bon candidat pour les biocathodes des PACMs. Ces densités de courants exceptionnelles se révèlent aussi plus importantes que celles obtenues au cours de la biocatalyse de l'oxydation de l'acétate.

5. Conclusions

Ce chapitre consacré aux études en laboratoire sur la souche *G. sulfurreducens* a permis de déterminer quels étaient les matériaux les plus appropriés pour des électrodes de PACM. Bien que le graphite reste un matériau intéressant pour une anode, les performances des DSA sont élevées et voisines de celles du graphite. Augmenter la surface active de telles électrodes à hauteur

de celle du graphite, en utilisant des grilles de DSA par exemple, permettrait sans doute d'obtenir des densités de puissance plus importantes. En outre, malgré les densités de courant plus faibles obtenues en oxydation avec l'acier inoxydable, ce dernier est un matériau industriel qui le placent parmi les matériaux les plus avantageux pour une extrapolation d'échelle, défi important dans le domaine des PACMs.

La spectroscopie d'impédance a permis d'avancer les premières hypothèses sur l'interaction entre un biofilm électroactif et les couches passives de l'acier inoxydable. Il serait intéressant de compléter cette étude à basses fréquences (quelques mHz), mais aussi à différents potentiels imposés ou encore en circuit ouvert pour confirmer ou infirmer les résultats obtenus. En effet, s'il était confirmé que la présence de biofilm interagit sur l'étude des couches passives par spectroscopie d'impédance à des fréquences supérieures à 1000Hz, il faudra en tenir compte avant de faire des analyses de Mott-Schottky à la valeur de fréquence habituelle située dans la gamme 1000-2000Hz.

Les expériences en réduction montrent de façon claire que l'acier inoxydable est un matériau plus intéressant que le graphite, que ce soit en terme de densités de courant ou de propriétés catalytiques. Des densités de courant jusqu'à 20 fois supérieures ont été obtenues avec l'acier inoxydable. De plus les études réalisées par voltammétrie cyclique dévoilent que le système acier inoxydable / biofilm de *G. sulfurreducens* est très performant vis-à-vis de la réduction du fumarate. En effet, la catalyse de la réduction du fumarate apparaît à des potentiels très proches du potentiel théorique du couple fumarate/succinate. Ce potentiel s'avère éloigné des valeurs de potentiels redox précédemment rapportées pour les cytochromes *c*. Cependant, la souche *G. sulfurreducens* possédant un grand nombre de cytochrome *c*, on peut penser qu'un de ces cytochromes serait responsable des pics observés dans notre étude de la réduction du fumarate. Les cytochromes impliqués dans cette étude sont sûrement différents de ceux qui rentrent en jeu au cours de la réduction du Fe(III).

La souche *G. sulfurreducens* permet d'atteindre de très bonnes densités de courant en demi-pile. Il serait intéressant d'essayer de mettre en place une PACM qui implique cette souche. Cependant les potentiels redox des substrats utilisés ici (fumarate et acétate) permettraient d'atteindre une tension aux bornes de la pile maximale de $0,033 - (-0,29) = 0,323$ V ce qui est une tension faible. Pour que le dispositif soit efficace, il faudrait trouver des substrats dont les potentiels redox soient plus éloignés. Par exemple la souche *Geobacter metallireducens* qui est connue comme pouvant réduire le nitrate en nitrite pourrait être utilisée du côté cathodique de la PACM. Un

couple tel que $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ possède un potentiel redox de 0,43 V vs. ESH (à pH 7). Coupler cette cathode à une anode sur laquelle la souche *G. metallireducens* oxyde l'acétate permettrait d'augmenter la tension aux bornes de la pile à 0,72V.

Nous avons vu dans ce chapitre que la rugosité permettait d'expliquer les différences de densités de courant entre le graphite, les DSA et l'acier inoxydable en oxydation. Cependant, ce paramètre ne peut élucider la question : pourquoi l'acier inoxydable permet-il d'obtenir de plus hautes densités de courant que le graphite au cours de la réduction du fumarate ? Toutes ces études en réacteurs électrochimiques ont apporté des informations sur les propriétés catalytiques des matériaux d'électrodes. Désormais, s'attacher aux propriétés intrinsèques des matériaux et à l'affinité des bactéries pour ces matériaux apparaît primordial. Est-ce qu'un biofilm se développe davantage sur DSA ou sur acier inoxydable ? Les forces d'adhésion du biofilm dépendent-elles du support de base de l'électrode, ou du potentiel auquel est formé le biofilm ?

Le chapitre 4 présente les études d'adhésion de biofilm de *G. sulfurreducens* réalisées sur des électrodes d'acier et de DSA.

Lire
la seconde partie
de la thèse