# THÈSE

**En vue de l'obtention du**

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

**Délivré par** *l'Institut National Polytechnique de Toulouse*
**Discipline ou spécialité :** *Génie des Procédés et de l'Environnement*

---

**Présentée et soutenue par** *Bibiana CERCADO QUEZADA*
**Le** *Vendredi 24 juillet 2009*

**Titre :** *TRAITEMENT DE DECHETS ISSUS DE L'INDUSTRIE AGRO-ALIMENTAIRE PAR PILE A COMBUSTIBLE MICROBIENNE*

---

**JURY**

| | |
|---|---|
| *Nicolas BERNET* | *Rapporteur* |
| *Christophe INNOCENT* | *Rapporteur* |
| *Cécile HORT* | *Examinateur* |
| *Théodore TZEDAKIS* | *Examinateur* |
| *Marie Line DELIA* | *Co-directrice de thèse* |
| *Alain BERGEL* | *Directeur de thèse* |

---

**Ecole doctorale :** *Mécanique, Energétique, Génie civil et Procédés*
**Unité de recherche :** *Laboratoire de Génie Chimique*
**Directeur(s) de Thèse :** *Alain BERGEL et Marie Line DELIA*

**Rapporteurs :**
*Nicolas BERNET*
*Christophe INNOCENT*

*A mon fils Braulio*

Cette thèse a été effectuée avec le soutien du Programme Alβan, Programme de Bourses de Haute Niveau de l'Union européenne pour l'Amérique Latine, bourse No. E06D101223MX.

Doctoral thesis supported by the Programme Alβan, the European Union Program of High Level Scholarships for Latin America, scholarship No. E106D101223MX.

# REMERCIEMENTS

Parce que personne n’arrive jamais seul…

Je tiens en premier lieu à remercier ici les personnes sans qui ce travail n’aurait pas été possible :
Tout d’abord Joël BERTRAND pour m’avoir accueillie au LGC et avoir pris le soin de déposer ma candidature la veille de Noël 2005 aux côtés de Marie Line DELIA ; merci à elle pour son encadrement quotidien, pour sa patience et pour m’avoir transmis le goût du détail, celui qui rend le travail parfait. Merci Alain BERGEL, j’ai bien apprécié sa rigueur scientifique mêlée à une si bonne humeur qu’il en a rendu le travail très agréable. Je le remercie pour m’avoir montré la version « free » de la recherche, également pour nos discussions et son soutien, parfois même d’ordre personnel. Je remercie mes encadrants pour avoir su intelligemment coordonner nos différentes façons de travailler.

Je remercie sincèrement les rapporteurs de mon travail de thèse : Nicolas Bernet et Christophe Innocent pour avoir pris de leur précieux temps pour lire et commenter ce manuscrit ; Cécile Hort et Théodore Tzedakis pour l’intérêt porté à ce travail, et avoir accepté l’invitation à mon jury de thèse. Merci à eux tous pour avoir accepté ces tâches.

Je tiens à remercier l’ensemble de collaborateurs Biosym, plus personnellement je tiens à remercier Régine Basseguy, Luc Etcheverry, Benjamin Erable et Claire Albasi pour son enthousiasme, sa sincérité, sa passion par la recherche appliquée et ses conseils avisés, pour nous discussions touchant de près ou d’un peu plus loin à ce travail.

Merci également aux post-doctorants, doctorants, stagiaires que j’ai pu côtoyer lors de mes passages dans le monde des PACMs : Claire, Sandrine, Leo, Maha, les “anciens”, merci à eux tous pour leur disponibilité et leurs conseils pendants mes premières manipulations, ensuite

Hicham, Céline et Liz, exemples d'efficacité au travail du laboratoire, finalement les « tous nouveaux » Julien, Aracelys, et Françoise, je me souviendrai de leur agréable compagnie au bureau.

Je suis extrêmement reconnaissante aussi envers d'autres personnes appartenant à d'autres axes du LGC avec qui j'ai eu la chance de travailler : Hugues Vergnes pour son intérêt dans notre recherche et pour m'avoir initiée au FLUENT ; Marie Line de Solan, pour sa disponibilité et son expertise en MEB qui ont rendu mon travail très enrichissant et instructif.

J'ai passé de nombreuses heures au LGC dans une ambiance de travail très cordial et amical. À ce titre, je remercie l'ensemble du personnel de ce laboratoire. Merci au personnel technique et administratif qui m'ont toujours rendue service pendant ces années : Dany, Alain, Jean Louis, Jocelyne et Claudine, une mention spéciale à Iréa et à Denis pour toutes leurs astuces et leur expertise informatique. Merci encore à eux tous pour m'avoir dépannée tant de fois.

Au-delà des gens rencontrés dans le cadre de travail je tiens à remercier chaleureusement ceux qui nous ont accueillis à notre arrivée en France : Leonardo De Silva, David Palomino, Oscar Baéz, Felipe Ramon et Patricia Taillandier. Merci pour l'hospitalité, la gentillesse et l'attention dès notre arrivée. Merci à Lydie par tous ces enrichissants échanges culturaux.

J'adresse en outre une amicale pensée à tous les collègues avec qui j'ai partagés la table à Thalès. Je tiens à citer les « bio » : Phong, Noura, Youssef, Aurélien, Caro, Nancy, Dominique, Huberson, Suhuttaya ; les hispanophones : José Luis, Guillermo, Antonio, Adrien, Amanda, Fernando, Lucho, Alain, Ivonne. Je garderai d'excellents souvenirs des blagues à table, notamment de la part de Gaëlle, Ekin, Marianne et Harold, ainsi que de la gentillesse de Manidaa, Cathy, Khouloud, Ali, Raymond, Nguessan et Julien L.

Enfin, je remercie du fond du cœur mes amies mexicaines Vero, Paty et Glo, et bien sûr ma famille pour son grand soutien internaute, merci Ardilla. Je dédie ce travail à mon fils Braulio, non pas pour le contenu, sinon pour l'effort et tout ce qu'il a dû surmonter pour arriver à côté de moi et ce jusqu'à la fin.

# Sommaire

**Introduction générale** 1

**CHAPITRE I. Présentation générale de la technologie des piles à combustible microbiennes et bibliographie sur les paramètres d'optimisation**

I.1 Concepts fondamentaux. 6

I.1.1 Pile à combustible 6
I.1.2 Pile à combustible microbienne 9
I.1.3 Constituants des piles microbiennes 11
I.1.4 Bioconversions lors la production d'électricité 12
I.1.5 Techniques électrochimiques de suivi des piles 17

I.2 Développement historique 20

I.2.1 Premières piles biologiques 20
I.2.2 Parcours de la recherche sur les piles microbiennes 21

I.3 Amélioration des performances par l'optimisation des constituants et des conditions opératoires 23

I.3.1 Sélection du biocatalyseur 23
I.3.2 Sélection du combustible 27
I.3.3 Température opératoire 30
I.3.4 Etat de la surface des électrodes 35

I.4 Conclusions 36

I.5 Références 36

**CHAPITRE II. Matériel et méthodes**

II.1 Sources de biocatalyseurs 44

II.1.1 Terre de bruyère 44
II.1.2 Terreau de jardin et lixiviats de terreau 44
II.1.3 Boues anaérobies 46

II.2 Combustibles 47

II.2.1 Jus de pommes fermenté 47
II.2.2 Lies de vin 47
II.2.3 Déchets de l'industrie laitière 47
II.2.4 Rejets de lavage de l'industrie laitière 48

II.3 Etudes potentiostatiques 49

II.3.1 Montage expérimental 49
II.3.2 Techniques électrochimiques 50
II.3.3 Conditions particulières pour les expériences en cellule 50
II.3.3.1 Détermination de l'électroactivité microbienne 50
II.3.3.2 Anodisation du feutre de graphite 51
II.3.3.3 Adsorption des résidus laitiers sur l'anode 51
II.3.3.4 Essais à température contrôlée 51

II.4 Etudes en pile à combustible microbienne 52

II.4.1 Montage expérimental 52
II.4.2 Méthodes de suivi de la pile 53

II.5 Techniques d'analyse chimique 55

II.5.1 Demande chimique en oxygène DCO 55
II.5.2 Carbone organique total COT 56
II.5.3 Méthode de Lowry pour le dosage des protéines 56
II.5.4 pH et Conductivité 56
II.5.5 Microscopie électronique à balayage (MEB) 56
II.5.6 Détermination enzymatique de lactose et galactose 57

II.6 Références 57

Annexe 58

**CHAPITRE III. Etude électrochimique pour la sélection des combustibles et des biocatalyseurs pour la PACM**

III.1 Introduction 64

III.2 Chronoampérométrie des milieux 65

III.2.1 Chronoampérométrie des combustibles 65

III.2.1.1 Jus de pommes fermenté et lies de vin 66
III.2.1.2 Résidus de l'industrie laitière 67
III.2.1.3 Effluents de lavage de l'industrie laitière 69

III.2.2 Chronoampérométrie des sources de biocatalyseurs 71

III.2.2.1 Terre de bruyère et lixiviat de terreau 72
III.2.2.2 Boues anaérobies 73

III.3 Voltammétrie cycliques des milieux 74
III.3.1 Voltampérogrammes des combustibles 75

III.3.1.1 Jus de pommes fermenté et lies de vin 75
III.3.1.2 Résidus de l'industrie laitière 76
III.3.1.3 Effluents de lavage de l'industrie laitière 77

III.3.2 Voltampérogrammes des biocatalyseurs 78

III.3.2.1 Terre de bruyère et lixiviats de terreau 78
III.3.2.2 Boues anaérobies 80

III.4 Conclusions 80

III.5 Références 81

**CHAPITRE IV. Etude des paramètres opératoires des PACM : Phase d'ensemencement et de démarrage, concentration en combustible, température**

IV.1 Introduction 85

IV.2 Etudes en ensemençant avec des lixiviats de terreau 86

IV.2.1 Acclimatation du biocatalyseur, effet de la concentration en combustible, prétraitement de l'anode, température optimale 86

IV.2.1.1 Présentation de l'article « Treatment of dairy wastes with a microbial anode formed from garden compost » 86
IV.2.1.2 Article « Treatment of dairy wastes with a microbial anode formed from garden compost » 88

IV.2.2 Acclimatation cyclique du biocatalyseur au combustible 98
IV.2.3 Effet de la concentration en combustible dans un mélange biocatalyseur-combustible 99
IV.2.4 Effet des constituants de résidus de laiterie sur la génération de courant dans un système modèle : Caséine-Lactose-Ac. Humique 102

IV.3 Etudes en ensemençant avec des boues anaérobies 106

IV.3.1 Modification de l'état de surface de l'anode 106
IV.3.2 Influence de la concentration en combustible sur les performances de l'anode 108

IV.4 Comparaison des performances des biocatalyseurs 111

IV.4.1 Performance électrique : Rendement faradique 111
IV.4.2 Performance de la biodépollution : Abattement de la DCO et de la concentration en protéines 114

VI.6 Conclusions 117
VI.7 Références 118

**CHAPITRE V. Evaluation des performances de piles à combustible microbiennes**

V.1 Introduction 121

V.2 Performances des biocatalyseurs dans une PACM avec de l'acétate comme combustible modèle 122

V.2.1 Pile inoculée avec des boues de station d'épuration 123
V.2.2 Pile inoculée avec des lixiviats de terreau 126

V.3 PACMs inoculés avec des boues alimentées en déchets agro-alimentaires 130

V.3.1 Procédure de démarrage des piles 130
V.3.2 Performances comme fonction de l'agitation, ajout de combustible et rapport biocatalyseur/combustible 132

V.4 PACMs inoculées avec des lixiviats de terreau alimentés en déchets agro-alimentaires 137

V.4.1 Présentation de l'article "Testing different food industry wastes for electricity production in MFC" 137
V.4.2 Article "Testing different food industry wastes for electricity production in MFC" 138

V.5 Biodépollution emmenée par les PACMs 161

V.5.1 Abattement de la DCO et rendement faradique 161
V.5.2 Conversion idéale d'énergie chimique en énergie électrique 163

V.6 Evaluation de la PACM inoculé avec des lixiviats de terreau alimentés en déchets de laiterie en conditions opératoires optimales 164

V.7 Conclusions 168

V.8 Références 169

**Conclusion générale** 172

**Références** 176

# Introduction générale

L'exploitation de nouvelles sources d'énergie constitue un enjeu essentiel au niveau mondial. Le besoin grandit de jour en jour pour diverses raisons, dont la plus connue est la hausse du prix du pétrole, mais aussi à cause de la croissance des besoins en énergie de populations qui n'ont pas accès aux ressources énergétiques conventionnelles. De plus en plus on cherche à développer des filières de production d'énergies propres et renouvelables qui permettront de fournir de l'énergie tout en diminuant l'impact environnemental.

De façon générale, de nombreuses activités industrielles génèrent des effluents et des déchets qui doivent être traités. Certaines industries produisent des résidus avec une forte teneur en matière organique, notamment les industries agricoles et alimentaires. Récemment, au début des années 2000, la technologie des « piles à combustible microbiennes » (PACMs) a émergé, offrant une solution combinée qui permet la génération de courant électrique en consommant la matière organique contenue dans des effluents et des déchets industriels ou urbains. Les PACMs sont similaires à des piles à combustible classiques, mais ce sont des microorganismes adhérés sur l'anode qui assurent la catalyse des réactions d'oxydation de la matière organique. La diversité des réactions anodiques que peuvent catalyser les microorganismes ouvrent un vaste champ de combustibles. Les PACMs sont particulièrement étudiées pour exploiter les effluents et les déchets industriels et urbains à forte concentration organique. La réaction sur la cathode est le plus souvent la réduction de l'oxygène, réalisée sur des électrodes classiques ou parfois également catalysée par des microorganismes adhérés.

A ce jour, la faible efficacité des PACMs, de l'ordre de 1000 milliwatts de puissance générée par mètre carré de surface d'électrode, reste un verrou majeur à leur développement. De nombreux efforts d'amélioration ont été menés à la fois au niveau fondamental et d'un point de vue pratique. A niveau fondamental, la plupart des études visent l'identification des microorganismes électrochimiquement actifs et la compréhension des mécanismes de transfert d'électrons. D'un point de vue pratique, les recherches portent sur le choix des matériaux d'électrode, de la membrane de séparation et le design des composants des piles.

Vu la variété des microorganismes découverts ces dernières années qui s'avèrent capables de réaliser des électro-catalyses et vu la diversité des composés organiques qui peuvent être utilisés comme combustibles, il semble que le répertoire des PACMs est encore loin d'être cerné.

Ce travail de thèse a été construit sur la base de deux découvertes récentes faites au LGC : la possibilité d'utiliser des microorganismes issus de terreau de jardin pour former des biofilms électroactifs d'une part, et les excellentes capacités du lait utilisé comme combustible de PACMs d'autre part. Un certain nombre d'études réalisées sur ces axes ont ensuite mis en évidence les limitations de l'utilisation *ex-situ* des bioanodes formées dans le terreau, ainsi que la possibilité d'utiliser une large variété de résidus alimentaires comme combustibles de PACMs.

L'évaluation des milieux qui peuvent être utilisés comme source de biocatalyseur et/ou de combustible a constitué le premier objectif de ce travail. Dans un deuxième temps, le travail a porté sur la détermination de conditions opératoires qui favorisent tant la génération d'électricité que l'abattement de la pollution, évaluée en termes de la Demande Chimique en Oxygène (DCO). Ces deux premiers volets de l'étude ont été menés en conditions électrochimiques bien contrôlées, en cellules électrochimiques sous potentiel imposé. A la fin de cette partie, divers systèmes « biocatalyseur-combustible » ont été évalués et un ensemble d'information a été collecté visant à définir des conditions opératoires appropriées. Deux sources de biocatalyseurs ont été testées : des terreaux de jardin après lixiviation et des boues issues de station d'épuration rendues anaérobies. En combinaison, trois types de combustibles ont été choisis pour leur représentativité en termes de déchets agro-industriels : des jus de pomme fermentés, des lies de vin et des déchets d'une ligne de fabrication de yogourts

Le présent mémoire expose le travail de recherche en cinq chapitres.

Le Chapitre I présente le concept de PACM. Une partie est dédiée à une brève description des techniques électrochimiques couramment utilisées pour la caractérisation des piles à combustible. L'état de l'art de la recherche sur les PACM est ensuite décrit en mettant l'accent sur les diverses études d'optimisation des paramètres et des conditions opératoires.
Le Chapitre II est consacré à la description des matériels et méthodes utilisés pendant le travail expérimental. Les différents biocatalyseurs et combustibles sont caractérisés. Dans la

deuxième partie, les dispositifs expérimentaux mis en œuvre pour les études potentiostatiques et pour les modules de pile sont détaillés. La dernière partie présente les techniques d'analyse chimique utilisées pour l'évaluation des systèmes.

L'étude électrochimique pour la sélection des combustibles et des sources de biocatalyseurs est présentée dans le Chapitre III. Le chapitre est organisé en deux parties, la première décrit les résultats obtenus en chronoampérométrie à potentiel constant, la seconde regroupe l'analyse des voltampérogrammes enregistrés à différentes phases de la formation des biofilms électroactifs.

Les études consacrées à l'amélioration des composants de la PACM et des paramètres opératoires sont décrites dans le Chapitre IV. Ce chapitre est divisé en trois parties, la première porte sur les études menées avec les lixiviats de terreau utilisés comme source de biocatalyseur, la deuxième concerne les études réalisées avec les boues anaérobies. Ces travaux mettent l'accent sur l'acclimatation du biocatalyseur aux combustibles, la préparation des anodes, la concentration des combustibles et la température opératoire. Les deux sources de biocatalyseurs sont comparées dans la dernière partie eu égard à leur efficacité en abattement de la DCO et en production d'énergie électrique.

Le dernier chapitre, le Chapitre V, est focalisé sur la mise en place dans un module de PACM des sources de biocatalyseurs, des combustibles et des conditions opératoires qui ont paru les meilleures dans les chapitres précédents. Différentes expérimentations sont menées pour tester les bioanodes formées à partir de terreaux de jardin et de boues anaérobies en utilisant de l'acétate comme combustible modèle puis avec les trois types de déchets choisis pour l'étude. L'intérêt de ces expériences s'est porté sur les méthodes d'alimentation, le rapport biocatalyseur/combustible dans l'anolyte, l'aération du catholyte et le maintien de conditions anaérobies de l'anolyte. A la fin du chapitre, une PACM est évaluée qui regroupe l'ensemble des conditions optimales définies précédemment.

Ce travail de thèse s'inscrit dans le programme européen Alβan « Programme of High Level Scholarships for Latin America ». L'objectif de ce programme est de promouvoir les coopérations avec L'Amérique Latine dans le champ de l'enseignement supérieur et de la recherche, ainsi que de permettre une ouverture des moyens d'enseignement européens aux pays en voies de développement. Le programme Alβan est géré par la Commission

Européenne en partenariat avec l'Association Groupe Santander, un réseau de 45 universités européennes qui ont établi des accords de coopération avec des organismes d'enseignement supérieur d'Amérique Latine. Bibiana Cercado Quezada a bénéficié de la bourse No. E06D101223MX du programme Alβan.

Le travail présenté dans ce mémoire a conduit à la communication orale des résultats dans deux séminaires :

- Journée Toulousaine d'Electrochimie, 17 juillet 2008, Toulouse
- Journées Cathala-Letort « La Génie des Procédés au service de l'Environnement. Enjeux et défis » organisées par la Société Française de Génie des Procédés (SFGP), 01-02 octobre 2008, Toulouse

Ce travail a été choisi pour représenter les travaux dans le domaine de la biotechnologie de l'école ENSIACET pour le

- Colloque Recherche de la Fédération Gay Lussac « La chimie du & pour le vivant » 04-05 décembre, Rennes

Il a donné lieu à trois communications sous forme d'affiche et sa publication dans les « Proceedings abstracts » dans un congrès national :

- XXIIème Congrés de la SFGP, 14-16 octobre 2009, Marseille,

et deux congrès internationaux :

- International Workshop Electroactive Biofilms, 19-21 novembre 2008, Dourdan
- 2nd International Congress on Green Process Engineering, 14-17 juin, Venise

Deux projets d'articles sont inclus dans le présent mémoire :
« Treatment of dairy wastes with a microbial anode formed from garden compost", accepté dans "Journal of Applied Electrochemistry", et
"Testing different food industry wastes for electricity production in MFC » soumis au journal "Bioresources Technology".

# CHAPITRE I

# Présentation générale de la technologie des piles à combustible microbiennes et bibliographie sur les paramètres d'optimisation

I.1 Concepts fondamentaux. 6

I.1.1 Pile à combustible 6
I.1.2 Pile à combustible microbienne 9
I.1.3 Constituants des piles microbiennes 11
I.1.4 Bioconversions lors la production d'électricité 12
I.1.5 Techniques électrochimiques de suivi des piles 17

I.2 Développement historique 20

I.2.1 Premières piles biologiques 20
I.2.2 Parcours de la recherche sur les piles microbiennes 21

I.3 Amélioration des performances par l'optimisation des constituants et des conditions opératoires 23

I.3.1 Sélection du biocatalyseur 23
I.3.2 Sélection du combustible 27
I.3.3 Température opératoire 30
I.3.4 Etat de la surface des électrodes 35

I.4 Conclusions 36

I.5 Références 36

## I.1 Concepts fondamentaux

### I.1.1 Pile à combustible

Une pile à combustible est un dispositif électrochimique qui transforme l'énergie chimique en énergie électrique tant qu'un combustible et un oxydant sont fournis (Hoogers 2003). La pile fonctionne par l'oxydation d'un combustible sur l'anode avec le transfert concomitant des électrons vers le matériau de l'électrode. Les électrons circulent au-travers du circuit électrique externe vers la cathode et sont finalement transférés sur un accepteur d'électrons. Les réactants doivent être fournis aux deux électrodes et des catalyseurs sont nécessaires afin d'assurer une vitesse de transfert d'électrons suffisante au niveau des électrodes (Larminie & Dicks 2003).

Les principes électrochimiques de la pile à combustible peuvent être facilement illustrés par l'exemple de la pile hydrogène-oxygène (Wingard et al 1982). La réaction à l'anode est l'oxydation de l'hydrogène :

$H_2 = 2H^+ + 2e^-$ $E° = 0$ V Eq I.1

à la cathode a lieu la réduction de l'oxygène

$2H^+ + 2e^- + ½ O_2 = H_2O$ $E° = 1,229$ V Eq I.2

ce qui conduit à la réaction globale

$H_2 + ½ O_2 = H_2O$ $E° = 1,229$ V Eq I.3

E° est le potentiel d'équilibre standard des demi-réactions. La quantité théorique de travail (Wu) qui peut être obtenue dépend de la différence d'enthalpie libre ($\triangle G$) de la réaction, dans le sens de transformation des réactifs vers les produits à température et pression constantes. Elle peut être exprimée par la différence des potentiels de demi-réactions anodique et cathodique selon :

$Wu = -\triangle G = nFE$ Eq I.4

où n est le nombre d'électrons transférés par la réaction (ici n = 2), F la constante de Faraday, 96 485 Coulomb/mole et E le potentiel de la demi-réaction.

A partir de la définition de l'enthalpie libre, à pression et température constantes, l'énergie libre est corrélée à la variation d'enthalpie (△H) et d'entropie (△S) par :

$$\triangle G = \triangle H - T\triangle S \qquad \text{Eq I.5}$$

Le rendement d'une pile à combustible est défini comme le rapport de l'énergie électrique qu'elle fournit à l'énergie qui serait générée par la combustion totale du combustible, c'est-à-dire en valeur absolue à l'enthalpie de formation du combustible. Ainsi le rendement maximum s'exprime :

$$\text{Rendement} = \frac{\Delta G}{\Delta H} = 1 - \frac{T\Delta S}{\Delta H} \qquad \text{Eq I.6}$$

Le rendement théorique peut atteindre 85 à 90%. Néanmoins ces valeurs théoriques ne pourraient être atteintes que lorsque les réactions sont à l'équilibre, c'est-à-dire en l'absence de passage de courant. Les rendements mesurés se trouvent plutôt dans l'intervalle 25 - 70 %. En fonctionnement une pile est le siège de nombreuses irréversibilités qui diminuent son rendement. Au niveau des électrodes, les irréversibilités se traduisent par une différence entre les potentiels d'électrodes (E) et les potentiels d'équilibre des demi-réactions ($E_{eq}$). Cette différence appelée surtension ($\eta$) a deux sources principales:

- les surtensions d'activation
- les surtensions de concentration

Au sein d'une pile complète la chute ohmique est la troisième cause importante d'irréversibilités.

La surtension d'activation correspond à la cinétique du transfert d'électrons au niveau des électrodes. Elle exprime l'écart à l'équilibre qui est nécessaire pour assurer le transfert des électrons du composé qui s'oxyde ou se réduit vers ou depuis le matériau de l'électrode. Ce type de surtension est majoritaire à bas courant. La surtension de concentration est due au

transfert de matière de combustibles ou des produits vers ou provenant des électrodes. La chute ohmique est liée au transport des ions au-travers de l'électrolyte et du séparateur qui est parfois disposé entre compartiments anodique et cathodique Ces types d'irréversibilités deviennent plus importants aux courants élevés. La Fig I.1 montre les trois types de surtension observables sur la courbe de polarisation d'une pile.

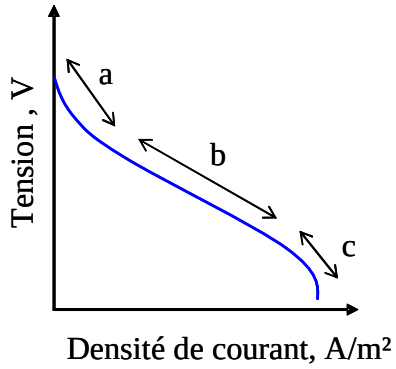



*Fig I.1 Courbe de polarisation d'une pile indiquant les trois régions de fonctionnement pour lesquelles les types de surtension deviennent prépondérantes. a) surtension d'activation, b) chute ohmique, c) surtension de concentration.*

Pour qu'une pile débite, le potentiel de la cathode (Ec) doit être supérieur au potentiel de l'anode (Ea), ainsi la tension de la pile (U) est donnée par :

$U = Ec – Ea – \text{chute ohmique}$ Eq. I.7

En termes de potentiels d'équilibre et de surtension l'équation s'écrit :

$U = (E°_{eq}c - \eta_c) – (E°_{eq}a - \eta_a) – \text{chute ohmique}$ Eq. I.8

La Fig 1.2 représente les courbes de polarisation de l'anode et de la cathode pour une pile qui débite avec un courant I = Ia = -Ic et pour laquelle on néglige la chute ohmique. Pour l'anode, le potentiel déterminé à courant zéro (I = 0) est indiqué par $E_{a(I=0)}$ et la surtension par $\eta_a$. Les mêmes notations s'appliquent à la cathode. Il est évident sur ce schéma que plus les courbes seront écartées meilleure sera la tension délivrée par la pile.

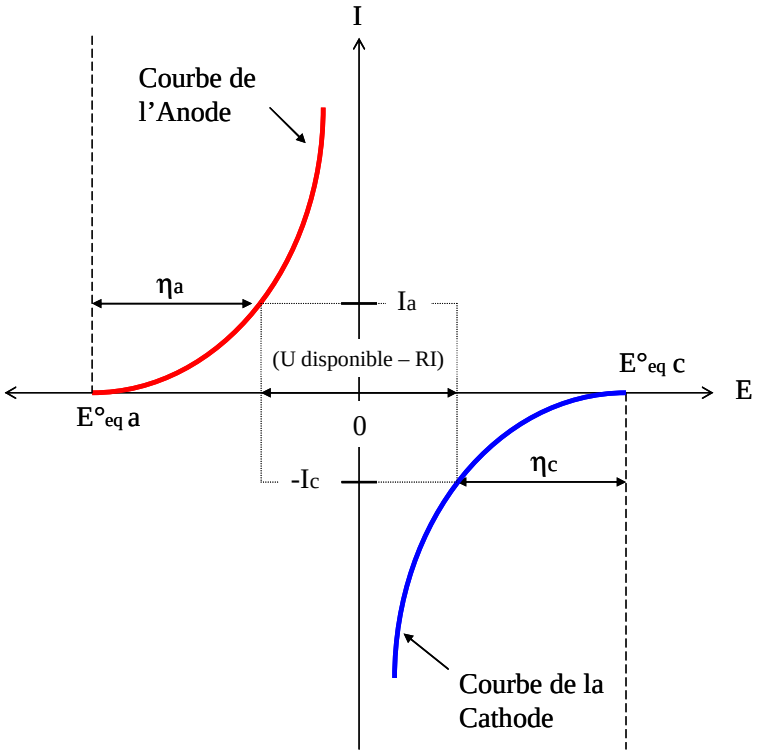



*Fig I.2 Allure des courbes de polarisation « Intensité – Potentiel » de l'anode et de la cathode d'une pile.*

De nombreux catalyseurs métalliques ont été testés pour les piles à combustible à hydrogène tels que Pb, Zn, Ag, Ni, Pt ou Pd. Le meilleur catalyseur reste le platine. Au début du développement de ce type de pile il était utilisé en concentration surfacique de 28 mg/cm², cependant à l'heure actuelle les concentrations nécessaires ont été réduites à environ 0,2 mg/cm², ce qui diminue considérablement le coût des systèmes (Larminie & Dicks, 2003).

### I.1.2 Pile à combustible microbienne

Ce qui caractérise une pile microbienne est l'utilisation de microorganismes comme catalyseurs. Les microorganismes qui ont la capacité d'échanger des électrons avec le matériau d'une électrode en utilisant les réactions propres de leur métabolisme sont nommés microorganismes « électrochimiquement actifs » ou « électroactifs ».

Une pile à combustible microbienne transforme l'énergie chimique contenue dans la matière organique en électricité. Les bactéries sur l'anode oxydent les composés organiques et

transfèrent les électrons vers l'anode. Les protons produits à l'anode migrent à travers la solution vers la cathode. Si la réaction de cathode est, comme c'est souvent le cas, la réduction de l'oxygène, les protons se combinent avec l'oxygène et les électrons issus du circuit électrique vont produire de l'eau (Biffinger & Ringeisen, 2008).

La Fig 1.3 schématise une pile à combustible microbienne.

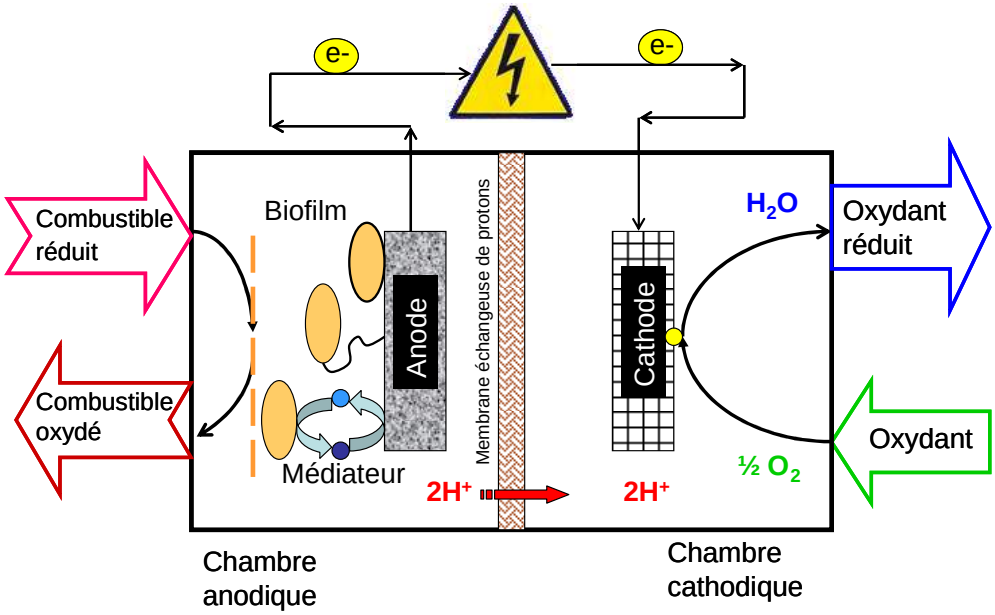



*Fig I.3 Schéma d'une pile à combustible microbienne avec une bioanode et une cathode abiotique à oxygène.*

Les mécanismes de transfert des électrons entre les bactéries et les électrodes proposés sont de trois types:

- le transfert direct. Il a lieu par le contact physique de la membrane cellulaire bactérienne avec le matériau de l'électrode. L'échange d'électrons est assuré par des complexes transporteurs d'électrons liés à la membrane cellulaire tels que les cytochromes (Holmes et al. 2004; Chang et al. 2006) ;
- le transfert indirect. Le transfert d'électrons a lieu grâce à des médiateurs exogènes comme le rouge neutre (Park et al. 1999) ou des médiateurs endogènes produits par les microorganismes eux-mêmes, tel que les phenazines (Rabaey et al. 2004) ;
- le transfert grâce à des pili nommés « nanowires » qui permettent aux cellules bactériennes d'atteindre à distance l'électrode ou d'autres cellules bactériennes (Gorby et al. 2006).

### I.1.3 Constituants des piles microbiennes

De façon générale les composants des piles microbiennes étudiés à échelle du laboratoire sont :

- les électrodes ;
- une résistance externe ;
- une membrane échangeuse d'ions ;
- un compartiment anodique contenant un anolyte ;
- un compartiment cathodique contenant un catholyte.

Les électrodes

Les électrodes utilisées peuvent être sous forme de fil, de grille, de feuille, de plaque, d'éponge, de feutre, de barreau, de tube ou de granules. Les matériaux rencontrés dans les piles microbiennes sont le carbone et le graphite, l'acier inoxydable, le platine et le carbone vitreux réticulé. L'objectif est d'avoir une aire d'électrode la plus grande possible.

La résistance externe

Les électrodes sont connectées au-travers d'une résistance externe qui dissipe l'énergie produite par la pile. Le courant produit par la pile est faible pour les valeurs élevées de résistance et *vice-versa*, suivant la loi d'Ohm (I = U/R). La performance d'une pile est mesurée en variant la résistance externe et en mesurant la puissance produite pour chaque résistance. Un nombre important de travaux reportent l'utilisation d'une résistance de 1000 ohms comme valeur standard pour faire débiter les piles sur de longues périodes, certains autres préfèrent utiliser la valeur de la résistance que génère la puissance maximale.

La membrane

Les séparateurs sont utilisés afin d'éviter le mélange entre anolyte et catholyte lorsqu'ils sont différents et que les produits de réaction d'une électrode n'arrivent au voisinage de l'autre. Les membranes échangeuses de protons des fournisseurs Nafion® et Ultrex® comptent parmi les plus utilisées pour les piles microbiennes.

Anolyte

L'anolyte dans les piles microbiennes est composé par un solvant, habituellement de l'eau, un sel comme électrolyte de base et un système tampon qui stabilise le pH. Des composés carbonés et nitrés nécessaires aux fonctions microbiennes sont souvent ajoutés. Les anolytes bien contrôlés utilisés en laboratoire peuvent être substitués par des effluents domestiques ou industriels selon les objectifs de la recherche.

Catholyte

Les biocathodes sont moins fréquentes que les bioanodes. Lorsque des micro-organismes sont utilisés les composants du catholyte sont similaires à ceux de l'anolyte pour assurer les conditions d'un environnement biologique.
Souvent les cathodes utilisent la réduction de l'oxygène gazeux contenu dans l'air en utilisant des cathodes dites « respirantes ». Dans d'autre cas le catholyte contient un oxydant qui est consommé par la pile, le plus répandu étant l'hexacyanoferrate.

### I.1.4 Bioconversions lors la production d'électricité

D'après Logan et al. (2006), en prenant comme exemple l'oxydation de l'acétate, la demi-réaction qui a lieu à l'anode est

$CH_3COO^- + 4H_2O \rightarrow 2HCO_3^- + 9H^+ + 8e^-$

Le potentiel d'équilibre de l'anode $E_{eq}a$ est obtenu en appliquant la loi de Nernst:

$$E_{eq}a = E_{eq}a^O + \frac{RT}{nF}\ln\frac{C_{ox}}{C_{rd}} \qquad \text{Eq I.9}$$

où $E_{eq}a°$ est le potentiel d'équilibre standard de la demi-réaction en V
R la constant des gaz parfaits, 8.31447 J/mol K
T la température, K
n le nombre d'électrons échangés,

F la constante de Faraday, 96 485 Coulomb/mol

$C_{ox}$ est la concentration du composé en état oxydé, M

$C_{rd}$ est la concentration du composé en état réduit, M

Ainsi, le potentiel d'équilibre de l'anode pour l'oxydation de l'acétate est

$$Ea = E_a^0 - \frac{RT}{8F}\ln\left(\frac{\left[CH_3COO^-\right]}{\left[HCO_3^-\right]^2\left[H^+\right]^9}\right)$$

Dans le cas de la cathode, si l'oxygène est l'accepteur d'électrons, le potentiel d'équilibre est donné par

$$Ec = E_c^0 - \frac{RT}{4F}\ln\left(\frac{1}{pO_2\left[H^+\right]^4}\right)$$

Les voies métaboliques qui ont un rapport avec la production d'électricité sont anaérobies, trois processus peuvent donc être concernés : la digestion anaérobie, la respiration anaérobie et la fermentation. Les microorganismes présents dans les piles varient des anaérobies facultatifs jusqu'aux anaérobies stricts.

Dans la digestion anaérobie un consortium de microorganismes dégrade la matière en absence d'oxygène. L'activité des anaérobies stricts comme les méthanogènes est souvent très importante dans les piles microbiennes (Pham et al. 2006). Ce type de procédé est réalisé en deux étapes :

1a. L'acidogénèse consiste en l'hydrolyse de la matière organique qui produit des acides organiques simples (acide acétique, acide propionique, …) ; elle est effectuée par des bactéries anaérobies et anaérobies facultatives (bactéries acidogéniques). Ces voies sont schématisées dans la Fig I.4.

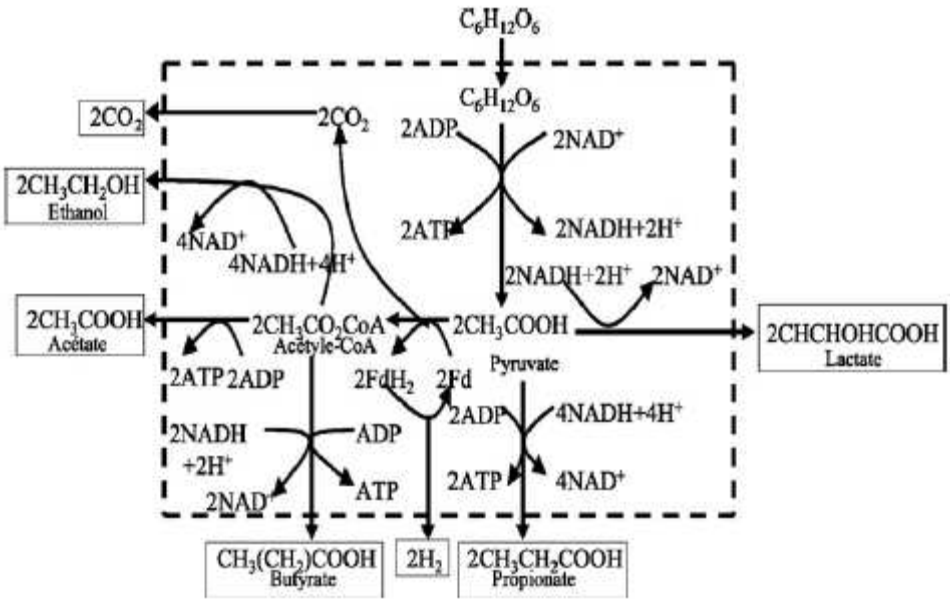



*Fig I.4 Voies biochimiques de l'acidogénèse des carbohydrates (Aceves-Lara et al. 2008).*

2a. La méthanogénèse. Les acides de l'étape précédente sont métabolisés par des Archae méthanogènes (anaérobies strictes) pour produire du méthane et du gaz carbonique. La composition du « biogaz » est d'environ 60 – 70% $CH_4$, 30 – 40% $CO_2$ avec des traces de $H_2S$ et $H_2$, composition qui correspond à l'équilibre de l'activité biologique des populations microbiennes présentes (Fig I.5).

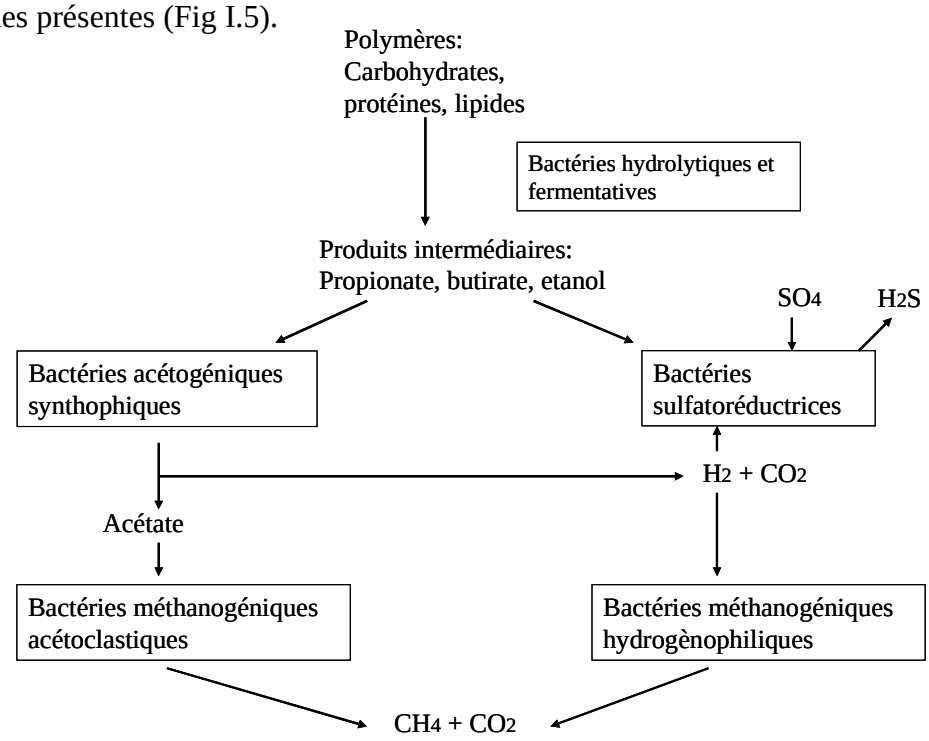



*Fig. I.5 Schéma général de métabolisme microbien focalisant les produits de l'activité de méthanogenèse (Saval & Noyola, 1992).*

Lors de la respiration anaérobie les électrons sont détournés de la chaîne respiratoire vers un accepteur final d'électrons autre que l'oxygène. Les microorganismes anaérobies facultatifs ou anaérobies stricts utilisent comme accepteur final d'électrons des nitrates, sulfates, $CO_2$ (méthanogènes), des ions métalliques (Fe III) ou des acides organiques (fumarate). La réduction du sulfate et une voie commune des bactéries anaérobies, qui est particulièrement mise à profit dans les piles utilisant des effluents et des sédiments.

La fermentation est une voie métabolique pour laquelle une partie des composés organiques sont réduits, alors que l'autre partie est oxydée. Ces oxydations ne sont pas complètes, la plupart de l'énergie contenue dans le composé organique reste contenus dans les produits de la fermentation, produits réduits tels que l'hydrogène, l'éthanol ou l'acide formique, qui sont susceptibles d'être ensuite oxydés sur l'anode.

Le Tableau I.1 résume les deux voies principales qui ont lieu dans les piles microbiennes en conditions anaérobies.

Tableau I.1. Conditions générales des voies métaboliques présentes en piles microbiennes

| **Voie Métabolique** | **Donneur d'électrons** | **Accepteur d'électrons** | **Microorganismes** |
|---|---|---|---|
| Respiration anaérobie | Matière organique<br>Matière inorganique ($H_2S$, Fe(II), $NH_3$, $H_2$) | Matière inorganique ($SO_2^{=}$, Fe(III), $NO_3^-$) | Anaérobies stricts |
| Fermentation | Matière organique<br>(Lactate, Succinate) | Matière organique<br>(Pyruvate, Fumarate) | Anaérobies stricts<br>Facultatifs |

Rabaey & Verstraete (2005) ont fait certaines remarques sur le lien entre le potentiel de l'anode et le métabolisme microbien. D'abord, ces auteurs rapportent que lors du démarrage des piles, le potentiel de l'anode est élevé et la tension de la pile faible (en considérant un potentiel de cathode stable). Le potentiel élevé de l'anode sélectionne des microorganismes aérobies et anaérobies facultatifs. Au fur et à mesure que les microorganismes se développent, la vitesse du métabolisme augmente simultanément à la production du courant, et le potentiel de l'anode commence à descendre ; les anaérobies facultatifs sont alors favorisés et les

anaérobies stricts restent limités. Si le potentiel de l'anode diminue en présence d'accepteurs d'électrons en solution (par exemple des sulfates ou nitrates), les microorganismes se tournent vers eux comme accepteurs d'électrons plutôt que d'utiliser l'anode. Par contre, si aucun accepteur d'électrons accessible n'est présent dans le milieu lorsque le potentiel de l'anode s'abaisse, la fermentation est alors le métabolisme dominant. Ce régime est à éviter dans les piles car la fermentation conduit à de faibles rendements faradiques. Il faut considérer que la production de méthane comme un indice qui indique que les bactéries n'utilisent pas l'anode comme accepteur d'électrons.

Le Tableau I.2 donne quelques réactions biologiques et leur potentiel d'équilibre redox. Comme mentionné précédemment, le travail théorique maximal qui peut être produit par la pile est donné par la différence d'enthalpie libre liée aux deux demi-réactions impliquant combustible et oxydant,

$$\Delta G = nF\left[E_{donneur} - E_{accepteur}\right] \qquad \text{Eq. I.10}$$

Pour être efficace une pile doit a priori utiliser un combustible ayant le potentiel d'équilibre le plus bas possible couplé à un oxydant avec un potentiel le plus élevé possible. Parmi les différences de potentiel les plus élevées on retrouve dans le tableau celle obtenue avec l'oxydation de l'hydrogène à l'anode et la réduction de l'oxygène à la cathode. Il est également évident à la simple observation du tableau qu'une pile utilisant en anode l'oxydation du glucose ou de l'acétate constituerait une alternative pas très éloignée en termes de puissance possible, de l'oxydation de l'hydrogène (au moins pour une comparaison à pH 7,0). Les piles microbiennes ouvrent donc des voies prometteuses en permettant la catalyse de ces oxydations. Pour une pile microbienne l'oxydation de NADH (nicotinamine adénine dinucléotide, H indiquant l'état réduit) pourrait être la réaction finale commune aux différents composants organiques car des différent voies métaboliques convergent dans la formation de cette molécule.

Tableau I.2 Potentiel redox apparent à pH 7 par rapport à l'électrode standard à hydrogène de réactions réalisées par les microorganismes. (D'après Rabaey & Verstraete, 2005 ; Schröder U. 2007)

| **Couple redox** | **E° (mV)** |
|---|---|
| $CO_2$/Glucose | -430 |
| $CO_2$/Formate | -430 |
| $CO_2$/Acétate | -280 |
| $CO_2/CH_4$ | -240 |
| $2H^+ + 2^{e-} \rightarrow H_2$ | -420 |
| Ferredoxine($Fe^{3+}$) + $e^- \rightarrow$ Ferredoxine($Fe^{2+}$) | -420 |
| $NAD^+ + H^+ + 2e^- \rightarrow NADH$ | -320 |
| $S + 2H^+ + 2e^- \rightarrow H_2S$ | -274 |
| $SO_4^{2-} + 10H^+ + 8^{e-} \rightarrow H_2S + 4\,H_2O$ | -220 |
| $Pyruvate^{2+} + 2H^+ + 2e^- \rightarrow Lactate^{2-}$ | -185 |
| $FAD + 2H^+ + 2e^- \rightarrow FADH_2$ | -180 |
| $Fumarate^{2-} + 2H^+ + 2e^- \rightarrow Succinate^{2-}$ | +31 |
| Cythochrome b($Fe^{3+}$) + $e^- \rightarrow$ Cytochrome b($Fe^{2+}$) | +75 |
| Ubiquinone + $2H^+ + 2^{e-} \rightarrow$ Ubiquinone$H_2$ | +100 |
| Cythochrome c($Fe^{3+}$) + $e^- \rightarrow$ Cytochrome c($Fe^{2+}$) | +254 |
| $NO_3^- + 2H^+ + 2e^- \rightarrow NO_2^- + H_2O$ | +421 |
| $NO_2^- + 8H^+ + 6e^- \rightarrow NH_4^+ + 2\,H_2O$ | +440 |
| $Fe^{3+} + e^- \rightarrow Fe^{2+}$ | +771 |
| $O_2 + 4H^+ + 4e^- \rightarrow 2H_2O$ | +840 |

### I.1.5 Techniques électrochimiques de suivi des piles

Il existe diverses méthodes de suivi des piles, pour évaluer les performances du système complet et/ou mesurer celles des électrodes qui la constituent. Ces techniques de suivi sont brièvement décrites dans ce paragraphe.

Evolution de la tension de la pile, du potentiel de l'anode et du potentiel de la cathode dans le temps

Généralement l'évolution du comportement d'une pile microbienne au cours du temps est caractérisée en faisant simplement débiter la pile au-travers d'une résistance électrique, souvent prise égale à 1000 Ω afin de comparer avec les systèmes similaires de piles alimentées avec des eaux résiduaires. La différence de potentiel entre l'anode et la cathode de la pile, (tension de la pile) est mesurée en fonction du temps. Pour obtenir plus d'information sur le fonctionnement de la pile il est aussi possible de suivre la différence de potentiel entre l'anode et/ou de la cathode et une électrode de référence (par exemple Ag/AgCl) en fonction du temps. La Fig I.6 présente l'allure de ces courbes en prenant comme exemple une bio-anode et une cathode abiotique supposée stable dans le temps.

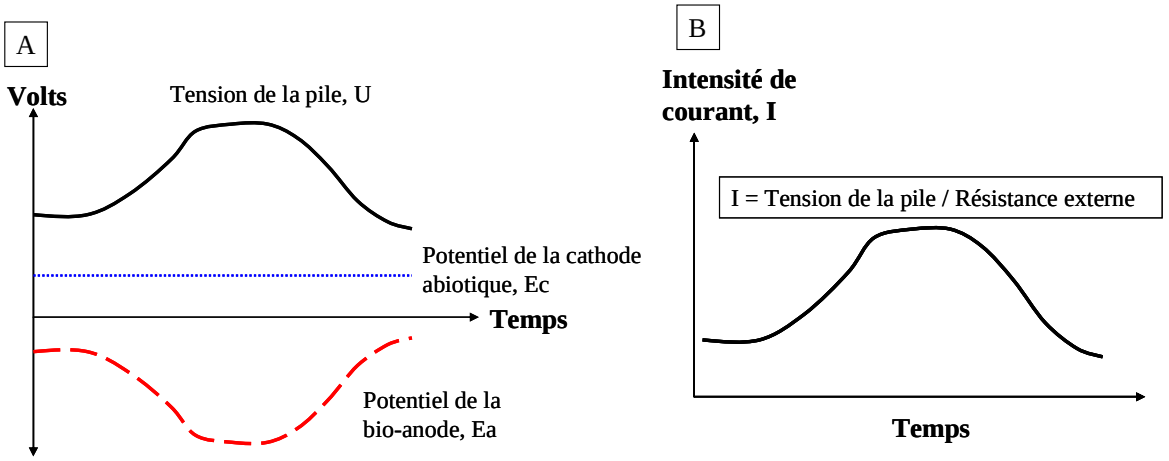



*Fig I.6 A) allure de l'évolution de la tension de la pile et du potentiel des électrodes (bio-anode et cathode abiotique), B) allure de l'évolution de l'intensité de courant de la pile.*

Courbes de puissance et courbes de polarisation « Tension - Intensité » de la pile et « Potentiel – Intensité » des électrodes

Les courbes de puissance de la pile permettent de déterminer la puissance et la densité de courant maximales qu'elle peut fournir. Ces courbes sont obtenues en faisant varier la résistance électrique externe à des intervalles de temps réguliers, afin que la pile ait le temps de stabiliser ses performances pour chacune des valeurs de la résistance. La connaissance de la valeur de la résistance et le relevé de la tension lorsqu'elle est stable suffisent pour tracer

les courbes de caractéristiques usuelles :

- la puissance en fonction de la densité de courant (Fig I.7A).
- la courbe dite de polarisation de la pile, c'est-à-dire la tension en fonction de l'intensité ou de la densité du courant (Fig I.7B).

Les courbes de polarisation permettent de retrouver les différents régimes de fonctionnement d'une pile correspondant à la prédominance des différents types d'irréversibilités : surtension d'activation, chute ohmique, surtension de concentration, détaillés dans les paragraphes précédents. Ces courbes sont représentées comme Tension de la pile vs. densité de courant

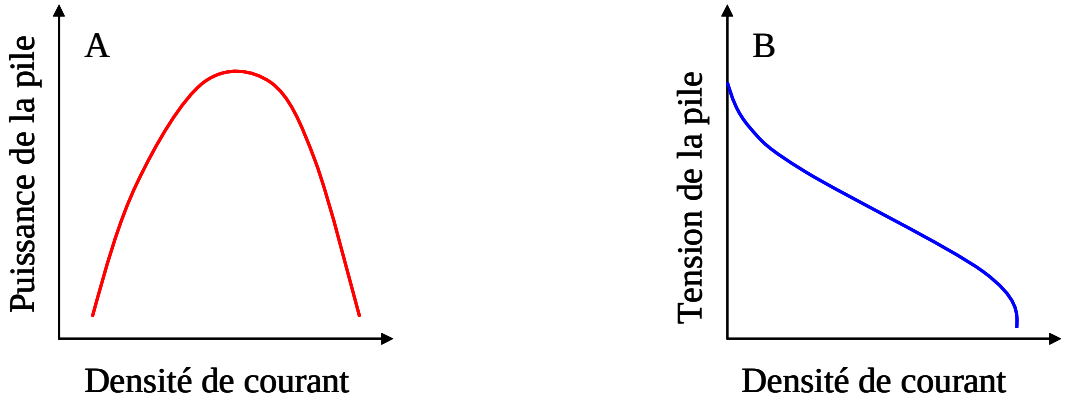



*Fig I.7 Allure des courbes A) de puissance de la pile, B) de polarisation « Tension – Intensité de courant » de la pile.*

Les courbes de polarisation « Intensité – Potentiel » de chaque électrode sont obtenues par la même procédure que les courbes de puissance de la pile, mais le potentiel de chaque électrode est alors mesuré par rapport à une électrode de référence. Ces courbes mettent en évidence la performance ou éventuellement la déficience de l'une ou l'autre électrode, ainsi que leur évolution lorsqu'elles sont tracées régulièrement au cours du temps (Fig I.2).

Chronoampérométrie

La chronoampérométrie est une technique potentiostatique pour laquelle le courant est mesuré dans le temps comme la réponse à un potentiel appliqué à l'électrode de travail par rapport à une électrode de référence. Cette technique utilise un montage électrochimique à trois électrodes ; l'électrode auxiliaire n'a alors plus d'importance, il suffit qu'elle ferme le circuit électrochimique sans introduire de limitation cinétique. Des courbes de densité de courant en fonction du temps sont obtenues (Fig I.8).

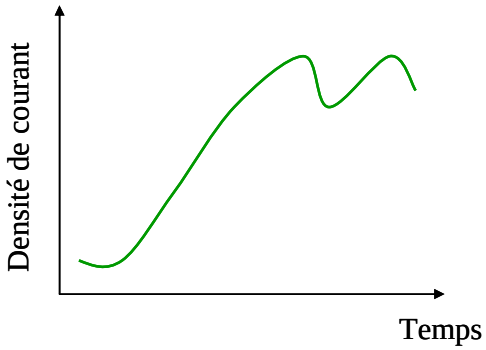



*Fig I.8 Allure de chronoampérogramme obtenu dans une cellule électrochimique.*

Voltampérométrie ou voltammétrie

La voltampérométrie est une technique potentiodynamique pour laquelle le potentiel de l'électrode de travail est balayé le plus souvent avec une vitesse linéaire et de façon cyclique entre deux bornes de potentiel. La densité du courant généré lors du balayage est représentée en fonction du potentiel (Fig I.9).

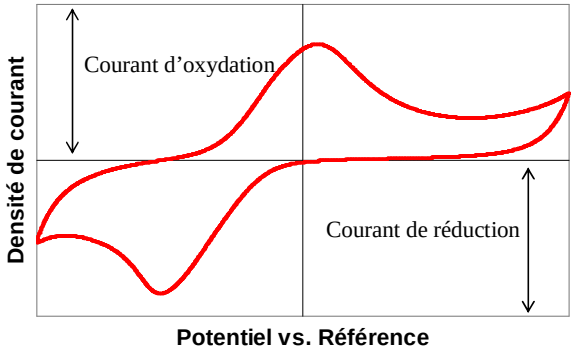



*Fig I.9 Allure d'un voltampérogramme obtenue en cellule électrochimique.*

## 1.2 Développement historique

### 1.2.1 Premières piles biologiques

Les premières investigations sur les piles biologiques ont été menées dans les années 60 aux Etats-Unis. Les projets ont été impulsés par l'Agence de l'Aéronautique et de l'Espace

(NASA) pour maîtriser la production d'énergie à partir de déchets dans des environnements confinés comme les capsules spatiales. Des algues et des bactéries ont été les premiers microorganismes évalués comme biocatalyseurs. En 1963 les piles bio-électrochimiques étaient commercialement disponibles comme source de puissance à utiliser dans les radios, torches et des appareils marins. Les premières études de piles biologiques en utilisant des milieux contenant des enzymes libres, c'est-à-dire des enzymes après extraction des microorganismes qui les avaient produits, ont été réalisées à la fin des années 60. Plus tard, à la fin des années 70 et au début des années 80, l'intérêt croissant pour la biotechnologie et les premiers soucis concernant la disponibilité des combustibles fossiles ont relancé les projets de recherche sur les piles biologiques, cette fois en visant des applications industrielles plus larges. Des applications de mesure et de contrôle (capteurs) ont été réussies relativement tôt, qui ont mis en évidence un rapport direct entre la tension des piles et l'efficacité des biocatalyseurs (Sell D, 1990 ; Wingard et al. 1982).

### I.2.2 Parcours de la recherche sur les piles microbiennes

La recherche sur les piles à combustible microbiennes a continué dans les années 80 et 90 par l'optimisation du rendement énergétique grâce à l'utilisation de médiateurs électrochimiques pour assurer le transfert des électrons entre les microorganismes et les électrodes (Tanaka et al. 1983). Toutefois l'utilisation de médiateurs présentait de nombreux inconvénients, car ils devaient être renouvelés, la plupart d'entre eux étaient toxiques et parfois même gênaient la croissance microbienne.

Au début des années 2000, des piles installées dans des sédiments marins ont ouvert une nouvelle ligne de recherche. Reimers et al. (2001) ont montré la possibilité de produire de l'électricité sans l'utilisation de médiateurs. A partir de ce moment, l'objectif privilégié de la recherche fut l'optimisation des piles par rapport à la production d'électricité. L'amélioration des électrodes (Park & Zeikus, 2002 ; Schröder et al. 2003), l'utilisation de nouveaux combustibles (Lee et al. 2003 ; Niessen et al. 2004) ont été étudiés. Un sujet très intéressant et encore peu développé porte sur l'identification de médiateurs produits par les microorganismes eux-mêmes (Rabaey et al. 2004). Le groupe de recherche de Pen State University dirigé par le Pr. Logan a médiatisé l'utilisation d'effluents comme combustible pour des piles qui développeraient alors une double fonction : la production d'électricité et la

dépollution grâce à la consommation de la matière organique contenue dans les effluents (Logan B. 2005 ; Logan & Regan, 2006 ; Logan B, 2006 ; 2006b). Le pas logique après la médiatisation de l'utilisation d'effluents comme combustible a été le couplage de la technologie naissante des piles avec des réacteurs biologiques de traitement des effluents. Rabaey et al. (2005) couplent ainsi une pile microbienne avec un réacteur UASB (Up flow anaerobic sludge blanket).

La recherche pour l'optimisation des piles a continué sur le design des compartiments, en particulier avec le souci de supprimer la membrane de séparation (Liu & Logan, 2004 ; Grzebyk et al. 2005). L'identification des microorganismes électroactifs est aussi un volet très important de la recherche actuelle sur les piles microbiennes (Lee et al. 2003 ; Holmes et al. 2004). L'application de micro-algues a été décrite par Rosenbaum et al. (2005). Au début des années 2000, seules des bio-anodes étaient envisagées. En 2005 Rohads et al. (2005) proposent une bio-cathode avec *Leptothrix discophora* qui assure la réduction de l'oxygène en utilisant l'oxyde de manganèse produit par la bactérie comme médiateur électrochimique. Simultanément Bergel et al. (2005) décrivent l'utilisation de bio-cathodes issues d'environnements marins.

Les premières études de modélisation des mécanismes microbiens et électrochimiques ont été publiées par Beynal et al. (2005) puis par Torres et al. (2007). Les études d'optimisation des piles sont complétées par des études fondamentales visant la compréhension des mécanismes de transfert d'électrons entre les microorganismes et les matériaux d'électrode (Gorby et al. 2006). Le changement de dimension des piles est étudié aussi bien pour l'extrapolation vers des unités plus importantes (Wang et al. 2007) que pour leur miniaturisation (Ringesein et al. 2007). Certaines des méthodes de la biotechnologie industrielle commencent à être appliquées aux piles, comme l'immobilisation des microorganismes sur les électrodes décrite par Srikanth et al. (2008).

En résumé, la compréhension des mécanismes de transfert d'électrons sur les électrodes et le parcours des électrons au sein des biofilms, l'optimisation des composants biologiques et abiotiques des piles, et la recherche de conditions opératoires optimales ont occupé les principaux axes de recherche depuis le début des années 2000. A noter la relative pauvreté des approches qui feraient appel aux concepts et savoir-faire du génie électrochimique. Les procédés biotechnologiques pour le traitement des polluants et plus récemment, en plus faible

pourcentage les biotechnologies industrielles, sont exploitées pour le profit et le développement de la biotechnologie énergétique.

## I.3 Amélioration des performances par l'optimisation des constituants et des conditions opératoires

### I.3.1 Sélection du biocatalyseur

Le biocatalyseur des piles, c'est-à-dire les microorganismes qui vont adhérer aux électrodes et assurer le rôle d'électro-catalyseur, peut provenir d'une culture pure, d'une culture mixte ou d'un consortium naturel. Ces microorganismes ont été appelés « anodophiles », « exoelectrogens », « electrogenic », « anode-respiring bacteria » et « electrochemically active bacteria » (Lovley DR, 2008).

Les mécanismes de transfert des électrons son décrits par Schröder U. (2007). Le transfert des électrons peut être direct par le contact du microorganisme avec la surface de l'électrode grâce à des cytochromes inclus dans la membrane cellulaire (Fig I.10A), ou par la voie de pili conducteurs appelés « nanowires » qui connectent la cellule microbienne avec l'électrode (Fig I.10B) ou avec les cellules adhérées sur l'électrode. Le transfert indirect est réalisé par des métabolites produits par le microorganisme qui agissent comme des médiateurs (Fig I.10C).

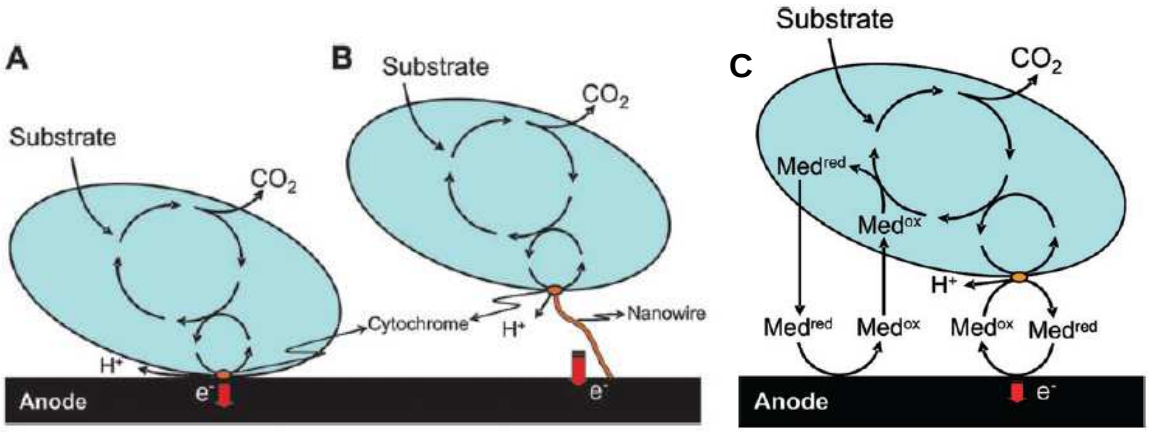



*Fig I.10 Mécanismes de transfert des électrons entre la cellule microbienne et l'électrode. A) transfert direct, B) transfert par micro-tubes, C) transfert indirect par des médiateurs (Schröder U. 2007).*

L'utilisation de cultures pures a permis des avancées rapides dans la compréhension des mécanismes de transfert d'électrons. Parmi les microorganismes plus étudiés se trouvent divers spécimens de la bactérie *Shewanella*. Kim et al. (2002) ont étudié différentes souches de ce microorganisme en conditions aérobies et anaérobies ; l'électroactivité a été uniquement observé en anaérobiose. Des analyses de type voltammétrie cyclique les ont conduit à proposer que le transfert direct d'électrons est facilité par des cytochromes des membranes externes. De plus, il a été observé qu'une augmentation de la concentration des microorganismes produisait un profil de saturation pour la génération de courant. Une performance de 8 mA/m² a été obtenue avec du lactate comme combustible dans une pile connectée à une résistance externe de 1000 ohms.

Les mécanismes de transfert d'électrons ont été étudiés avec *Geobacter sulfurreducens* (Bond & Lovley, 2003). En utilisant de l'acétate ou de l'hydrogène comme donneurs d'électrons et l'électrode de graphite comme l'unique accepteur, il a été montré pour la première fois un profil exponentiel de production de courant qui est associé à la croissance de *Geobacter* ; de plus, une fois éliminé le milieu nutritif, le biofilm développé sur l'anode continuait à générer un courant électrique. La pile utilisant ce microorganisme et alimentée avec de l'acétate, produisait 65 mA/m² (500 ohms). Un travail semblable qui démontre l'électroactivité des microorganismes en absence de médiateurs a été réalisé par Chaudhuri & Lovley (2003). Dans ce cas *Rhodoferax ferrireducens* est utilisé avec du glucose comme combustible ; une densité de puissance de 31 mA/m² a été obtenue avec 1000 ohms comme résistance externe.

La recherche pour élargir la variété des combustibles utilisés dans les piles a emmené à considérer les consortia naturels ainsi que effluents et les boues de stations d'épuration comme source d'inoculum. Parmi les premiers milieux naturels utilisés se trouvent les sédiments marins (Reimers et al. 2001). Une pile marine était composée par une anode implantée dans les sédiments marins et une cathode disposée dans l'eau de mer proche. Les auteurs font un bilan de la matière organique contenue dans les sédiments et indiquent que l'énergie produite pourrait être utilisée pour l'alimentation d'instruments océanographiques. Ce type de pile produisait 1,3 mW/m².

Les piles associées à la biodépollution d'effluents ont d'abord utilisé des boues initialement aérobies qui deviennent anaérobies par l'injection d'azote. Lee et al. (2003) utilisent des

boues aérobies dans une pile alimentée en continu avec de l'acétate. Des analyses ADN montrent que les populations microbiennes varient suivant le combustible ajouté. La pile alimentée avec de l'acétate présentait majoritairement des Proteobactéries. Cette pile a atteint des densités de puissance égale à 364 mW/m² avec une résistance de 500 ohms. Même si les populations microbiennes des boues aérobies peuvent devenir anaérobies, l'utilisation des populations déjà anaérobies a parfois paru plus judicieux (Kim et al., 2007) ; ces auteurs utilisent des boues anaérobies provenant d'un digesteur anaérobie secondaire. Ces études ont été menées avec deux sortes de piles, l'une à deux compartiments séparés par une membrane échangeuse de protons, l'autre d'un seul compartiment avec une cathode à air. Cette étude insiste sur l'influence du design de la pile, ainsi en utilisant de l'éthanol comme combustible, la pile à deux compartiments donne 40 mW/m² alors que la mono-compartiment atteignait 488 mW/m². Similairement aux observations de Lee et al. (2003), l'analyse des populations microbiennes a montré la présence de bactéries avec des séquences similaires à *Proteobacterium.* Les autres groupes trouvés étaient *Clostridia, Bacteroides, Flavobacteria et Sphingobacteria.*

Des sources solides des microorganismes ont été testées au cours de l'année 2007. Scott et Murano (2007) proposent une pile formée avec du fumier dans la partie anodique et de l'eau de mer de côté cathodique. La densité de puissance de cette pile sans médiateurs et sans membrane est de l'ordre de 4 mW/m². La même année, Parot et al. (2007) présentent une étude en conditions contrôlées par l'utilisation d'un potentiostat qui montre que des anodes en graphite polarisées à +0,5V/ECS (électrode de calomel saturée) implantées dans du terreau donnaient 385 mA/m² sans ajout de combustible, i.e. en utilisant uniquement la matière organique contenue dans le terreau. Grâce à un ensemble d'analyses, les auteurs démontrent que le courant produit est contrôlé par la colonisation de l'anode. Une autre source de biocatalyseurs anaérobies a été trouvée dans le rumen de vache (Rismani et al. 2007). Une pile à deux compartiments alimentée avec de la cellulose générait ainsi 55 mW/m². L'analyse des populations microbiennes montrait encore une fois que celle-ci est influencée par le combustible ajouté, de plus, les microorganismes en suspension différaient de ceux adhérés à l'anode ; *Clostridium spp*. était parmi les microorganismes adhérés, alors que *Comamonas spp*. se trouvait en suspension.

Plus récemment et après l'identification des microorganismes électroactifs dans les consortiums de boues, d'effluents et de sédiments marins, des cultures mixtes ont été

proposées comme biocatalyseurs de pile. Cependant les études de ce type sont moins nombreuses. Récemment, des travaux avec une culture binaire composée de *Geobacter sulfurreducens* et *Clostridium cellulolyticum* ont confirmé que la composition du biofilm électroactif est influencée par le type de combustible disponible. Ainsi, *G. sulfurreducens* est prédominante quand la cellulose est utilisée comme combustible, tandis que les deux microorganismes sont présents dans le biofilm en utilisant du carboxymethyl de cellulose, (Ren et al. 2008).

Le Tableau I.3 résume les diverses sources de biocatalyseur qui ont été évoqués ci-dessus.

Tableau I.3 Exemples de cultures utilisées comme biocatalyseurs pour les piles à combustible microbiennes (Liste non exhaustive)

| **Type de culture** | **Microorganismes** | **Référence** |
|---|---|---|
| Culture pure | *Shewanella putrefaciens* | Kim et al. 2002 |
| | *Geobacter sulfurreducens* | Bond & Lovley, 2003 |
| | *Rhodoferax ferrireducens* | Chaudhuri & Lovley, 2003 |
| Culture mixte | *Clostridium cellulolyticum* et *Geobacter sulfurreducens*. | Ren et al. 2008 |
| | *Proteus vulgaris, Bacillus subtilis* et *Escherichia coli* | Delaney et al. 1984 |
| Consortia | Sédiments marins | Reimers et al. 2001 |
| | Boues aérobies | Lee 2003 |
| | Boues anaérobies | Kim et al. 2007 |
| | Sol | Niessen et al. 2006 |
| | Terreau de jardin | Parot et al. 2007 |
| | Fumier | Scott & Murano, 2007 |
| | Rumen de vache | Rismani et al. 2007 |

Les piles qui utilisent une culture mixte ou un consortium comme source de biocatalyseur ont généralement une résistance plus élevée aux perturbations en cours de fonctionnement, une grande adaptabilité dans l'utilisation des combustibles et des puissances produites supérieures (Pham & Verstraete, 2006).

### I.3.2 Sélection du combustible

Le combustible doit être un composé biodégradable et non toxique pour les microorganismes. Les premières études menées sur les combustibles ont été focalisés sur les composés de faible poids moléculaire, tels que des carbohydrates comme le glucose (Chaudury & Lovley, 2005; Kim et al. 2000), des acides organiques tels que l'acétate, le propionate, le malate, le lactate et le succinate (Bond & Lovely, 2005; Holmes et al. 2004; Min & Logan, 2004), des alcools comme l'éthanol (Kim et al. 2007), ainsi que pour l'abattement simultanée des composés inorganiques tels que le sulfate (Cooney et al. 1996; Rabaey et al. 2006) ou le chrome (Li et al. 2008). Plus tard, l'intérêt pour les combustibles complexes a conduit à tester de la cellulose, des mélasses, ainsi que de la chitine (Melhuish et al. 2006; Niessen et al. 2005; Rezaei et al. 2007).

Simultanément, des études se sont développées sur la possibilité d'utiliser les déchets domestiques (Liu et al. 2004 ; Rabaey et al. 2005) ou industriels (Gil et al. 2003 ; Heilmann & Logan 2006 ; Oh and Logan, 2005 ; Rabaey et al. 2005), des déchets agricoles parfois directement issus des fermes (Min et al. 2005 ; Zuo et al. 2006 ; Scott and Murano, 2007) et même des composés récalcitrants comme la dechloration du tri-cloroethene ou la dégradation de composés phenoliques (Aulenta et al. 2008 ; Catal et al. 2008) ont été envisagés par des groupes surtout engagés dans le génie environnemental.

Les densités de puissance obtenues dans ces études sont de l'ordre de la centaine de milliWatt par mettre carré de surface d'électrode ($mW/m^2$). Dans la plupart des cas les combustibles de faible poids moléculaire ont montré de meilleures performances, néanmoins des exceptions sont rapportées, par exemple 506 $mW/m^2$ ont été obtenus avec de l'acétate (Liu et al. 2005) alors que des hydrolysats de paille de maïs ont conduit à 971 $mW/m^2$ avec le même dispositif expérimental (Zuo et al. 2006).

Il est clair que l'application des piles microbiennes est pour une grande partie tournée vers l'utilisation de combustibles complexes, étant donné la large diversité des composants organiques contenus dans les déchets industriels, particulièrement de l'industrie alimentaire et agricole.

Le Tableau I.4 récapitule les travaux de recherche dans lesquels des effluents et des déchets ont été utilisés comme source de combustible pour les piles. La diversité des conditions utilisées dans les travaux cités, rend les comparaisons difficiles. La plupart des expérimentations sont menées en piles à deux compartiments séparés par une membrane échangeuse de protons ou avec des piles mono-compartiment munies d'une cathode à air ; exceptionnellement sont utilisés des piles de forme tubulaire avec une anode en granules de graphite ; les études avec des cellules électrochimiques à trois électrodes sont également peu nombreuses. Les performances sont exprimés habituellement en mW/m² de surface apparente d'électrode, toutefois certains auteurs expriment leurs résultats par rapport au volume de l'électrolyte ou, exceptionnellement, au volume de l'anode (mW/L). La comparaison des performances des piles liées au traitement des effluents pourrait ainsi être faite par rapport au volume du réacteur ou du support, à la surface du support, ou par rapport aux débits massiques ou volumétriques par exemple.

Tableau I.4 Récapitulatif des divers systèmes de piles microbiennes qui utilisent des effluents comme source de combustible.

| Combustible | Biocatalyseur | Design de PACM | Performance | Référence |
|---|---|---|---|---|
| Effluents d'une usine de production d'amidon | Collecté sur une pile en opération pendant 3 années | Deux compartiments | 1,35 – 1,5 mA<br>9 mW/m² | Gil et al. 2003 |
| Effluents d'un décanteur primaire | Eau résiduaire urbaine | Un compartiment | 26 mW/m² | Liu et al. 2004 |
| Amidon<br>Mélasses | *C. beijerinkii*<br>*C. butyricum* | Deux piles en série. Ferricyanure comme accepteur d'électrons | 14 mW | Niessen et al. 2004 |
| Cellulose | *Clostridium cellulolyticum*<br>*Clostridium therocellum* | Cellule électrochimique.<br>Anode à +0,2V vs. Ag/AgCl | 10 mA/50 cm² | Niessen et al. 2005 |
| Effluents urbains | Effluents urbains | Deux compartiments.<br>Un compartiment. | 45 mW/m²<br>261 mW/m² | Min et al. 2005 |
| Effluents d'une industrie de céréales.<br>Effluents pré-fermentés. | Anolyte d'une pile microbienne. | Deux compartiments.<br><br>Un compartiment. | 81 mW/m²<br><br>371 mW/m² | Oh & Logan 2005 |
| Effluents d'un réacteur UASB[a] ajoutés en S et de l'acétate | Effluents du réacteur UASB | Tubulaire. Cathode à air et hexacyanoferrate | 101 mW/L NAC[b] | Rabaey et al. 2006 |
| Cellulose<br>Amidon<br>Mélasses | Sol prétraité par hautes températures | Cellule électrochimique.<br>Anode à +0,2V vs. Ag/AgCl | 40 mA/L<br>130 mA/L<br>200 mA/L | Niessen et al. 2006 |
| Hydrolysat de paille de maïs | Effluents urbains | Un compartiment | 933 – 971 mW/m² | Zuo et al. 2006 |
| Effluents d'une industrie d'emballage de viande | Effluents urbains<br>Effluents industriels | Un compartiment | 80 – 140 mW/m² | Heilmann & Logan, 2006 |
| Fumier<br>Lait | Fumier<br>*E. coli* / Bactéries de yaourt | Sans membrane<br>Avec membrane et médiateur | 4 mW/m²<br>13 mW/m² | Scott & Murano 2007 |
| Ethanol | Boues anaérobies | Deux compartiments<br>Un compartiment | 40 mW/m²<br>488 mW/m² | Kim et al. 2007 |
| Cellulose | Microorganismes du rumen de vache | Deux compartiments | 48 mW/m² | Rismani et al. 2007 |

**a** UASB Upflow anaerobic sludge blanket; **b** Net anodic compartment

### I.3.3 Température opératoire

L'augmentation de la température des piles à combustible permet d'augmenter la vitesse des réactions. La densité du courant d'échange augmente avec la température et en conséquence la surtension d'activation est réduite.

L'équation de Nernst donne la relation entre la température et le potentiel d'électrode (Equation I.9). En plus, le potentiel à circuit ouvert de la pile diminue avec la température, par contre une pile qui débite aura de meilleures performances à hautes températures (500 – 1000°C) grâce à la réduction de la surtension tant ohmique que de concentration (Larminie & Dicks, 2003).

La gamme de températures auxquelles les PACMs opèrent est limitée par les contraintes microbiennes. Une pile à combustible haute température peut atteindre des températures de 1000°C, alors qu'une pile utilisant des microorganismes, même s'ils sont thermophiles, atteint seulement environ 60°C avant de voir ses performances diminuer (Choi et al. 2004).

L'élévation des températures augmente la vitesse des réactions enzymatiques. Généralement, les microorganismes croissent plus vite lorsque la température s'élève jusqu'à une valeur optimale à partir de laquelle la vitesse de croissance diminue considérablement. La vitesse spécifique de croissance suit l'équation d'Arrhenius

$$\mu = Ae^{-\frac{Ea}{RT}} \qquad \text{Eq. I.11}$$

où

μ est la vitesse spécifique de croissance, $h^{-1}$

A une constante

Ea l'énergie d'activation des réactions biochimiques dans la cellule microbienne, J/mol

R la constant de gaz parfaits, 8,317 J/mol K

T la température, K

L'allure d'une courbe de µ en fonction de la température n'est pas symétrique (Fig I.11)

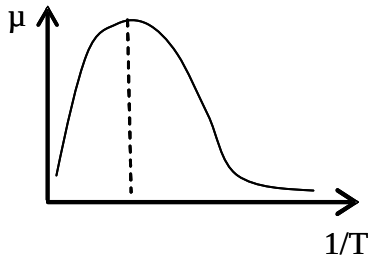



*Fig I.11 Effet de la température (T) sur la vitesse spécifique de croissance microbienne (µ). Coordonnées semi-log en µ.*

Le logarithme de µ est porté en fonction de l'inverse de la température absolue. Le graphique d'Arrhenius d'une vitesse réactionnelle donne habituellement une droite. Ici Log(µ) ne donne une droite que dans une zone limité de température. En dépassant une température limite la croissance est inhibée brusquement. L'effet de la température est beaucoup plus abrupt du côté de l'élévation de température que du refroidissement (Pelmont J. 1993).

Le calcul de l'énergie d'activation Ea d'un processus microbien donne une idée de l'étape qui limite la croissance : une valeur de Ea faible (41,86 kJ/mol) suggère que des problèmes de transfert de matière limitent la croissance microbienne. L'énergie d'activation varie de 40 – 75 kJ/mol pour des bactéries cultivées à température inférieure à la valeur optimale, i.e. du côté gauche de la courbe µ vs T; il semble que cette énergie augmente à basse température. Il est rapporté pour des bactéries provenant de sols gelés Ea = 110 kJ/mol (Price et al. 2004).

L'effet de la température sur les performances des piles microbiennes a été étudié par divers auteurs. Une approche qui n'a rien à voir avec le choix de la température de fonctionnement mérite toutefois d'être signalée ici pour son originalité, car elle utilise la température pour sélectionner certaines souches. Les sols utilisés comme source d'inoculum Niessen et al. (2006) sont soumis à un choc thermique de 110°C pendant 2h afin d'isoler des espèces productrices de l'hydrogène et de les utiliser ensuite comme inoculum.

Choi et al. (2004) ont utilisé une pile à deux compartiments pour tester deux microorganismes *Bacillus licheniformis* et *Bacillus thermoglucosidasius* à différentes températures : 30, 40, 50, 60 et 70°C. En utilisant des médiateurs, le rendement maximal a été trouvé pour les

températures de 50-60°C, alors qu'à 70°C les performances diminuent rapidement. Ces résultats ont été expliqués comme l'augmentation de la vitesse de transfert des électrons du médiateur jusqu'à l'arrêt de l'activité des microorganismes.

Liu et al. (2005) ont évalué l'effet de la température dans une pile à un seul compartiment avec une cathode abiotique utilisant l'oxygène de l'air. Des effluents urbains ont constitué à la fois la source de biocatalyseur et sans doute aussi en partie de combustible, bien que de l'acétate ait été ajouté. Les températures testées, 20 et 32°C, ont montré une réduction de la puissance avec la réduction de température de 720 $mW/m^2$ à 660 $mW/m^2$. Ces résultats sont expliqués comme dus à la réduction du potentiel de la cathode, car la température n'a pas affecté le potentiel de l'anode. Etant donné la forte dépendance de l'activité microbienne avec la température, il est surprenant que les caractéristiques de l'anode microbienne n'aient pas varié. On peut suspecter que la pile était en fait sévèrement limitée par la cinétique de la cathode.

Plus tard, Jong et al. (2006) ont conçu une pile microbienne dite « thermophile ». Ils ont utilisé une pile à deux compartiments avec l'effluent d'un digesteur anaérobie comme source de biocatalyseur et de l'acétate comme combustible. Ils ont obtenu une puissance de 1030 $mW/m^2$ avec un rendement faradique de 80% à 55°C, à ce jour la valeur la plus élevée rapportée pour des piles microbiennes.

Min et al. (2007) ont évalué la performance d'une pile à combustible à deux compartiments en utilisant des effluents domestiques comme source de biocatalyseur et de l'acétate comme combustible. La phase initiale de démarrage a été réduite de 60h à 30h avec l'augmentation de température de 22 à 30°C. Le rendement faradique a été augmenté de 8% à 43%. Les courbes de puissance ont indiqué des puissances maximales de 70, 46 et 2 $mW/m^2$ pour des piles fonctionnant à 30, 22 et 15°C respectivement. Contrairement à la recherche menée par Liu et al. (2005), les auteurs ont observé que le potentiel de la cathode a conservé la même valeur dans la gamme de température considérée.

Mathis et al. 2008 utilisant des sédiments marins à 22 et 60°C ont obtenus respectivement des densités de courant de 10-22 $mA/m^2$ et 209-254 $mA/m^2$. L'ajout d'acétate a fait augmenter la densité de courant jusqu'à 500 $mA/m^2$. La puissance maximale ainsi obtenue était de 200 $mW/m^2$ avec une densité de courant maximal de 1250 $mA/m^2$.

Il est possible de conclure que l'augmentation de la température améliore les performances des piles microbiennes sans doute par l'augmentation de la vitesse des réactions électrochimiques mais surtout par l'augmentation des vitesses liées aux métabolismes. La comparaison des différents systèmes décrits dans la bibliographie est cependant difficile étant donné la diversité des biocatalyseurs et des combustibles utilisés.

Le Tableau I.5 résume les études concernant l'effet de la température sur les performances des piles microbiennes.

Tableau I.5 Etudes portant sur l'effet de la température sur les performances des piles microbiennes

| Biocatalyseur | Combustible | Design de PACM | Température (°C) | Performance | Référence |
|---|---|---|---|---|---|
| *B. licheniformis*<br>*B. thermoglucosidasius* | 11 Sucres<br>Amidon<br>Levure | Deux compartiments<br>Use des médiateurs<br>Electrode de carbone vitreux réticulé | 30<br>40<br>50<br>60<br>70 | Meilleure entre 50 et 60°C, rapide diminution à 70°C | Choi et al. 2004 |
| Effluents urbains | Milieu nutritif ajouté en acétate | Un compartiment<br>Anode en papier carbone | 32<br>20 | 720 mW/m$^2$<br>660 mW/m$^2$ | Liu et al. 2005 |
| Effluents urbains | Acétate | Deux compartiments<br>Débit en continu<br>Electrode en feutre de graphite | 55 | 1030 ± 340 mW/m$^2$ | Jong et al. 2006 |
| Effluents urbains | Acétate | Deux compartiments<br>Anode en papier carbone | 30<br>22<br>15 | $P_{max}$ mW/m$^2$, $J_{max}$ (mA/m$^2$)<br>70 193<br>46 103<br>2 nr* | Min et al. 2007 |
| Sédiments marins | Sédiments<br><br>Acétate | Un compartiment | 22<br>60<br>60 | 10-22 mA/m²<br>209-254 mA/m²<br>$P_{max}$ 200 mW/m²<br>$J_{max}$ 500 mA/m² | Mathis et al. 2008 |

*nr Non rapporté

### I.3.4 Etat de la surface des électrodes

Plusieurs travaux ont tenté d'améliorer les cinétiques de transfert d'électrons en modifiant la surface des électrodes. Des tentatives de modifications électrochimiques de la surface d'une électrode ont été décrites par Scott et al. (2007). Ils ont créé à la surface d'électrodes en feutre de graphite des groupes quinones destinés à former des sites actifs pour améliorer le transfert électronique avec les cellules microbiennes.

Les effets de la concentration et du type de catalyseur ont aussi été étudiés sur des anodes, essentiellement sur des cas spécifiques. Certaines piles ne mettent pas en œuvre des transferts direct entre cellules microbiennes et électrodes, mais utilisent des microorganismes capables de produire de l'hydrogène. Dans ce cas, le problème de la catalyse de l'oxydation de l'hydrogène sur l'anode reste entier et il est nécessaire d'utiliser des catalyseurs métalliques tels que le platine. Cheng et al. (2006) diminuent la charge de platine d'un facteur cinq, avec une réduction de la performance de seulement 1,2. D'autres auteurs proposent un catalyseur CoTMPP (cobalt tétraméthylphénylporphyrine) comme substitut du platine. Niessen et al. (2004) utilisent des polyanilines fluorées pour modifier la surface de l'anode et protéger le platine de la pollution chimique et microbienne. Dans le même groupe de recherche Rosenbaum et al. (2007) ont évalué le carbure de tungstène comme catalyseur d'anode.

A notre connaissance, beaucoup moins d'études ont tenté d'améliorer l'adhésion des biofilms microbiens sur les électrodes. Cheng & Logan (2007) ont proposé un traitement d'une anode en tissu de carbone par de l'ammoniac. Ils obtiennent une augmentation de la charge électrostatique de la surface qui améliore l'adhésion microbienne et augmente les performances de la pile. Cette amélioration est expliquée par l'augmentation de l'adhésion bactérienne qui a lieu dès le démarrage de la pile couplée à l'augmentation de la vitesse des transferts d'électrons. Liu et al. (2007) prétraitent l'anode d'une pile marine par oxydation électrochimique en milieu acide sulfurique. Les auteurs observent que la distribution de la flore constituant le biofilm sur l'anode est remarquablement modifiée.

## I. 4 Conclusions

Le développement des piles à combustible microbiennes s'appuie largement sur les méthodes et les savoir-faire mis au point pour les piles à combustible traditionnelles. Les piles microbiennes commencent à investir le domaine des biotechnologies pour le traitement des effluents. De cette revue bibliographique, nous pouvons conclure que la diversité des sources de combustibles qui peuvent provenir des industries alimentaires et agricoles est loin d'être complètement appréhendée en vue de leur valorisation dans les piles microbiennes. De nombreuses sources potentielles de microorganismes électroactifs restent aussi à être exploitées et, le cas échéant valorisées, par des cultures mixtes.

## I.5 Références

Aceves-Lara CA, Latrille E, Buffiere P, Bernet N, Steyer JP (2008) Experimental determination by principal component análisis of a reaction pathway of biohydrogen production by anaerobic fermentation. *Chem. Eng. Process*. 47: 1968-1975.

Aulenta F, Canosa A, Reale P, Rossetti S, Panero S, Majone M (2008) Microbial reductive dechlorination of trichloroethene to ethene with electrodes serving as electron donors without the external addition of redox mediators. *Biotechnol. Bioeng.* doi 10.1002/bit.22234

Bergel A, Féron D, Mollica A (2005) Catalysis of oxygen reduction in PEM fuel cell by seawater biofilm. *Electrochem. Commun*. 7:900-904.

Beyenal H, Lewandowski Z (2005) Modelling mass transport and microbial activity in stratified biofilms. *Chem. Engin. Sc.* 60:4337-4348.

Biffinger J, Ringeisen B (2008) Engineering microbial fuel cells: Recent patents and new directions. *Recent Patents Biotechnol*. 2:150-155.

Bond DR, Lovely DR (2003) Electricity production by *Geobacter sulfurreducens* attached to electrodes. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(3):1548-1555

Bond DR, Lovley DR (2005) Evidence for involvement of an electron shuttle in electricity generation by *Geothrix fermentans. Appl. Environ. Microbiol*. 71( 4):2186-2189.

Catal T, Fan Y, Li K, Bermek H, Liu H (2008) Effects of furan derivatives and phenolic compounds on electricity generation in microbial fuel cells. *J. Power Sources.*

180:162-166.

Chang IS, Hyunsoo M, Orianna B, Jae KJ, Ho IP, Kenneth HN, Byung HK (2006). Electrochemically Active Bacteria (EAB) and Mediator-Less Microbial Fuel Cells. *J. Microbiol. Biotechnol*. 16(2):163-177.

Chauduri SK, Lovely DR (2003) Electricity generation by direct oxidation of glucose in mediatorless microbial fuel cells. *Nature Biotechnol*. 21(10):1229-1232.

Cheng S, Liu H, Logan B (2006) Power densities using different cathode catalyst (Pt and CoTMPP) and polymer binders (Nafion and PTFE) in single chamber microbial fuel cells. *Environ. Sci. Technol*. 40(1): 364-369.

Cheng S, Logan BE (2007) Ammonia treatment of carbon cloth anodes to enhance power generation of microbial fuel cells. *Electrochem. Commun*. 9:492-496.

Choi Y, Jung E, Park H, Paik S, Jung S, Kim S (2004) Construction of microbial fuel cells using thermophilic microorganism, *Bacillus licheniformis and Bacillus thermoglucosidasius. Bull. Korean Chem. Soc*. 25(6):813 - 818.

Cooney MJ, Roschi E, Marison IW, Comninellis Ch, Stockar U (1996) Physiological studies with the sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio desulfuricans*: evaluation for use in a biofuel cell. *Enzyme Microbial Technol*. 18:358-365.

Delaney GM, Benetto HP, Mason JR, Roller SD, Stirling JL, Thurston CF (1984) Electron-transfer coupling in microbial fuel cells – 2. Performance of fuel cells containing selected microorganisms-mediator-substrate-combinations. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 34:13.

Gil G, Chang I, Kim B, Kim M, Jang J, Park H, Kim H (2003) Operational parameters affecting the performance of a mediator-less microbial fuel cell. *Biosens. Bioelectron*. 18:327-334.

Gorby Y, et al. (2006) Electrically conductive bacterial nanowires produced by *Shewanella oneidensis* strain MR-1 and other microorganisms. *PNAS*. 103(30):11358-11363

Grzebyk M, Pozniak G (2005) Microbial fuel cells (MFCs) with interpolymer cation exchange membranes. *Sep. Purif. Technol*. 41:321-328.

Heilmann J, Logan B (2006) Production of electricity from proteins using a microbial fuel cell. *Water Environ. Res*. 78(5):531-537.

Holmes DE, Bond DR, Lovely DR (2004) Electron transfer by *Desulfobulbus propionicus* to Fe (III) and graphite electrodes. *Appl. Environ. Microbiol*. 70(2):1234-1234.

Hoogers G (2003) "Fuel Cell Technology Handbook". CRC Press. Boca Raton.

Jong BC, Kim BH, Chang IS, Ying L, Pauline W, Choo YF, Kang GS (2006) Enrichment,

performance, and microbial diversity of a thermophilic mediatorless microbial fuel cell. *Environ. Sci. Technol*. 40:6449 - 6454.

Kim HJ, Park HS, Hyun MS, Chang IS, Kim M, Kim BH (2002) A mediator-less microbial fuel cell using a metal reducing bacterium *Shewanella putrefaciens*. *Enzyme Microbial Technol*. 30:145-152.

Kim JR, Jung SH, Regan B, Logan B (2007) Electricity generation and microbial community analysis of alcohol powered microbial fuel cells. *Bioresour. Technol*. 98:2568-2577.

Kim N, Choi Y, Jung S, Kim S (2000) Effect of initial carbon sources on the performance of microbial fuel cells containing *Proteus vulgaris*. *Biotechnol. Bioeng*. 70(1):109-114.

Larminie J, Dicks A (2003) "Fuel Cell Systems Explained" 2nd ed. Wiley Inc. England. 406p.

Lee J, Phung N, Chang I, Kim B, Sung H (2003) Use of acetate for enrichment of electrochemically active microorganisms and their 16S rDNA analyses. *FEMS Microbiol. Lett*. 223:185-191.

Li Z, Zhang X, Lei L (2008) Electricity production during the treatment of real electroplating wastewater containing Cr+6 using microbial fuel cell. *Process Biochem*. 43:1352-1358.

Liu H, Logan BE (2004a) Electricity generation using an air-cathode single chamber microbial fuel cell in the presence and absence of a proton exchange membrane. *Environ. Sci. Technol*. 38(14):4040-4046.

Liu H, Ramnarayanan R, Logan BE (2004b) Production of electricity during wastewater treatment using a single chamber microbial fuel cell. *Environ. Sci. Technol*. 38(7):2281-2285.

Liu H. Cheng S. Logan BE (2005) Production of electricity from acetate or butyrate using a single-chamber microbial fuel cell. *Environ. Sci. Technol*. 39(2): 658-662.

Liu JL, Lowy DA, Baumann RG, Tender LM (2007) Influence of anode pretreatment on its microbial colonization. *J. Appl. Microbiol.* 102:177-183.

Logan B (2005) Simultaneous wastewater treatment and biological electricity generation. *Water Sci. Technol.* 52(1-2):31-37.

Logan B, Hamelers B, Rozendal R, Schröder U, Keller J, Freguia S, Aelterman P, Verstraete W, Rabaey K (2006) Microbial fuel cells: Methodology and technology. *Environ. Sci. Technol*. 40:5181-5192.

Logan B, Regan J (2006) Electricity-producing bacterial communities in microbial fuel cells. *Trends Microbiol.* 14(12):512-518.

Lovley DR (2008) The microbe electric: conversion of organic matter to electricity. *Current OpinionBiotechnol*. 19:564-571.

Mathis BJ, Marshall CW, Milliken CE, Makkar RS, Creager SE, May HD (2008) Electricity generation by thermophilic microorganisms from marine sediment. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 78:147-155.

Melhuish C, Ieropoulos I, Greenman J, Horsfield I (2006) Energetically autonomous robots: Food for thought. *Auton. Robot*. 21(3):187-198.

Min B, Cheng S, Logan BE (2005) Electricity generation using membrane and salt bridge microbial fuel cells. *Water Res.* 39:1675-1686.

Min B, Logan BE (2004) Continuous electricity generation from domestic wastewater and organic substrates in a flat plate microbial fuel cell. *Environ. Sci. Technol.* 38(21):5809-5814.

Min B, Roman O, Angelidaki I (2007) Effect of temperature and anodic medium on power generation in microbial fuel cells (MFCs). 11th IWA World Congress on Anaerobic Digestion. Brisbane, Australia.

Niessen J, Harnisch F, Rosenabaum M, Schröder U, Scholz F (2006) Heat treated soil as convenient and versatile source of bacterial communities for microbial electricity generation. *Electrochem. Commun*. 8:869-873.

Niessen J, Schröder U, Harnisch F, Scholz F (2005) Gaining electricity from in situ oxidation of hydrogen produced by fermentative cellulose degradation. *Lett. Appl. Microbiol*. 41:286-290.

Niessen J, Schröder U, Rosenbaum M, Scholz F (2004) Fluorinated polyanilines as superior materials for electrocatalytic anodes in bacterial fuel cells. *Electrochem. Commun*. 6:571-575.

Oh SE, Logan B (2005) Hydrogen and electricity production from a food processing wastewater using fermentation and microbial fuel cell technologies. *Water Res*. 39:4673-4682.

Park DH, Laivenieks M, Guettler MV, Jain MK, Zeikus JG (1999) Microbial utilization of electrically reduced neutral red as the sole electron donor for growth and metabolite production. *Appl. Environ. Microbiol*. 65(7):2919-2917.

Park DH, Zeikus JG (2002) Impact of electrode composition on electricity generation in a single-compartment fuel cell using *Shewanella putrefaciens*. *Appl. Environ. Microbiol*. 59:58-61.

Parot S, Delia ML, Bergel A (2008a) Forming electrochemically active biofilms from garden compost under chronoamperometry. *Bioresour. Technol*. 99:4809-4816.

Pelmont J (1993) Bactéries et Environnement. Adaptations physiologiques. Presses Collection Grenoble Sciences. Universitaires de Grenoble.

Pham TH, Rabaey K, Aelterman P, Clauwaert P, De Schamphelaire, Boon N, Verstraete W(2006) Microbial fuel cells in relation to conventional anaerobic digestion technology. *Eng. Life Sci*. 6(3):285-292.

Price BP, Sowers T (2004) Temperature dependence of metabolic rates for microbial growth, maintenance, and survival. *PNAS*. 101(13):4631-4636.

Rabaey K, Boon N, Siciliano SD, Verhaege M, Verstraete W (2004) Biofuel cells select for microbial consortia that self-mediate electron transfer. *Appl. Environ. Microbiol*. 70(9):5373-5382.

Rabaey K, Clauwaert P, Aelterman P, Verstraete W (2005) Tubular microbial fuel cells for efficient electricity generation. *Environ. Sci. Technol*. 39(20):8077-8082.

Rabaey K, Van de Somperl K, Magnien L, Boon N, Aelterman P, Caluwaert P, De Schamphelaire L, Pham H, Vermeulen J, Verhaege M, Lens P, Verstraete W (2006) Microbial fuel cells for sulfide removal. *Environ. Sci. Technol*. 40(17):5218-5224.

Rabaey K, Verstraete W (2005) Microbial fuel cells: novel biotechnology for energy generation. *TRENDS in Biotechnology*. 23(6):291-298.

Reimers CE, Tender LM, Fertig S, Wang Wei (2001) Harvesting energy from the marine sediment-water interface. *Environ. Sci. Technol*. 35(1):192-195.

Ren Z, Steinberg LM, Regan JM (2008) Electricity production and microbial biofilm characterization in cellulose-fed microbial fuel cells. *Water Sci. Technol*. 58(3):617-622.

Rezaei F, Richard TL, Brennan RA, Logan BE (2007) Substrate-Enhanced microbial fuel cells for improved remote power generation from sediment-based systems. *Environ. Sci. Technol*. 41:4053-4058.

Ringeisen BR, Ray R, Little B (2007) A miniature microbial fuel cell operating with an anaerobic chamber. *J. Power Sources.* 165:591-597.

Rismani-Yazid H, Christy AD, Dehority BA, Morrison M, Yu Z, Tuovinen OH (2007) Electricity generation from cellulose by rumen microorganisms in microbial fuel cells. *Biotechnol. Bioeng*. 97(6):1398-1407.

Rismani-Yazid H, Christy AD, Dehority BA, Morrison M, Yu Z, Tuovinen OH (2007) Electricity generation from cellulose by rumen microorganisms in microbial fuel cells. *Biotechnol. Bioeng*. 97(6):1398-1407.

Rohads A, Beyenal H, Lewandowsky Z (2005) Microbial fuel cell using anaerobic respiration as an anodic reaction and biomineralized manganese as a cathodic reactant. *Environ. Sci. Technol*. 39(12):4666-4671.

Rosenbaum M, Zhao F, Quaas M, Wulff H, Schroder U, Scholz F (2007) Evaluation of catalytic properties of tungsten carbide for the anode of microbial fuel cells. *Appl. Catal*. 74:262-270.

Saval S, Noyola A (1992) Aportaciones de la Biotecnologia al Tratamiento Anaerobio de Aguas Residuales. *Revista de la SMBB, A.C.* 2(5/6):155-172.

Schröder U (2007) Anodic electron transfer mechanisms in microbial fuel cells and their energy efficiency. *Phys. Chem. Chem. Phys*. 9:2619-1629.

Schröder U, Niessen J, Scholz F (2003) A generation of microbial fuel cells with current outputs boosted by more than one order of magnitude. *Angew. Chem*. 115:2986- 2989.

Scott K, Murano C (2007) Microbial fuel cells utilising carbohydrates. *J. Chem. Technol. Biotechnol*. 82:92-100.

Scott K, Murano C, Rimbu GA (2007) A tubular microbial fuel cell. *J. Appl. Electrochem*. 37:1063-1068.

Sell D (1990) Bioelectrochemical fuel cells. Dans: "Biotechnology". Rehm HJ, Reed G, Püler A, Stadler P eds. 2ème ed. Wiley – VCH. NY.

Srikanth S, Marsili E, Flickinger MC, Bond DR (2008) Electrochemical characterization of *Geobacter sulfurreducens* cells immobilized on graphite paper electrodes. *Biotechnol. Bioeng.* 99(5):1065-1073.

Tanaka K, Vega C, Tamamushi R (1983) 612 bis-Thionine and ferric chelate compounds as coupled mediators in microbial fuel cells. *J. Electroanal. Chem*. Section Bioelectrochemistry and Bioenergetics. 156(11):289-297.

Torres CI, Marcus KA, Rittmann BE (2007) Kinetics of consumption of fermentation products by anode-respiring bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. doi: 10.1007./s00253-007-1198-z

Wang X, Feng YJ, Lee H (2007) Electricity production from beer brewery wastewater using single chamber microbial fuel cell. 11th IWA World Congress on Anaerobic Digestion. 23-27 September. Brisbane, Australie.

Wingard LB, Shaw ChH, Castner JF (1982) Bioelectrochemical fuel cells. *Enzyme Microbial Technol*. 4:137-146.

Zuo Y, Maness P, Logan B (2006) Electricity production from steam-exploded corn stover biomass. *Energy Fuels*. 20:1716-1721.

# CHAPITRE II

# Matériel et méthodes

II.1 Sources de biocatalyseurs 44
II.1.1 Terre de bruyère 44
II.1.2 Terreau de jardin et lixiviats de terreau 44
II.1.3 Boues anaérobies 46

II.2 Combustibles 47
II.2.1 Jus de pommes fermenté 47
II.2.2 Lies de vin 47
II.2.3 Déchets de l'industrie laitière 47
II.2.4 Rejets de lavage de l'industrie laitière 48

II.3 Etudes potentiostatiques 49
II.3.1 Montage expérimental 49
II.3.2 Techniques électrochimiques 50
II.3.3 Conditions particulières pour les expériences en cellule 50
II.3.3.1 Détermination de l'électroactivité microbienne 50
II.3.3.2 Anodisation du feutre de graphite 51
II.3.3.3 Adsorption des résidus laitiers sur l'anode 51
II.3.3.4 Essais à température contrôlée 51

II.4 Etudes en pile à combustible microbienne 52
II.4.1 Montage expérimental 52
II.4.2 Méthodes de suivi de la pile 53

II.5 Techniques d'analyse chimique 55
II.5.1 Demande chimique en oxygène DCO 55
II.5.2 Carbone organique total COT 56
II.5.3 Méthode de Lowry pour le dosage des protéines 56
II.5.4 pH et Conductivité 56
II.5.5 Microscopie électronique à balayage (MEB) 56
II.5.6 Détermination enzymatique de lactose et galactose 57

II.6 Références 57
Annexe 58

Ce chapitre décrit les matériaux utilisés comme source de biocatalyseurs ou inoculum, ainsi que les déchets des industries agro-alimentaires testés comme combustibles ou substrats. Les montages utilisés et les diverses techniques électrochimiques sont ensuite décrits et finalement le chapitre détaille les stratégies d'optimisation et les diverses techniques d'analyse chimique et biochimique des systèmes.

## II.1 Sources de biocatalyseurs

### II.1.1 Terre de bruyère

La terre de bruyère a été choisie comme possible source de microorganismes pour son pH plus acide que celui du terreau de jardin. La terre de bruyère de marque EcoTerre a été achetée dans une jardinerie.

| | |
|---|---|
| Norme | NFU 44-551 |
| Composition | Mélange de tourbe brune et blonde de sphaignes, écorces de résineux compostées, perlite. |
| Analyse | Matière sèche/ Masse de produit brut, 29%<br>Matière organique/ Masse de produit sec, 70%<br>pH 5,2<br>Conductivité 22 mS/m<br>Capacité de rétention pour l'eau, 67% |

L'évaluation de l'électroactivité des microorganismes a été réalisée par chronoampérométrie avec un mélange de 0,6 L de terre de bruyère et 1 L de solution NaCl 10 mM. Le pH du mélange était dans l'intervalle 5,13 – 5,57.

### II.1.2 Terreau de jardin et lixiviats de terreau

Le terreau de jardin de marque Eco-Terre a été acheté dans une jardinerie. Ses caractéristiques sont les suivantes :

| | |
|---|---|
| Norme | NFU 44-551 |
| Composition | Tourbe blonde, écorces compostées, lombricompost, terreau végétal |
| Analyse | Matière sèche 55%<br>Matière organique 50% de matière sèche<br>pH 7.5<br>Conductivité 0.9 mS/cm<br>Capacité de rétention d'eau 625 mL/L de substrat |

L'évaluation de l'électroactivité microbienne a été réalisée par chronoampérométrie avec un mélange de 0,6 L de terreau et 1 L de solution NaCl 10 mM, dont le pH final était de 6,7.

Toutes les études potentiostatiques, ainsi que les études en pile microbienne, ont été effectuées avec du lixiviat de terreau. Le lixiviat de terreau a été préparé à partir d'un mélange de 1 L de terreau avec une solution de NaCl 10 mM qui complétait à 3L de volume final. Le mélange a été placé dans un erlenmeyer de 2 ou 3 L et agité pendant 24 h avec un barreau magnétique. Ensuite, le mélange a été filtré à-travers un tissu de feutre et le filtrat a été stocké dans des flacons de culture de 500 mL.

Pour l'évaluation préliminaire des biocatalyseurs en pile à combustible microbienne, les lixiviats de terreau ont été complétés avec 1 g/L d'acétate de sodium et conservés pendant 20 jours à température ambiante en flacons de 1L avant d'être utilisés. Le pH de ces suspensions était dans l'intervalle 6,48 – 6,62.

De façon générale, l'acclimatation de l'inoculum aux combustibles a été réalisée par l'ajout dans 500 mL d'inoculum, de 1 mL de combustible deux fois par semaine pendant une période de 30 jours. L'ajout de substrat est ensuite suspendu pendant un mois, et l'inoculum est utilisé dans les essais en pile.

Une étude spécifique de l'effet de l'acclimatation du lixiviat de terreau a été réalisée en régime potentiostatique. La suspension de lixiviat a été distribuée dans 5 flacons de 100 mL, lesquels ont constitué *a posteriori* les cellules électrochimiques. Au début (t = 0 heure), 300 µL de substrat ont été ajoutés dans chacun des 5 flacons, et un flacon a été pris pour réaliser le test électrochimique sous potentiel imposé. Les 4 autres flacons ont été conservés à température ambiante. Après 3 jours (t = 72 heures), le substrat a été ajouté à nouveau dans les 4 flacons et l'un entre eux a été utilisé pour effectuer le test électrochimique. Cette procédure a été répétée pour les tests à 44, 216 et 312 heures.

### II.1.3 Boues anaérobies

Les boues activées ont été collectées dans le bassin de traitement aérobie de la station d'épuration de Brax (près de Toulouse). Ces boues ont été conservées pendant environ 2 mois dans de l'eau résiduaire synthétique contenant essentiellement du Viandox® (stimulant de goût basée en extrait de viande et levure). 200 mL de boues sont mélangées avec 800 mL d'eau résiduaire synthétique dans des flacons de 1L complètement remplis. Le pH final était de 6,32.

L'eau résiduaire synthétique est une dilution 1:200 de la solution composé par : Viandox® (500 mL), de l'eau distillée (500 mL) et $NH_4Cl$ (4.5 g/L). L'eau résiduaire synthétique a une DCO 486±157 mg/L. La solution de Viandox® fournit principalement de l'extrait de levure, du sucre, du glutamate de sodium, de l'acide citrique et de l'acide lactique.

Certaines expériences ont utilisé des boues provenant d'un réacteur pilote utilisé pour tester l'utilisation de membranes immergées couplées à une aération pulsée pour le traitement des eaux urbaines (Dr. Claire Albasi, Laboratoire de Génie Chimique). Les boues ont été conservées en anaérobioses en flacons de culture de 500 mL avec de l'eau résiduaire synthétique. Les boues ont été stockées à température ambiante et le milieu a été périodiquement renouvelé avec la solution d'eau résiduaire urbaine synthétique.

L'acclimatation des boues aux combustibles a été effectuée par l'ajout journalier de 1 mL de chaque combustible aux boues contenues dans les flacons de 500 mL pendant 15 jours. Les boues ont été utilisées un mois après le dernier ajout pour les tests de piles.

## II.2 Combustibles

### II.2.1 Jus de pommes fermenté

Les lixiviats de pommes ou jus de pomme fermenté ont été préparés à partir de pommes type Braebrun cal 65/75, origine Montauban (France). Deux kilogrammes de pommes ont été coupés en morceaux d'environ 0.5 cm à l'aide d'un robot ménager. Un volume de 500 mL d'une solution tampon a été ajouté afin de faciliter le hachage des pommes. La solution tampon à pH 7,4 était composée par (g/L) : KCl 0,1 ; NaCl 2,9 ; $NaH_2PO_4$ 0,6 ; $NaHCO_3$ 2 (Bond & Lovley, 2003). Le jus obtenu a été mis à fermenter pendant 15 jours dans un réservoir fermé hermétiquement et conservé à température ambiante. Les morceaux de pommes étaient retenus par une grille qui permettait de récupérer le liquide constituant une sorte de lixiviat de pommes. Ce jus de pommes fermenté a été placé dans des flacons de 500 mL conservés à 3°C. Le pH des lixiviats était 3,55.

### II.2.2 Lies de vin

Les lies de vin ont été fournies par le Laboratoire de Chimie Agro-industrielle (LCA) de Toulouse. Une densité de 1,027 g/mL et un pH de 3,21 ont été déterminés à leur arrivée. Elles ont été conservées en bouteilles plastiques à 3°C ou en congélation pour leur usage à court ou long terme.

### II.2.3 Déchets de l'industrie laitière

Les déchets de laiterie ont été fournis par l'industrie 3A de Toulouse qui produit des yaourts et différents produits laitiers. Les déchets fournis étaient constitués du jus collecté au niveau du procédé de pressage (compacteur) de la ligne de production de yaourts. Ces déchets nommés DIB (déchets industriels banals) au sein de la société ont été fournis en trois occasions différentes, l'aspect et la composition différant d'un lot à l'autre. Les déchets ont été conservés en bouteilles plastiques à 3°C ou en congélation selon que leur usage était à

court ou long terme. Ils présentaient une conductivité d'environ 6 mS/cm et un pH de l'ordre de 3,6 à leur arrivée.

L'évaluation de l'électroactivité microbienne à été effectuée avec des résidus concentrés. Des évaluations en pile ont été réalisés avec des résidus concentrés après congélation, des résidus concentrés reçus récemment dilués ou non, suivant les indications données dans la description des différentes expérimentations. Lorsque cela est indiqué, par exemple pour les expériences d'optimisation de la concentration du combustible, des dilutions de 20, 50, 100 et 200 fois ont été réalisées avec une solution phosphate/NaCl composée de (g/L) : $Na_2HPO_4$ 2,75 ; $NaH_2PO_4$ 3,67 ; NaCl 0,584, tamponnée à pH 6,7 (Min & Logan 2005).

### II. 2.4 Rejets de lavage de l'industrie laitière

L'industrie laitière citée dans le paragraphe précédent nous a aussi fourni des effluents issus du procédé de lavage de la ligne de production. La totalité des effluents a été fournie en une seule fois. De même que les matériaux précédents, ces effluents ont été conservés en bouteilles plastiques à 3°C ou en congélation. Les rejets avaient des demandes chimiques en oxygène (DCO) de 2000 mg/L et un pH de 12 à leur arrivée. La caractérisation des combustibles bruts ou dilués est reportée dans le Tableau II.1

Tableau II.1 Caractérisation des combustibles pour les études potentiostatiques et en pile.

| Combustible | DCO[a] (mg/L) | Conductivité[a] mS/cm | pH[a] | Dilution[b] | DCO[b] (mg/L) | Conductivité[b] (mS/cm) | pH[b] |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Jus de pommes fermentés | 52 514 ± 19 926 | 4,20 | 4,0 | 1:20 | 3 501 ± 2 510 | 4,77 | 6,1 |
| Lies de vin | 349 250 ± 39 527 | 1,45 | 3,7 | 1:20 | 10 843 ± 3 904 | 5,12 | 6,1 |
| Déchets de laiterie | 136 542 ± 37 983 | 4,82 | 4,0 | 1:20 | 8 169 ± 2 568 | 4,53 | 6,2 |
| Rejets de lavage | 2000[c] | 1,56 | 12,9 | - | | - | - |

[a] Matière brute sans dilution [b] Dilutions utilisées dans les essais en piles [c] Sans dilution.

## II.3 Etudes potentiostatiques

### II.3.1 Montage expérimental

Les études potentiostatiques ont été menées dans des cellules électrochimiques à trois électrodes. Des réservoirs en plastique de volume total 130 mL ou 200 mL (volume utile 100 et 150 mL respectivement) ont été utilisés comme cellules. Les couvercles ont été perforés afin d'introduire les trois électrodes. Les électrodes de travail testées étaient de type DSA (Dimensionally Stable Anode, ECS International), des plaques de graphite (C 000350 Goodfellow) et de feutre de graphite (Carbone Lorraine, RVG, avec une surface spécifique de 0,119 g/cm$^3$).

Nous avons choisi le feutre de graphite car des tests électrochimiques préliminaires ont indiqué qu'il donne de faibles courants capacitifs et sa structure laisse espérer qu'il favorisera la colonisation par les biofilms microbiens. Les dimensions des électrodes sont généralement 2 x 2 cm ou 2 x 5 cm, avec une épaisseur de 0,5 cm ou 1,0 cm. La contre-électrode était une grille de platine (Platecxis) de dimensions 2 x 2 cm ou 2 x 5 cm. L'électrode de référence était soit une électrode à calomel saturée (ECS) soit une électrode Ag/AgCl préparée comme suit : un fil d'argent de 2 mm de diamètre et d'une longueur entre 10 et 15 cm plongé dans une solution de $HNO_3$ 36%, puis dans une solution de KCl saturée. Les connexions externes ont été assurées par une tige de titane pour les électrodes de travail et par un fil de platine pour les contre-électrodes. Les électrodes ECS ont été connectées directement au potentiostat. La Fig II.1 donne un schéma des cellules électrochimiques utilisées.

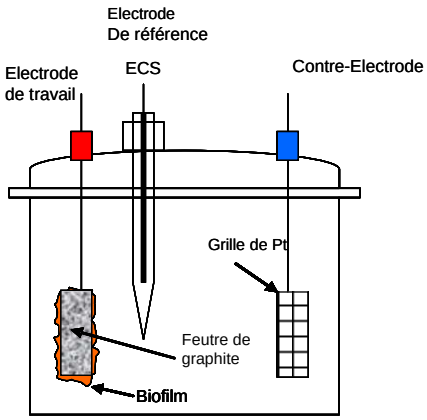



*Fig II.1 Schéma du montage expérimental utilisé pour les études potentiostatiques.*

### II.3.2 Techniques électrochimiques

La chronoampérométrie suit l'évolution du courant dans le temps lorsqu'un potentiel est imposé à l'électrode de travail. Les résultats sont présentés en termes d'évolution de la densité de courant J ($mA/m^2$) en fonction du temps. La densité de courant est calculée par rapport à l'aire géométrique de l'électrode de travail. Les potentiels ont été imposés entre -0,1 V/ECS et +0,7 V/ECS selon les essais.

La voltammétrie cyclique consiste à faire varier le potentiel de l'électrode avec une vitesse linéaire entre deux limites fixes. Les densités de courant J générées par les réactions redox qui ont lieu sur l'électrode sont reportées en fonction du potentiel (E), ce qui donne les courbes appelées voltampérogrammes ou voltammogrammes. Les profils densités de courant-potentiels sont le résultat de combinaisons complexes entre les cinétiques redox qui peuvent impliquer des composés adsorbés et des composés en solution et les phénomènes de transfert de matière. La vitesse de balayage de 10 mV/s a été utilisée dans tous les tests. Au début des travaux les limites inférieure et supérieure de potentiel étaient -0,6 V/ECS et +0,7 V/ECS, plus tard elles ont été standardisées à -1,0 V/ECS et +0,1 V/ECS.

L'ensemble des manipulations a été mené avec des potentiostats multicanaux de type SVP (BioLogic Science Instruments, SA) piloté par le logiciel EC/Lab 2.0.

### II.3.3 Conditions particulières pour les expériences en cellule électrochimique

#### II.3.3.1 Détermination de l'électroactivité microbienne

La détermination de l'électroactivité microbienne dans les jus de pomme fermentés, lies de vin, déchets de laiterie a été réalisée dans un environnement anaérobie. Ces conditions ont été obtenues par un bullage préliminaire d'azote dans l'électrolyte pendant 15 min et un flux continu d'azote dans l'espace de tête de la cellule pendant les tests. Le bullage d'azote n'a pas été nécessaire lors de l'évaluation des sources de biocatalyseurs, car ils étaient déjà en conditions anaérobies. Lorsque cela est indiqué une solution saline de NaCl 10 mM a été

ajoutée afin d'assurer une conductivité suffisante. Les tests sont systématiquement effectués en double.

### II.3.3.2 Anodisation du feutre de graphite

L'anodisation de l'anode en feutre de graphite a été réalisée dans le but de la rendre plus hydrophile et en espérant obtenir ainsi un état de surface contrôlé qui améliore la reproductibilité des résultats. Cette anodisation a été effectuée conformément à une procédure décrite précédemment (Lai E. 2000) en imposant un potentiel de +1,5 V/ECS pendant 2 min à l'électrode dans la solution de NaCl/phosphate (décrite dans la section II.2.3) suivi d'une voltammétrie cyclique à 30 mV/s entre les bornes -1,0 V/ECS à +1,0 V/ECS. Cette procédure a été répétée 5 fois.

### II.3.3.3 Adsorption des résidus laitiers sur l'anode

Une forme de prétraitement de l'anode a consisté en l'adsorption de résidus laitiers sur l'électrode. Le feutre de graphite placé dans 150 mL de résidus laitiers a été soumis à sonication pendant 10 min, puis à 5 min de sonication dans 500 mL d'eau distillée (sonicateur Transsonic 950/H 35 kHz, ProLabo Allemagne).

### II.3.3.4 Essais à température contrôlée

Les essais à différentes températures ont été réalisés en plaçant les cellules électrochimiques dans un bain d'eau de température contrôlée par un Polystat (Modèle I. 33194. Bioblock Scientific). Les électrodes ECS (Radiometer Analytical S.A. Alsace, France) ont des limites d'opératoires entre -10°C et 60°C, ce qui était convenable pour les expériences menées à 10°C, 30°C, 40°C, 50°C et 60°C.

## II.4 Etudes en pile à combustible microbienne

### II.4.1 Montage expérimental

La pile à combustible microbienne était constituée de deux compartiments unis au-travers d'une membrane, de façon identique au design utilisé par Min & Logan (2005). Des flacons en verre contenant 500 mL d'électrolyte était munis d'un tube latéral en verre disposant d'un rodage qui permettait l'ajutage de deux flacons et le maintien d'une membrane échangeuse de protons entre les deux. L'étanchéité de l'union était assurée par un joint de silicone. La membrane échangeuse de protons (Ultrex, CMI-7000 Membranes International, Inc., USA) avait un diamètre de 3 cm; elle était prétraitée avant son utilisation par immersion dans une solution de NaCl 2% pendant 24 h. Les couvercles des flacons ont été perforés afin d'introduire les connexions des électrodes, tige de titane pour l'anode et fil de platine pour la cathode, ainsi que les électrodes de référence Ag/AgCl.

Dans certaines expériences un bullage d'azote a été assuré dans le compartiment anodique, et/ou d'air dans le compartiment cathodique à travers des frittés qui assurent la dispersion de très fines bulles. L'azote était issu de la ligne de distribution générale du laboratoire, l'air était apporté par une pompe d'aquarium avec 1 – 2,5 LPM (Rena 101, 5W, 50 Hz). Dans certains tests, l'anolyte et le catholyte ont été sous agitation à 350 tour/minute grâce à un barreau magnétique de 2 cm de longueur et 0,8 cm d'épaisseur. Un schéma de la pile est donné sur la Fig II.2.

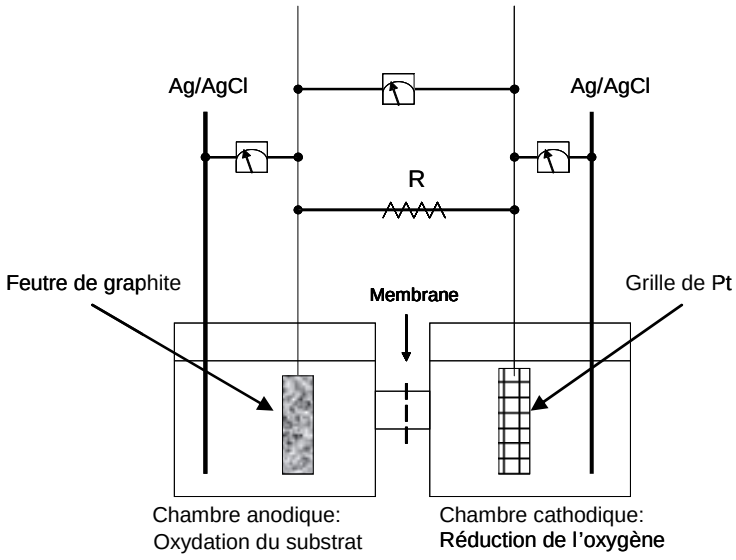



*Fig II.2 Schéma de la pile à combustible microbienne.*

### II.4.2 Méthodes de suivi de la pile

La tension de la pile et le potentiel de chaque électrode, anode et cathode, ont été suivis avec un multimètre (Integra series 2700, Keithley Instruments, Inc. USA) piloté par un ordinateur. En cours de fonctionnement le circuit électrique des piles est généralement fermé par une résistance externe de 1000 ohms ou de valeur différente suivant les indications. La tension de la pile U (V) en circuit ouvert ou en circuit fermé a été enregistrée en fonction du temps par intervalles de 1 h. La densité de courant J ($A/m^2$) a été calculée suivant :

$$J = \frac{U}{R \cdot A} \qquad \text{Eq II.1}$$

où R est la résistance externe, ohms
A est l'aire géométrique de l'anode, $m^2$

La densité de puissance P ($W/m^2$) a été calculée suivant

$$P = U \cdot J = \frac{U^2}{R \cdot A} \qquad \text{Eq II.2}$$

Les densités de puissance et les densités de courant maximales qui pouvaient être développées par les piles ont été déterminées en traçant des courbes de puissance, c'est-à-dire en faisant varier la valeur de la résistance électrique externe ; deux boîtes de résistances ont été utilisées à cet effet avec des valeurs indiquées dans le Tableau II.2

Tableau II.2 Boîtes de résistances utilisées pour la détermination des courbes de puissance.

| Boîte I, ohms | Boîte II, ohms |
|---|---|
| 56324 | 6800 |
| 31623 | 3800 |
| 17783 | 2200 |
| 10000 | 1200 |
| 5623 | 680 |
| 3162 | 390 |
| 1778 | 220 |
| 1000 | 100 |
| 562 | 33 |
| 316 | 10 |
| 178 | 1 |
| 100 | |

La courbe de puissance (densités de puissance en fonction des densités de courant) est obtenue en enregistrant la tension de la pile pour chaque valeur résistance après un temps de stabilisation qui peut varier d'un système à l'autre ; généralement un intervalle de 3 min est adéquat entre chaque changement de résistance. Nous avons pris soin de commencer par les résistances les plus élevées afin de ne pas faire débiter la pile en excès et s'assurer ainsi d'avoir une courbe la plus complète possible.

Le rendement faradique a été déterminé par

$$RF = \frac{C_E}{C_T} \times 100 \qquad \text{Eq II.3}$$

où $C_E$ est la quantité d'électricité (Coulomb) mesurée expérimentalement par l'intégration du courant I (A) par rapport au temps t (s)

$$C_E = \int_{to}^{tf} I \cdot dt \qquad \text{Eq II.4}$$

$C_T$ représente la quantité d'électricité (Coulomb) théorique calculée par :

$$C_T = \frac{F \cdot n \cdot S \cdot V}{M} \qquad \text{Eq II.5}$$

où F est la constant de Faraday (98 485 C/mole d'électrons)

n est le nombre d'électrons générés par mole de combustible, soit 8 mole d'électrons par mole d'acétate ou 4 mole d'électrons par mole de DCO

S est la concentration de combustible consommée dans l'anolyte (g/L)

V est le volume de l'anolyte (L)

M est la masse molaire du combustible, soit 82 g/mole pour l'acétate de sodium et 32 g/mole pour la DCO.

La demande chimique en oxygène, mesure indicative de la dose d'oxygène nécessaire pour oxyder complètement la matière organique contenue dans l'échantillon, est considéré comme le combustible consommé avec le transfert de 4 électrons par mole d'oxygène.

Le rendement faradique est une mesure de l'efficacité de la conversion de l'énergie chimique contenue dans la matière en énergie électrique.

Afin de vérifier l'origine biologique de la production de courant, dans certains cas un produit antibiotique-antifungique a été ajouté à 1% v/v dans l'anolyte : Gibco® (Cat 15240-062 Invitrogen Corp.).

## II.5 Techniques d'analyse chimique

### II.5.1 Demande chimique en oxygène (DCO)

Toutes les mesures de DCO sont réalisées suivant la méthode 8000 fournie avec l'équipement de mesure Hach Company, (méthode valable pour l'eau, les eaux résiduaires et l'eau de mer), dans l'intervalle 20 à 1500 mg/L DCO. L'échantillon est chauffé en présence d'un oxydant fort, le dichromate de potassium. Les composées organiques réduisent l'ion dichromate ($Cr_2O_7^{2-}$) en ion chromique de couleur verte ($Cr^{3+}$) qui est dosé par mesure spectrophotométrique à 620 nm (spectrophotométre ODYSSEY DR 2500. Hach Lange Co.) La procédure est indiquée dans l'annexe A située à la fin de ce chapitre.

### II.5.2 Carbone organique total (COT)

Le carbone organique total est mesuré suivant la méthode 10128 fournie avec l'équipement de mesure Hach Company. Les tubes à essai du kit contiennent une ampoule renfermant un indicateur de pH. L'échantillon est dilué dans une solution légèrement acide qui élimine le carbone inorganique. L'oxydation du carbone organique par du persulfate en milieu acide produit du dioxyde de carbone qui diffuse vers l'ampoule et forme de l'acide carbonique détecté par l'indicateur de pH. La variation de couleur est mesurée à 598 et 430 nm. La procédure est indiquée dans l'annexe B.

### II.5.3 Méthode de Lowry pour le dosage des protéines

La méthode est basée sur la réaction de Biuret, dans laquelle les liaisons peptiques des protéines réagissent en conditions alcalines avec le cuivre en générant des ions $Cu^{+}$ qui réagissent avec le réactif de Folin. Dans la réaction de Folin-Ciocalteau, dont les mécanismes exacts ne sont pas vraiment élucidés, un colorant est réduit par l'oxydation des acides aminés aromatiques catalysée par le cuivre. Cette réduction induit un renforcement de la couleur bleue, dont l'intensité est fonction du contenu de la tyrosine et du tryptophane (composés aminés aromatiques) (Sapan et al. 1999). La procédure est détaillée dans l'annexe C.

### II.5.4 pH et Conductivité

Le pH des solutions a été mesuré avec un pH-mètre (CG 882 5Schott Gerate GMBH) calibré avec des solutions standard tamponnées à pH 4 et pH 7. La conductivité des solutions a été mesurée avec un conductimeter (Metrohm 660 Roucaire Suisse).

### II.5.5 Microcopie électronique à balayage (MEB)

La colonisation du feutre de graphite a été observée par microscopie électronique à balayage avec l'assistance technique de Mme. Marie-Line De Solan (Laboratoire de Génie Chimique)

en utilisant un microscope Leo 435 VP Carl Zeiss, piloté par le logiciel SRV-32. Avant l'examen les électrodes sont été préparées comme décrit dans l'annexe D.

### II.5.6 Détermination enzymatique de lactose et galactose

Le dosage du lactose et du galactose a été réalisé avec le Kit enzymatique Boehringer Mannheim/R-Biopharm par la méthode UV (Cat No 10 176 303 035). Le lactose est hydrolysé en D-glucose et D-galactose à pH 6,6 grâce à l'enzyme β-galactosidase. Le D-galactose est oxydé à pH 8,6 par NAD+ (nicotinamide adénine dinucléotide) en acide D-galctonique grâce à l'enzyme β-galactose déshydrogénase. Une quantité de NADH est formé qui correspond steochiométriquement à la quantité de lactose et D-galactose. La concentration de NADH est mesurée à 340 nm par spectrophotométrie.

Les échantillons de lait, yaourt, crème doivent être prétraités pour enlever les particules solides, les protéines, et la graisse suivant la procédure décrite dans l'annexe E, ensuite le dosage enzymatique est fait en utilisant le kit comme décrit dans l'annexe F.

## II.6 Références

Bond DR, Lovely DR (2003) Electricity production by *Geobacter sulfurreducens* attached to electrodes. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(3):1548-1555.

Lai ME (2000) Catalyse enzymatique de la réduction électrochimique de l'oxygène: application à la corrosion des aciers inoxydables en milieu marin. Thèse doctorial. Université Paul Sabatier. Toulouse III. Toulouse, France. 315pp.

Min B, Cheng S, Logan BE (2005) Electricity generation using membrane and salt bridge microbial fuel cells. *Water Research.* 39:1675-1686.

Rozendal R, Hamelers H, Buisman C (2006) Effects of membrane cation transport on pH and microbial fuel cell performance. *Environ. Sci. Technol*. 40(17):5206-5211.

Sapan CV, Lundblad RL, Price NC (1999) Colorimetric protein assay techniques. *Biotechnol. Appl. Biochem*. 29:99-108.

## ANNEXE

A. Procédure pour la détermination de la demande chimique en oxygène (DCO)

1. l'échantillon est homogénéisé,
2. le réacteur (Thermostat DRB 200, Hach) est préchauffé à 150°C,
3. 2 mL d'eau distillée sont placés dans le tube qui sert de contrôle et 2 mL d'échantillon dans le second tube,
4. le contenu est homogénéisé par une forte agitation des tubes,
5. les tubes sont placés dans le réacteur et la réaction a lieu pendant 2 h,
6. les tubes refroidissent jusqu'à 120°C et ils sont sortis du réacteur et à nouveau agités,
7. lorsque les tubes sont à température ambiante, la densité optique est mesurée à 620 nm suivant le programme 435 « High Range » par rapport au contrôle.

B. Procédure pour la détermination du carbone organique total (COT)

1. Préchauffer le réacteur à 103-105°C.
2. Placer 10 mL de chaque échantillon dans des flacons erlenmeyer de 100 mL.
3. Ajouter 0,4 mL de la solution pH 2 incluse dans le kit de mesure et agiter pendant 10 min.
4. Ajouter le persulfate dans les tubes du kit contenant la solution acide d'oxydation.
5. Ajouter 0,3 mL d'eau exempte de composés organiques dans le tube de contrôle et 0,3 mL des échantillons dans les autres tubes, agiter doucement.
6. Introduire l'ampoule avec la solution indicatrice de pH et casser le bouchon, fermer les tubes.
7. Placer les tubes dans le réacteur et laisser évoluer la réaction pendant 2 h.
8. Laisser refroidir jusqu'à la température ambiante pendant 1 h.
9. Mesurer l'absorbance des solutions contenues dans les tubes par rapport au tube de contrôle avec le programme 426.

C. Procédure pour le dosage des protéines par la méthode Lowry

Solutions :

a) Albumine de sérum bovin, 2 g/L

b) NaOH, 1N

c) Carbonate de sodium, 2%

d) Sulfate de cuivre, 1%

e) Tartrate de sodium et potassium, 1%

f) Réactif de Folin, dilution 1:1 avec de l'eau distillée

g) Mélange réactionnel : 50:1:1 carbonate de sodium, sulfate de cuivre, tartrate de sodium et potassium

Un courbe étalon est élaboré selon la procédure suivante :

1. Placer 0,5 mL de l'échantillon et 0,5 mL de solution NaOH dans le tube de mesure et 0,5 mL d'eau distillée dans le tube de contrôle.
2. Porter les tubes à ébullition dans un bain Marie pendant 10 min.
3. Refroidir les tubes dans un bain de glace.
4. Ajouter 2,5 mL de la solution du mélange réactionnel dans chaque tube, agiter en utilisant un vortex.
5. Garder à l'obscurité pendant 10 min.
6. Ajouter 0,5 mL de réactif de Folin, agiter en utilisant un vortex.
7. Garder à l'obscurité pendant 30 min.
8. Mesurer l'absorbance à 550 nm (visible) (spectrophotomètre Agilent Technologies 8453 ; logiciel 845x UV-Visible system).

Une courbe d'étalonnage est tracée avec l'albumine de sérum bovin à des concentrations de 0 à 500 mg/L. Cette courbe est ensuite utilisée pour la mesure des concentrations en protéines des échantillons.

D. Préparation des échantillons pour la microscopie électronique à balayage.

Solutions :

a) Solution tamponnée de cacodylate 0,4M, pH 7,4

b) Glutaraldéhyde 4% dans la solution de cacodylate

c) Saccharose 0,4M

d) Saccharose 0,6 M

e) Tetroxyde d'osmium 2% dans la solution de saccharose 0,6M

f) Mélange de fixation 2 :1 :1 glutaraldéhyde, cacodylate, eau distillée

g) Mélange de lavage 1 :2 :1 cacodylate, saccharose (0,4M), eau distillée

h) Mélange de post-fixation 2 :1 :1 osmium, cacodylate, saccharose (0,6M)

i) Acétone, 50%, 70% dans de l'eau distillée et 100%

j) Hexamethyl-disilazane (HMDS) 50% dans de l'acétone et 100%

1. Le mélange de fixation est déposé sur l'échantillon pendant 20 min puis retiré.
2. L'échantillon est lavé deux fois pendant 15 min avec le mélange de lavage.
3. La post-fixation est effectuée pendant 20 min avec le mélange de post-fixation.
4. L'échantillon est déshydraté avec l'acétone 50% pendant 5 min, suivi de l'acétone 70% pendant 5 min , l'acétone 100% pendant 30 min, HMDS 50% pendant 30 min et enfin HMDS 100% jusqu'à évaporation totale sous hotte.

Les échantillons sont observés à 7,5 kV. Une couverture d'or peut améliorer l'image obtenue mais elle n'est pas strictement nécessaire.

E. Procédure pour dégraisser les échantillons du dosage lactose-galactose

Solutions :

a) Carrez-I

3,6 g $K_4[Fe(CN)_6]$, $3H_2O$ dans 100 mL d'eau distillée

b) Carrez-II

7,2g $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ dans 100 mL d'eau distillée

c) NaOH 0,1M

1. Placer 1g d'échantillon dans un flacon volumétrique de 100 mL
2. Ajouter 60 mL d'eau et incuber à 70°C pendant 15 min avec agitation éventuelle
3. Clarifier par l'ajout de 5 mL de solution Carrez-I, 5 mL de solution Carrez-II et 10 mL de NaOH 0,1M en mélangeant à chaque ajout.
4. Laisser refroidir à température ambiante et compléter à 100 mL avec de l'eau

distillée.

5. Un précipité se forme, la solution claire doit être utilisée pour le dosage, en filtrant si nécessaire.

F. Dosage enzymatique du lactose et galactose

Le dosage enzymatique doit être fait dans des cuves spectrophotométriques d'au moins 3 mL ; la procédure est la suivante :

Solutions inclues dans le kit:

a) Sol 1 : Solution tamponnée de citrate pH 6,6 contenant NAD+ et le sulfate de magnésium
b) Sol 2 : Enzyme β-galactosidase
c) Sol 3 : Solution tamponnée de phosphate de potassium pH 8,6
d) Sol 4 : Enzyme galactose-déshydrogénase

1. Les solutions sont placées dans 4 cuves selon le tableau ci-dessous :

| | Contrôle – Lactose | Echantillon - Lactose | Contrôle - Galactose | Echantillon – Galactose |
|---|---|---|---|---|
| Sol 1 Tampon | 200 µL | 200 µL | 200 µL | 200 µL |
| Sol 2 Enzyme | 50 µL | 50 µL | - | - |
| Echantillon | - | 100 µL | - | 100 µL |

↓ Agiter par inversion des cuvettes
Attendre 20 min
Ajouter

| | Contrôle – Lactose | Echantillon – Lactose | Contrôle - Galactose | Echantillon – Galactose |
|---|---|---|---|---|
| Sol 3 Tampon | 1 mL | 1 mL | 1 mL | 1 mL |
| $H_2O$ | 2000 µL | 1900 µL | 2050 µL | 1950 µL |

↓ Agiter
Attendre 2 min
Mesurer la densité optique à 340 nm = A1

| | Contrôle – Lactose | Echantillon – Lactose | Contrôle - Galactose | Echantillon - Galactose |
|---|---|---|---|---|
| Sol 4 Enzyme | 50 µL | 50 µL | 50 µL | 50 µL |

↓ Agiter
Attendre 15 à 30 min
Mesurer la densité optique à 340 nm = A2

2. Une fois obtenues les lectures A1 et A2 calculer :

Dif A = A2 – A1

a) Dif A pour la colonne “Contrôle – Lactose”

b) Dif A pour la colonne « Echantillon – Lactose », laquelle inclue Galactose

c) Dif A pour la colonne “Contrôle – Galactose »

d) Dif A pour la colonne “Echantillon – Galactose”

Calculer les lectures d’absorbance pour lactose et galactose individuellement

e) Lactose + Galactose = b - a

f) Galactosa = d – c

g) Lactose = (b-a) – (d-c) = e - f

Les concentrations de lactose et galactose sont calculées avec l’équation

$$C(g/L) = \frac{V \cdot M}{\varepsilon \cdot d \cdot v \cdot 1000} \cdot \Delta A \qquad \text{Eq II.6}$$

où C est la concentration, g/L

V est le volume final, mL

M est la masse molaire du lactose 342,3 g/mol ou du galactose 180,16 g/mol

ε est le coefficient d’extinction de NADH à 340 nm soit 6,3 (L/mmol cm)

d est la longueur de la cuvette, 1 cm

v est le volume de l’échantillon, mL

# CHAPITRE III

# Etude électrochimique pour la sélection des combustibles et des biocatalyseurs pour la PACM

III.1 Introduction 64

III.2 Chronoampérométrie des milieux 65

III.2.1 Chronoampérométrie des combustibles 65

III.2.1.1 Jus de pommes fermenté et lies de vin 66
III.2.1.2 Résidus de l'industrie laitière 67
III.2.1.3 Effluents de lavage de l'industrie laitière 69

III.2.2 Chronoampérométrie des sources de biocatalyseurs 71

III.2.2.1 Terre de bruyère et lixiviat de terreau 72
III.2.2.2 Boues anaérobies 73

III.3 Voltammétrie cycliques des milieux 74

III.3.1 Voltampérogrammes des combustibles 75

III.3.1.1 Jus de pommes fermenté et lies de vin 75
III.3.1.2 Résidus de l'industrie laitière 76
III.3.1.3 Effluents de lavage de l'industrie laitière 77

III.3.2 Voltampérogrammes des biocatalyseurs 78

III.3.2.1 Terre de bruyère et lixiviats de terreau 78
III.3.2.2 Boues anaérobies 80

III.4 Conclusions 80

III.5 Références 81

## III.1 Introduction

Dans le contexte des piles microbiennes, le combustible doit être un composé biodégradable qui présente un potentiel d'oxydoréduction le plus bas possible. De nombreux effluents et résidus des industries agricole et alimentaire testés dans des piles microbiennes semblent réunir ces conditions. Différents résidus de ces industries (céréales, amidon, résidus de viandes, fumier de ferme…) donnent généralement des performances inférieures à 100 mW/m² (Gil et al. 2003 ; Heilmann & Logan, 2006 ; Oh & Logan, 2005 ; Rabaey et al. 2005). Une performance exceptionnellement élevée de 971 mW/m² (Zuo et al. 2006) a été atteinte avec de l'hydrolysat de paille de maïs. Dans ce cadre, la PACM a une double fonctionnalité : la production d'énergie électrique et la diminution de la matière organique considérée polluante.

Etant donné la grande diversité des composants organiques contenus dans les résidus et effluents des industries agro-alimentaires, nous abordons dans le présent travail l'évaluation de quelques milieux types : des jus de pommes, des lies de vin, des résidus d'une industrie laitière et des rejets de lavage de la ligne de production de la même industrie. La culture de pommes génère des déchets solides qui se transforment au cours du temps en produisant des résidus liquides que nous appellerons jus de pommes fermenté, par analogie avec les lixiviats qui se forment dans les décharges de déchets agricoles (jus de décharges). Les lies de vin sont le résultat du procédé de fabrication du vin. Les résidus d'industrie laitière considérés ici sont de deux sortes : d'une part le résultat du compactage de déchets solides banals d'une chaîne de production de yaourts, et d'autre part les rejets de lavage de la ligne de production. Ces derniers ont la particularité d'avoir un pH très alcalin (pH 12,9). Tous ces matériaux sont à l'heure actuelle rejetés sans valorisation. L'objectif est donc dans ce travail d'évaluer la possibilité de les valoriser grâce à une PACM qui permettrait la production d'électricité. Le choix de ces résidus permet une incursion dans les secteurs agricoles, viticoles et laitiers.

Les sources de biocatalyseurs les plus exploitées dans les études décrites sont des effluents urbains et des boues des stations d'épuration issues de procédés aérobies et anaérobies. Les sédiments marins ont été testés tout au début des recherches sur PACM (Reimers et al. 2001; Rezaei et al. 2007) et semblent maintenant plutôt réservés à des applications de piles marines. De nombreuses autres sources sont utilisées de façon moins fréquente, comme les sols

(Niessen et al. 2006), le terreau de jardin (Parot et al. 2008-a), le fumier (Scott et Murano, 2007), le rumen (Rismani-Yazid et al. 2007), les lixiviats des centres d'enfouissement de déchets (Greenman et al. 2009). Ce travail porte sur l'évaluation de deux sources de biocatalyseurs, les boues issues d'une station d'épuration d'effluents urbains et le terreau de jardin. La première est parmi les plus utilisées dans la bibliographie, la seconde avait déjà donné de bons résultats au laboratoire bien qu'il restât difficile de les utiliser hors des sols. Une nouvelle technique d'exploitation a donc été mise en place consistant à faire percoler une solution saline au travers du terreau et utiliser ensuite le lixiviat obtenu, plutôt que d'utiliser le terreau lui-même.

La chronoampérométrie est une technique qui s'est révélée très efficace pour découvrir des micro-organismes électrochimiquement actifs en divers milieux, en testant toute une série de potentiels imposés à l'électrode de travail (Parot et al. 2008-a et 2008-b). Cette technique est largement utilisée dans ce chapitre pour tester les deux sources de biocatalyseurs et les quatre types de combustibles considérés : jus de pommes fermenté, lies de vin, résidus d'une industrie laitière et rejets de sa ligne de lavage. Ces combustibles, qui peuvent contenir des sources de micro-organismes intéressants, ont également été testés pour leur éventuelle capacité à fournir les biocatalyseurs de la PACM.

## III.2 Chronoampérométrie des milieux

Dans cette section sont décrits les chronoampérogrammes effectués à différents potentiels imposés pour les milieux testés comme source de combustible et de biocatalyseur.

### III.2.1 Chronoampérométrie des combustibles

Les chronoampérométries ont été réalisées dans des cellules de 100 mL avec des électrodes en feutre de graphite de 4 $cm^2$. Le jus de pommes fermenté a été préparé en laboratoire, les lies de vin ont été fournies par le Laboratoire de Chimie Agro-Industrielle (LCA), les résidus et rejets de laiterie ont été fournis par le groupe industriel 3A (industrie de produits laitiers).

Les chronoampérométries sur le jus de pommes et les lies de vin ont été effectuées à

+0,3V/ECS et +0,7V/ECS, un intervalle assez large afin d'identifier rapidement l'effet du potentiel imposé sur le courant généré.

### II.2.1.1 Jus de pommes fermenté et lies de vin

Les chronoampérogrammes de jus de pommes fermenté donnent une densité de courant en décroissance continue avec des oscillations circadiennes. La densité de courant initiale est directement en relation avec le potentiel imposé : de l'ordre de 200 mA/m² et 25 mA/m² aux potentiels imposés de +0,7V/ECS et +0,3V/ECS respectivement. (Fig III.1)

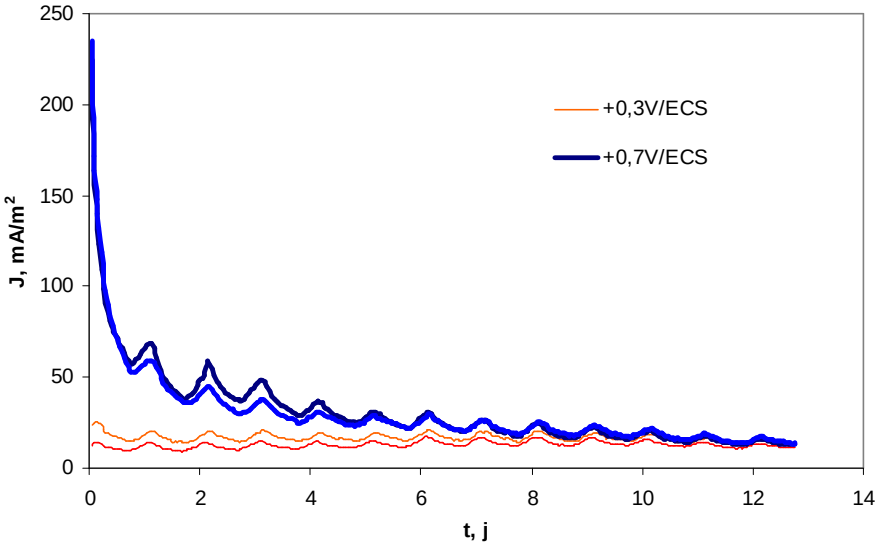



*Fig III.1 Chronoampérogramme de feutre de graphite dans du jus de pommes fermenté. Polarisation à +0,3V/ECS, +0,7V/ECS.*

Le profil observé est semblable dans le cas des lies de vin, avec une valeur initiale de densité de courant de 400 mA/m² et de 50 mA/m² pour les valeurs de potentiel imposé mentionnées ci-dessus. Les densités de courant observées à la fin des chronoampérométries (13 jours) ont été d'environ 25 mA/m² pour les deux combustibles testés.

Dans les deux cas, ces variations de courant en fonction du temps sont caractéristiques d'une consommation d'un réactif en solution par une oxydation électrochimique qui a lieu à +0,7V/ECS mais n'est plus possible à +0,3V/ECS. Les oscillations circadiennes sont caractéristiques des variations de température durant la journée. En aucun cas il n'a pas été

détecté de phénomènes qui puissent être lié à la formation d'un biofilm électro-actif à la surface de l'électrode.

### III.2.1.2 Résidus de l'industrie laitière

Nous avons observé des différences importantes entre les chronoampérogrammes tracés aux potentiels +0,3V/ECS et +0,7V/ECS avec les résidus de laiterie. Pour cette raison un potentiel intermédiaire +0,5V/ECS a également été utilisé. (Fig III.2)

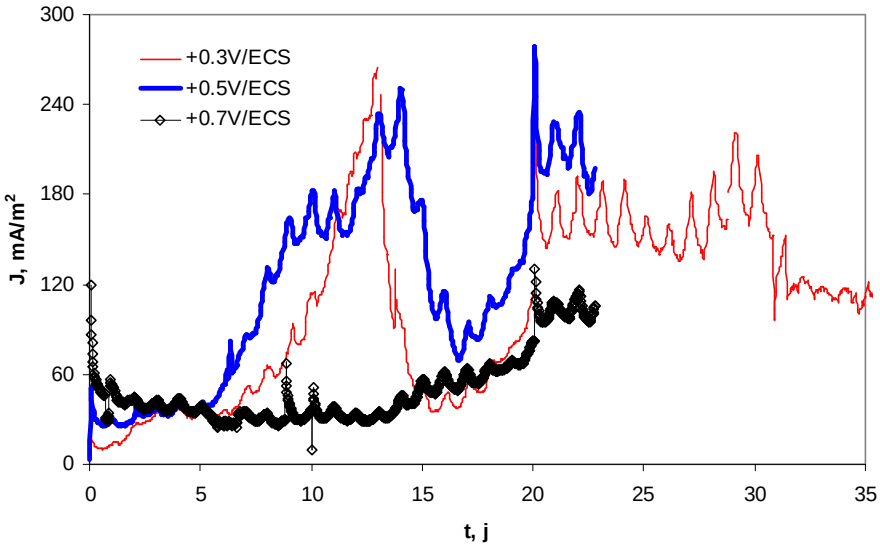



*Fig III.2 Chronoampérogramme de feutre de graphite dans des résidus de laiterie. Polarisation à +0,3V/ECS, +0,5V/ECS, +0,7V/ECS.*

Les densités de courant observées au début des chronoampérométries sont de 120 mA/m², 30 mA/m² et 20 mA/m² pour les potentiels imposés de +0,7V/ECS, +0,5V/EC, et +0,3V/ECS respectivement. Cette variation des densités de courant initiales avec le potentiel indique certainement l'oxydation d'un composé en solution, comme le confirme la descente progressive du courant durant les jours qui suivent. Une phase d'initiation d'environ 5 jours a ensuite été observée pour les potentiels +0,3V/ECS et +0,5V/ECS et de 11 jours pour +0,7V/ECS. Après la phase d'initiation le profil général du chronoampérogramme présente une montée du courant qui donne deux pics avant de se stabiliser. Le second pic de courant n'est pas observé au potentiel +0,7V/ECS sans doute du fait du retard général constaté à cette valeur de potentiel. La présence de la phase d'initiation avant la montée rapide de courant est

caractéristique de la mise en place d'un phénomène lié à la croissance de micro-organismes. Ce type de forme de courbe correspond à un profil général de croissance du à l'adaptation nécessaire des micro-organismes aux conditions de culture ou au milieu avant de commencer la phase de croissance exponentielle.

La phase d'initiation semble influencée par le potentiel imposé. A potentiel imposé plus élevé cette phase est plus longue. Le potentiel de +0,7V/ECS est probablement trop élevé de telle façon que les micro-organismes ont du mal à s'adapter aux conditions du milieu avant de commencer la production de courant. Le même phénomène a été constaté pour la formation de biofilms électro-actifs sur des électrodes plongées dans du terreau de jardin enrichi en chlorure de potassium (Parot et al. 2008a). Ce phénomène pourrait être dû à la production à la surface de l'électrode par oxydation électrochimique de composés néfastes à l'établissement du biofilm. On pense par exemple à la formation de composés chlorés ou à l'oxydation des composés de surface de l'électrode de carbone qui modifierait ses propriétés de surface.

On peut penser que le profil d'évolution du courant est le résultat d'interactions complexes entre la modification du milieu dû à l'électrolyse, la modification des populations microbiennes qui constituent le biofilm qui se développe à la surface de l'électrode et la modification éventuelle de l'activité des populations adhérées en fonction de la disponibilité du substrat ou de l'apparition d'un métabolite.

La densité de courant obtenue à partir des résidus de laiterie est 5 fois plus élevée que celle observée avec le jus de pomme et les lies de vin. Les pics ont eu une durée de 9 et 12 jours, ce qui correspond a une charge de 37,2 C et 52,4 C pour les potentiels +0,3V/ECS et +0,5V/ECS respectivement. Etant donné les résultats obtenus, nous avons écarté les jus de pomme et les lies de vin comme milieux susceptibles d'être utilisés comme source de biocatalyseur. Cependant, nous les testerons comme combustible dans les expériences ultérieures décrites dans le chapitre V. Les résidus de laiterie ont été considérés comme adéquats pour la suite de l'étude.

### III.2.1.3 Effluents de lavage de l'industrie laitière

Le dernier milieu testé comme combustible est composé des rejets de la ligne de lavage de l'industrie laitière, possédaient un pH alcalin (pH 12.9). A cause de ces caractéristiques si particulières par rapport aux milieux testés dans la bibliographie pour les PACM, nous avons testé un intervalle plus ample et une gamme plus serrée de potentiels imposés, afin d'augmenter les chances de trouver des micro-organismes électrochimiquement actifs. Les potentiels utilisés : ont été -0,3V/ECS, -0,1V/ECS, +0,1V/ECS, +0,3V/ECS et +0,5V/ECS, le contrôle du potentiel nous a permis de gagner en sélectivité. Les potentiels négatifs nous ont permis d'identifier le potentiel limite pour générer un courant d'oxydation.

Les résultats ont confirmé la dépendance de la génération de courant avec le potentiel imposé à l'électrode. Une densité de courant de réduction de -10 mA/m² est obtenue à -0,3V/ECS et des courants d'oxydation de 1 mA/m², 5 mA/m², 25 mA/m², et 70 mA/m² pour les potentiels croissant de -0,1V/ECS à +0,5V/ECS. La densité de courant est stable tout au long de l'essai (8j) dès les premières heures de polarisation, ce qui nous fait supposer un phénomène d'oxydation abiotique. D'autre part, une clarification de l'électrolyte et un dépôt des solides sur l'électrode de travail ont été observés aux potentiels -0,1/ECSV et +0,1V/ECS. Ceci suggère que ce type de rejets pourrait être dépollué par un procédé électrochimique traditionnel.

Les rejets de lavage ont été neutralisés à pH 7 avec une solution de HCl 37% afin de déterminer si un pré-conditionnement simple permettrait de dégager des micro-organismes électro-actifs. Après neutralisation les rejets ont été soumis aux potentiels -0,1V/ECS, +0,1V/ECS, +0,3V/ECS et +0,5V/ECS. Le profil général d'évolution du courant montre une phase d'initiation de 4 jours, suivi d'une augmentation lente. Les valeurs atteintes au jour 10 est de 25 mA/m² pour les deux potentiels les plus élevés, et de 10 mA/m² pour les deux potentiels les plus bas (Fig III.3).

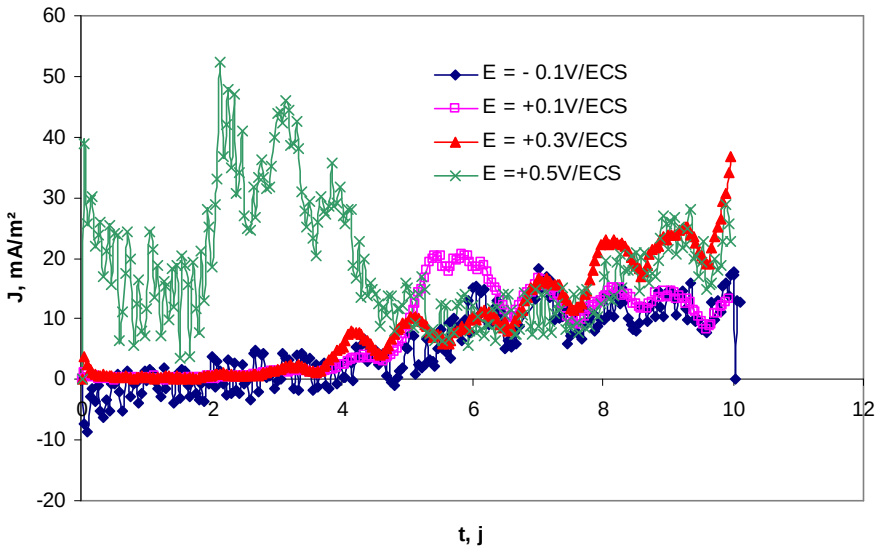



*Fig III.3 Chronoampérogramme de feutre de graphite dans des rejets de lavage neutralisés. Polarisation à -0,1V/ECS, +0,1V/ECS, +0,5V/ECS, +0,7V/ECS.*

La densité de courant maximale obtenue après neutralisation est faible, du même ordre de grandeur que celles obtenues avec les jus de pomme et les lies de vin, cependant ce conditionnement a mis en évidence la présence possible de micro-organismes électro-actifs. La faiblesse du courant pourrait être la conséquence d'une limitation en nutriments. Envisageant la possibilité de mélanger les rejets alcalins avec un autre effluent issus de laiterie et plus riche en matière organique, du lactose a été ajouté aux rejets neutralisés et l'électrode avec le biofilm déjà développé a été à nouveau utilisée. Du lactose a été ajouté dans chaque cellule électrochimique à une concentration identique à celle mesurée dans les résidus de laiterie (460 mg/L). Les densités de courant sont plus importantes (Fig III.4) allant jusqu'à 60 mA/m² à +0,5V/ECS. Ces manipulations confirment que le manque de nutriments est certainement une cause de limitation. La neutralisation des rejets alcalins suivie d'un mélange avec d'autres effluents de laiterie pourrait donc être une stratégie adéquate pour la valorisation de ces résidus. Toutefois les densités de courant restent faibles pour espérer l'extrapolation d'un tel procédé.

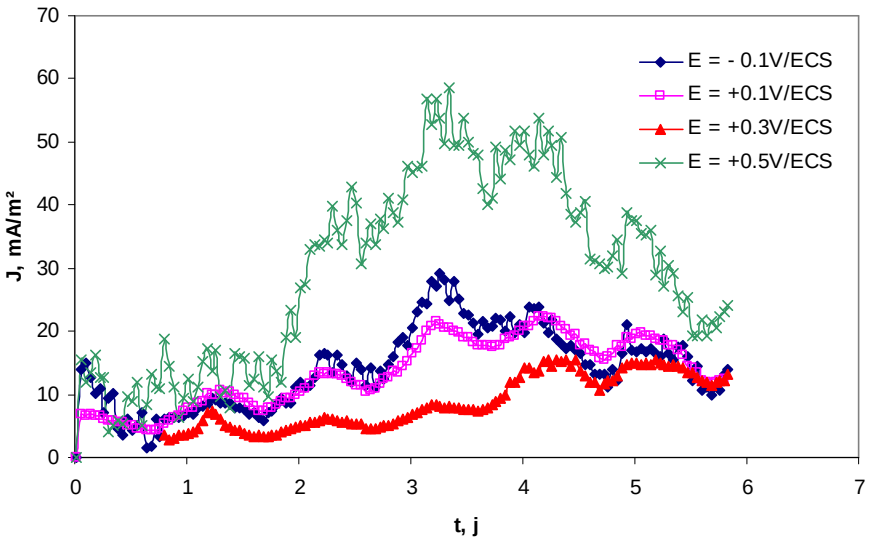



*Fig III.4 Chronoampérogramme de feutre de graphite dans des rejets de lavage après ajout de lactose. Polarisation à -0,1V/ECS, +0,1V/ECS, +0,5V/ECS, +0,7V/ECS.*

### III.2.2 Chronoampérométrie des sources de biocatalyseurs

Les milieux testés comme source de biocatalyseurs sont des lixiviats de terreau de jardin, de la terre de bruyère et des boues anaérobies.

La recherche de micro-organismes électro-actifs dans les environnements naturels menée au LGC (Parot S. 2007) a montré que le terreau de jardin conduisait à la formation de biofilm électro-actifs avec une production de densités de courant élevées. Les biofilms sont formés en disposant les électrodes sous polarisation directement dans le terreau saturée en solution saline. Toutefois, lorsque les électrodes sont extraites du milieu et plongées dans une solution les biofilms perdent quasi-systématiquement leur propriété électro-active. La mesure de l'oxygène dissous a montré qu'à seulement quelques centimètres de profondeur le terreau était en conditions anaérobies. Il est donc probable que les biofilms formés étaient composés majoritairement de micro-organismes strictement anaérobies qui ne survivent pas à la mise à l'air des électrodes. Pour pallier cet inconvénient rédhibitoire, nous avons mis en place une nouvelle procédure qui extrait d'abord les micro-organismes du terreau par lixiviation avec une solution saline et utilise ensuite cette solution (lixiviat) pour former des biofilms sous polarisation. En fait, nous avons imaginé cette procédure en simulant les lixiviats qui sont générés pendant le procédé de compostage. Nous espérions ainsi que les lixiviats sous forme

liquide faciliteraient les processus électrochimiques et permettraient de sélectionner une population microbienne résistant à une aération transitoire. En outre, à l'heure actuelle il n'est pas rapporté d'utilisation de lixiviats de terreau en PACM, ce qui donne à l'étude la touche d'originalité si importante pour les travaux de recherche.

La terre de bruyère a été sélectionnée comme une source possible de biocatalyseurs pour sa similarité avec le terreau et surtout en raison de son pH acide (pH 5,13). En effet les dysfonctionnements de la cathode constituent encore un verrou important pour la technologie des PACM. Il a été démontré au laboratoire que les cathodes utilisant l'air comme accepteur final d'électrons fonctionnement beaucoup mieux à des pH acides (Erable et al. 2009). Ce serait donc un avantage important de mettre à jour des micro-organismes électro-actifs capables de fonctionner à des pH acides. Ainsi, nous avons essayé de tester ce milieu pour mettre en œuvre des micro-organismes acidophiles électrochimiquement actifs.

Enfin nous avons testé les boues anaérobies parce qu'elles sont la source la plus utilisée depuis les débuts des recherches sur les PACM, ceci afin de faciliter la comparaison des résultats.

### III.2.2.1 Terre de bruyère et lixiviat de terreau

Les expériences de chronoampérométrie réalisées avec les lixiviats de terreau de jardin et la terre de bruyère ont donné un profil de densité de courant composé d'une phase d'initiation suivie d'une augmentation de courant. Toutefois la densité de courant est ensuite descendue dans le cas de terre de bruyère, alors que les lixiviats de terreau ont donné un plateau. (Fig III.5).

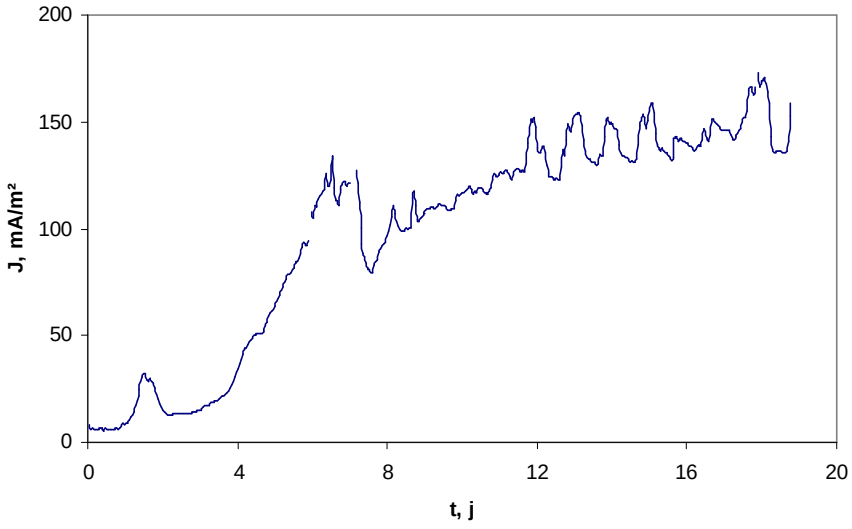



*Fig III.5 Chronoampérogramme de feutre de graphite dans du lixiviat de terreau de jardin. Polarisation à +0,6V vs. Ag/AgCl.*

Le maximum de densité de courant, correspond à un pic de 175 mA/m² au 9ème jour pour la terre de bruyère, alors que le lixiviat de terreau donne un maximum de courant de 175 mA/m² au 18ème jour jusqu'à la fin de l'essai au 19ème jour. Bien que la valeur de densité de courant atteinte avec la terre de bruyère ait été plus élevée, nous avons sélectionné le lixiviat de terreau à cause de la stabilité du courant généré.

### III.2.2.2 Boues anaérobies

En ce qui concerne l'évaluation des boues anaérobies, nous avons observé une densité de courant qui augmentait avec le potentiel imposé. Il n'y avait aucun phénomène qui puisse être lié à la formation d'un biofilm électroactif à +0.3V/ECS. Une variation de courant en fonction du temps caractéristique de la consommation d'un réactif en solution par une oxydation électrochimique explique ce profil. La valeur maximale de courant observé a été de 110 $mA/m^2$ avec un potentiel de +0.7V/ECS. (Fig III.6)

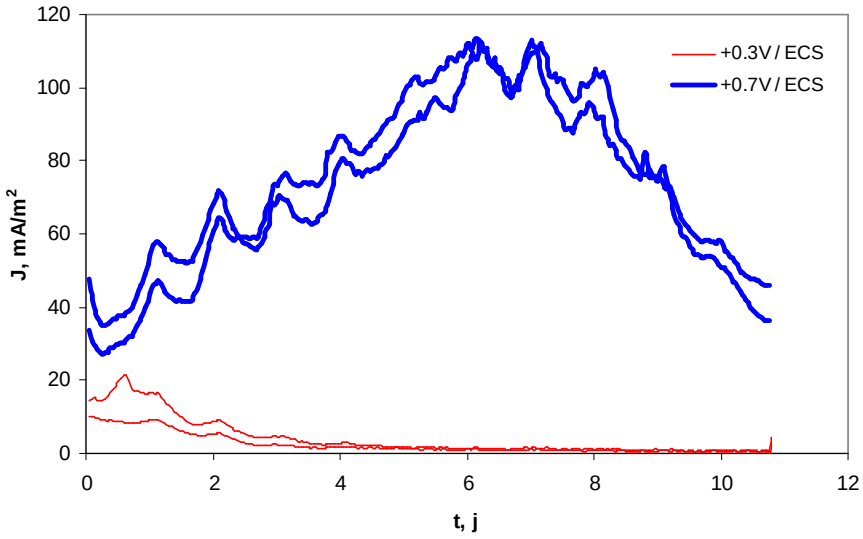



*Fig III.6 Chronoampérogramme de feutre de graphite dans des boues anaérobies. Polarisation à +0,3V/ECS, +0,7V/ECS.*

## III.3 Voltammétrie cyclique des milieux

La voltammétrie cyclique est une technique de plus en plus utilisée pour l'évaluation des biofilms électro-actifs pendant leur formation. A l'heure actuelle l'interprétation des voltampérogrammes est encore peu claire, en raison de la complexité des réactions abiotiques et de celles catalysées par les micro-organismes colonisant les électrodes. Le fait que les biofilms soient formés dans des milieux de composition complexe et souvent incomplètement identifiée ajoute à la difficulté d'interpréter les voltampérogrammes.

Dans cette section sont présentés et analysés divers voltampérogrammes, avec l'objectif d'enrichir les comparaisons avec les divers groupes de recherche, tout en sachant que les résultats sont fortement influencés par les systèmes d'étude.

Les voltampérogrammes ont été tracés durant la formation des biofilms sous potentiel imposé, le potentiel étant interrompu le temps du tracé. Nous avons sélectionné pour l'analyse, les voltampérogrammes au début, au moment (ou proche) de la densité de courant maximale et à la fin de la chronoampérométrie, procédure schématisée sur la Fig III.7.

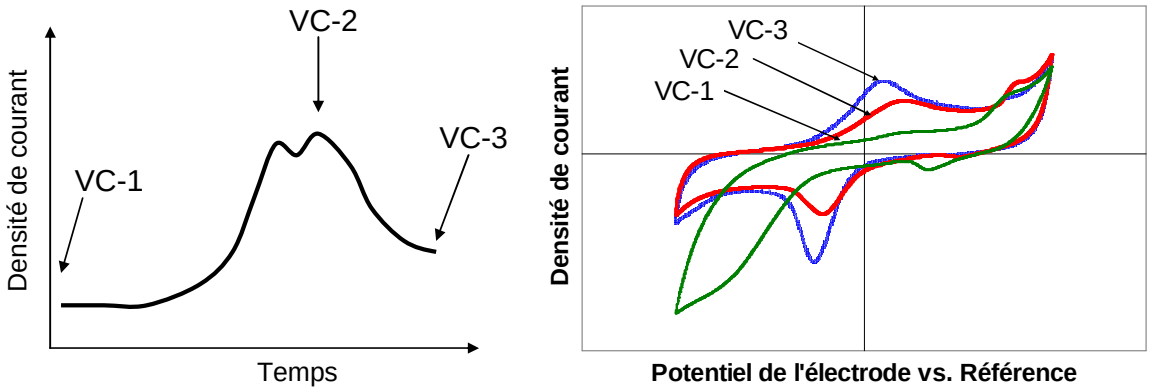



*Fig III.7 Allure de chronoampérogramme et les voltammétries cycliques associées (VC).*

### III.3.1 Voltampérogrammes des combustibles

#### III.3.1.1 Jus de pommes fermenté et lies de vin

Les voltampérogrammes du jus de pommes fermenté ainsi que des lies de vin mettent en évidence des courants d'oxydation et/ou de réduction qui ne sont pas complètement liés aux mécanismes de production de courant catalysés par les micro-organismes. Cette observation a été faite auparavant par Parot S. (2007).

Les chronoampérogrammes présentent des densités de courant en diminution continue (Fig III.1), néanmoins les électrodes génèrent des voltammpérogrammes qui présentent une densité de courant tant d'oxydation que de réduction pratiquement constante. *(*Fig III.8*)*

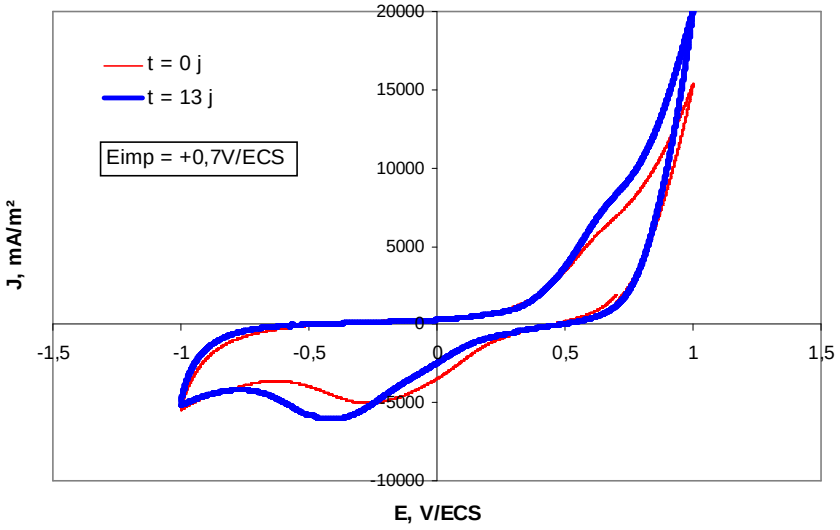



*Fig III.8 Voltampérogramme de feutre de graphite dans du jus de pommes fermenté. Polarisation à +0,7V/ECS. Chronoampérométrie associée indique une densité de courant J(0 j) = 240 mA/m², J(13 j) = 25 mA/m².*

Les réactions décelées pendant les chronoampérométries sont plutôt lentes et le résultat de plusieurs états pseudo-stationnaires sur l'électrode, alors que celles révélées par les voltammétries cycliques sont plutôt rapides, donc il est possible que les courants d'oxydation et de réduction observés en voltammétrie soient le résultat des réactions électrochimiques abiotiques. Parmi les composants contenus dans des milieux aussi complexes que la terre, le terreau, les résidus de laiterie, etc. auxquels s'ajoutent les métabolites produits par les micro-organismes pas nécessairement électroactifs, il y a sûrement des molécules qui peuvent subir une oxydoréduction sur l'électrode de graphite.

### III.3.1.2 Résidus de l'industrie laitière

Le voltampérogramme du début de l'expérience, réalisée avec des résidus de laiterie à potentiel imposé +0,5V/ECS, montre une augmentation rapide de courant à partir de +0,1V/ECS, ce qui correspond à des réactions purement chimiques puisque le biofilm n'a pas eu le temps de se former ; de même, un pic de réduction à -0,6V/ECS est probablement dû à la réduction de l'oxygène dissous retenu au sein de la matrice poreuse du feutre de graphite. (Fig III.9)

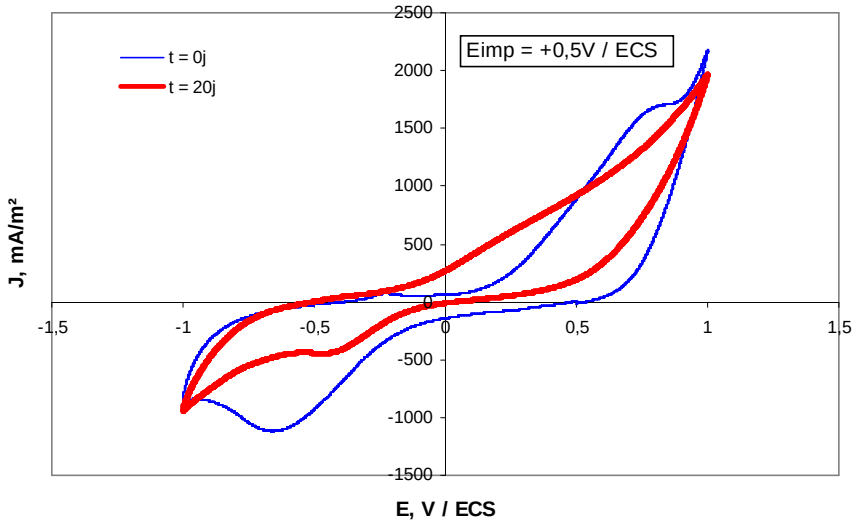



*Fig III.9 Voltampérogramme de feutre de graphite dans des résidus de laiterie. Polarisation à +0,5V/ECS. La chronoampérométrie associée indique J(0 j) = 30 mA/m², J(20 j) = 210 mA/m².*

Le cycle à la fin du test (20 jours) a montré une augmentation du courant d'oxydation plutôt lente à partir de -0,2V/ECS. Par déduction-élimination, nous pouvons considérer que ce phénomène correspond à l'activité biologique du biofilm sur l'électrode et l'oxydation des composants des résidus de laiterie.

### III.3.1.3 Effluents de lavage de l'industrie laitière

De façon similaire, nous identifions le voltampérogramme des rejets de lavage de laiterie (pH 12) comme le résultat de réactions uniquement chimiques (Fig III.10,A) par rapport aux mêmes résidus neutralisés, pour lesquels l'augmentation de la densité de courant d'oxydation dans l'intervalle de potentiels de -0,2 à +0,2V/ECS n'apparaît qu'à partir de plusieurs jours de polarisation (Fig III.3). Pendant la voltampérométrie dans ces conditions deux couples redox sont observés à 10 jours (Fig III.10,B).

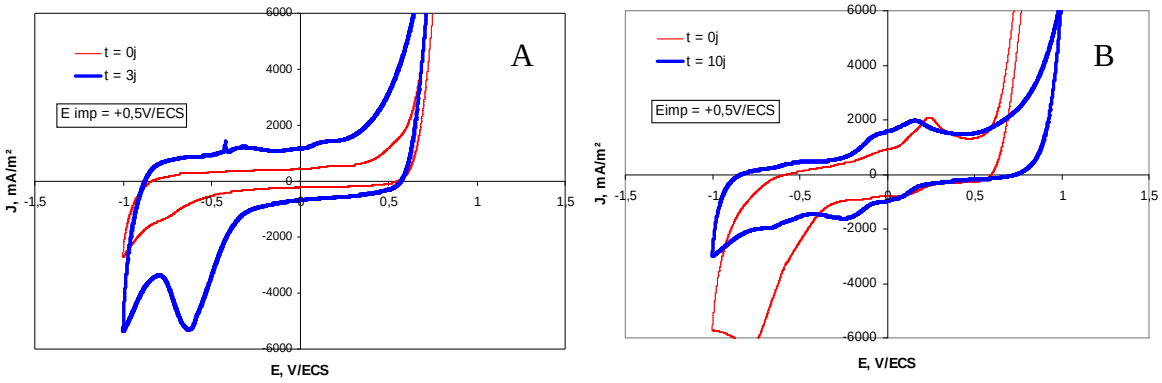



*Fig III.10 Voltammétrie cyclique de feutre de graphite dans des effluents de lavage de l'industrie laitière. A) effluents de lavage à pH 12. B) effluents de lavage à pH 7. Chronoampérométrie associée indique J(0 j) = 30 mA/m², J(10 j) = 23 mA/m².*

L'ajout de lactose fait apparaître des pics dès le début qui n'évoluent plus au fil du temps (Fig III.11). Le premier couple semble être semi-réversible avec une charge correspondant au pic d'oxydation de 3,32 mC et 3,75 mC pour le pic de réduction. Par contre, le deuxième couple dénote un processus irréversible avec une charge du pic d'oxydation de 9,49 mC et une charge pour le pic de réduction de 4,09 mC. Des différences entre les voltampérogrammes du début et la fin de l'expérience ne sont pas notables, sauf pour le courant d'oxydation toujours présent aux potentiels positifs au début des expériences (+0,5V/ECS).

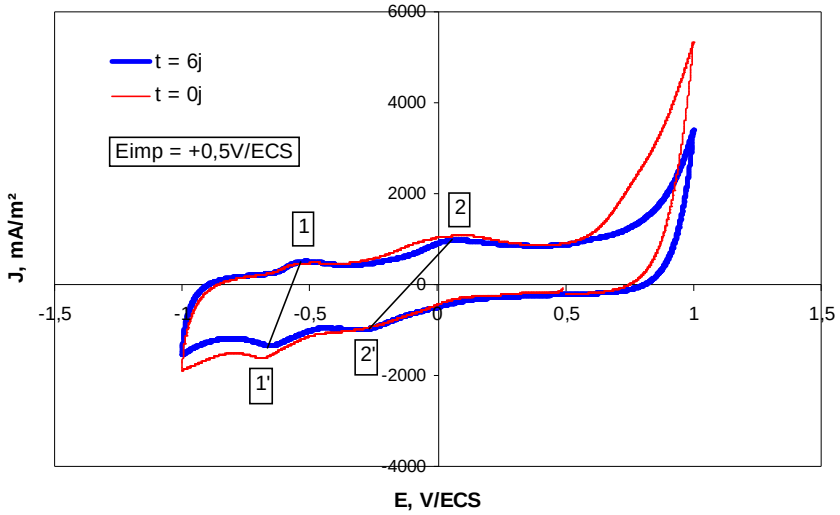



*Fig III.11 Voltampérogramme de feutre de graphite dans des effluents de lavage de laiterie neutralisés et ajoutés du lactose. Polarisation à +0,5V/ECS. La chronoampérométrie associée indique J(0 j) = 15 mA/m², J(6 j) = 22 mA/m².*

En conclusion, les profils bruts des voltammpérogrammes et les valeurs de densités de courant ne peuvent pas donner une image directe de la catalyse réalisée par le biofilm, cependant l'évolution des voltampérogrammes au fil du temps, l'observation de la formation ou l'atténuation des pics et notamment les comparaisons entre les voltampérogrammes du début et de la fin des expériences peuvent donner des informations sur les réactions d'oxydoréduction dues au biofilm sur l'électrode.

### III.3.2 Voltampérogrammes des biocatalyseurs

#### III.3.2.1 Terre de bruyère et lixiviats de terreau

Les voltampérogrammes de la terre de bruyère et des lixiviats de terreau sont semblables. Au début des expériences les voltammpérogrammes ne donnent de pics ni en oxydation, ni en réduction, mais un courant de réduction assez marqué qui débute vers -0,2V vs. Ag/AgCl et croît quasi-linéairement jusqu'à des valeurs de 3000 mA/m² à 5000 mA/m² à -0,7V vs Ag/AgCl. (Fig III.12).

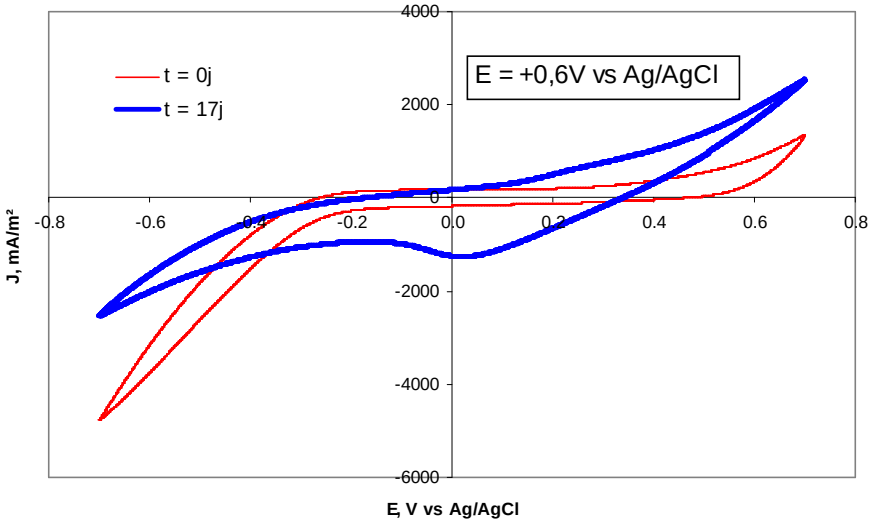



*Fig III.12 Voltampérogramme de feutre de graphite dans du lixiviat de terreau. Polarisation à +0,6V vs. Ag/AgCl. Chronoampérométrie associée indique J(0 j) = 8 mA/m², J(17 j) = 140 mA/m².*

Les voltammétries intermédiaires au 8ème jour (terre de bruyère) et 6ème jour (terreau) ont donné un courant d'oxydation qui augmente à partir du potentiel 0V vs. Ag/AgCl jusqu'atteindre des valeurs de l'ordre de 2500 mA/m² à 3000 mA/m² à +0,6V/ECS. La forme de la vague indique une réaction plutôt lente sans doute avec des processus successifs. En réduction il a été observé un pic à +0,15 V vs Ag/AgCl dans le cas de la terre de bruyère et à -0,1V/ECS pour le terreau. L'origine de ces réactions est probablement mixte, c'est-à-dire en partie d'origine biologique, pour celles qui n'apparaissent qu'après plusieurs jours de polarisation, et en partie abiotique pour celles qui sont présentes dès le début. Deux hypothèses peuvent expliquer l'apparition des réactions qui ne sont pas présentes au début de la chronoampérométrie :

- le biofilm se développe et catalyse la réaction avec des composés qui étaient présents dans le terreau ;
- ces réactions correspondent à des réactions électrochimiques abiotiques de composés qui sont produits par l'électrolyse microbienne.

Les voltammpérogrammes tracés en fin d'expérience ont montré que le pic de réduction diminuait et devenait plutôt une vague, ceci pourrait indiquer la diminution de la concentration des espèces qui se réduisaient.

### III.3.2.2 Boues anaérobies

L'oxydation des boues anaérobies fait apparaître après 10 jours de chronoampérométrie à +0,7V deux pics d'oxydation, le premier situé à +0,25V/ECS et le deuxième à +0,75V/ECS. Ils semblent correspondre à deux pics en réduction vers -0,1 et -0,45V/ECS indiquant deux systèmes d'oxydoréduction irréversibles étant donné l'écart de potentiel entre pics d'oxydation et de réduction (Fig III.13).

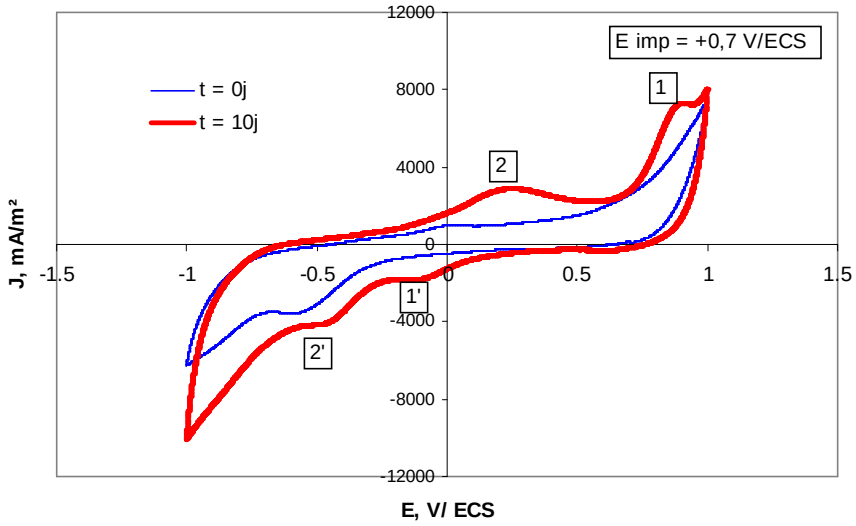



*Fig III.13 Voltampérogramme de feutre de graphite dans des boues anaérobies. Polarisation à +0,7V/ECS. Chronoampérométrie associée indique J(0 j) = 40 mA/m², J(10 j) = 35 mA/m².*

## III.4 Conclusions

1. La chronoampérométrie s'est confirmée être une technique efficace pour mettre en évidence les micro-organismes électro-actifs, la valeur du potentiel imposé ayant une importance évidente sur le résultat.
2. Les résidus de laiterie permettent d'assurer la double fonction : source combustible et source de biocatalyseur. En outre, les rejets de lavage après un pré-conditionnement de neutralisation peuvent être utilisés pour alimenter une PACM.
3. Nous avons démontré que la lixiviation de terreau permet d'extraire et d'exploiter de façon aisée des micro-organismes électro-actifs contenus dans le terreau qui acceptent

d'être manipulés à l'air sans précaution particulière. Les boues anaérobies confirment leur adéquation comme source de biocatalyseurs.

4. Ces résultats permettent de définir un ordre de grandeur de potentiel de formation adéquat pour chacune des sources de biocatalyseur, qui sera utilisé pour les expérimentations ultérieures
5. Les voltammétries cycliques ont permis de suggérer la présence de phénomènes d'oxydoréduction abiotiques couplés aux phénomènes catalysés par la formation des biofilms. Ces combinaisons apparaissent complexes et particulières à chacun des milieux étudiés. Pour identifier la part de chaque processus il faudrait pour chaque milieu entreprendre une campagne d'expérimentation complète incluant l'analyse chimique du milieu en début et fin de chronoampérométrie, utiliser de petits volumes de réacteur et de grandes surfaces d'électrode afin de déterminer si l'accumulation de produits dans le milieu a une influence, faire des voltammétries cycliques avec des électrodes propres à différents temps, transférer le biofilm formé en fin de chronoampérométrie dans un milieu frais, faire des ajouts dosés de certains composés dans le milieu, analyser les biofilms en termes de recouvrement et nombre de cellules (par exemple corréler le nombre de cellules avec l'évolution de certains pics au cours des voltammétries cycliques successives)… mais l'ensemble des ces expérimentations exigerait de figer des procédures reproductibles, de définir des protocoles d'analyse et demanderait un temps considérable nous détournant de l'objectif initial.
6. Dans une seconde phase d'étude on pourrait envisager avoir recours à la spectroscopie d'impédance électrochimique, mais encore faudrait-il considérablement simplifier le milieu réactionnel, l'interface, la population microbienne, ce qui suppose d'avoir acquis une première connaissance relativement approfondie sur l'un de ces systèmes.

## III.5 Références

Erable B, Etcheverry L, Bergel A (2009) Increased power from a two-chamber microbial fuel cell with a low-pH air-cathode compartment. *Electrochem. Commun*. 11: 619-622.

Gil G, Chang I, Kim B, Kim M, Jang J, Park H, Kim H (2003) Operational parameters affecting the performance of a mediator-less microbial fuel cell. *Biosens. Bioelectron.* 18:327-334.

Greenman J, Galvez A, Guisti L, Ieropoulos I (2009) Electricity from landfill leachate using microbial fuel cells: Comparison with a biological aerated filter. *Enzyme Microb. Technol.* 44:112-119.

Heilmann J, Logan B (2006) Production of electricity from proteins using a microbial fuel cell. *Water Environ. Res*. 78(5):531-537.

Niessen J, Harnisch F, Rosenabaum M, Schröder U, Scholz F (2006) Heat treated soil as convenient and versatile source of bacterial communities for microbial electricity generation. *Electrochem. Commun*. 8:869-873.

Oh SE, Logan B (2005) Hydrogen and electricity production from a food processing wastewater using fermentation and microbial fuel cell technologies. *Water Res*. 39:4673-4682.

Parot S (2007) Biofilms électroactifs : Formation, caractérisation et mécanismes. Thèse. Institut National Polytechnique de Toulouse. Toulouse, France. 247p.

Parot S, Delia ML, Bergel A (2008a) Forming electrochemically active biofilms from garden compost under chronoamperometry. *Bioresour. Technol*. 99:4809-4816.

Parot S, Delia ML, Bergel A (2008b) Acetate to enhance electrochemical activity of biofilms from garden compost. *Electrochim. Acta.* 53:2737-2742.

Rabaey K, Clauwaert P, Aelterman P, Verstraete W (2005) Tubular microbial fuel cells for efficient electricity generation. *Environ. Sci. Technol*. 39(20):8077-8082.

Reimers CE, Tender LM, Fertig S, Wang Wei (2001) Harvesting energy from the marine sediment-water interface. *Environ. Sci. Technol*. 35(1) :192-195.

Rezaei F, Richard TL, Brennan RA, Logan BE (2007) Substrate-Enhanced microbial fuel cells for improved remote power generation from sediment-based systems. *Environ. Sci. Technol*. 41:4053-4058.

Rismani-Yazid H, Christy AD, Dehority BA, Morrison M, Yu Z, Tuovinen OH (2007) Electricity generation from cellulose by rumen microorganisms in microbial fuel cells. *Biotechnol. Bioeng*. 97(6):1398-1407.

Scott K, Murano C (2007) Microbial fuel cells utilising carbohydrates. *J. Chem. Technol. Biotechnol*. 82:92-100.

Zuo Y, Maness P, Logan B (2006) Electricity production from steam-exploded corn stover biomass. *Energy Fuels*. 20:1716-1721.

# CHAPITRE IV

# Etude des paramètres opératoires des PACMs : Phase d'ensemencement et de démarrage, concentration en combustible, température

IV.1 Introduction 85

IV.2 Etudes en ensemençant avec des lixiviats de terreau 86

IV.2.1 Acclimatation du biocatalyseur, effet de la concentration en combustible, prétraitement de l'anode, température optimale 86

IV.2.1.1 Présentation de l'article « Treatment of dairy wastes with a microbial anode formed from garden compost » 86

IV.2.1.2 Article « Treatment of dairy wastes with a microbial anode formed from garden compost » 88

IV.2.2 Acclimatation cyclique du biocatalyseur au combustible 98

IV.2.3 Effet de la concentration en combustible dans un mélange biocatalyseur-combustible 99

IV.2.4 Effet des constituants de résidus de laiterie sur la génération de courant dans un système modèle : Caséine-Lactose-Ac. Humique 102

IV.3 Etudes en ensemençant avec des boues anaérobies 106

IV.3.1 Modification de l'état de surface de l'anode 106

IV.3.2 Influence de la concentration en combustible sur les performances de l'anode 108

IV.4 Comparaison des performances des biocatalyseurs 111

IV.4.1 Performance électrique : Rendement faradique 111

IV.4.2 Performance de la biodépollution : Abattement de la DCO et de la concentration en protéines 114

VI.6 Conclusions 117

VI.7 Références 118

## IV.1 Introduction

Ce chapitre est consacré à l'optimisation de certains paramètres opératoires des PACMs en employant comme dispositif des cellules électrochimiques à potentiel imposé. Le chapitre est divisé en trois parties : les études correspondant aux lixiviats de terreau comme biocatalyseur, les études utilisant des boues anaérobies et la comparaison des performances entre biocatalyseurs; dans tous les cas des résidus laitiers sont utilisés comme combustible.

Dans la première partie du chapitre est présenté l'article qui correspond aux études menées sur le système lixiviats, soit :

- L'évaluation de l'acclimatation du biocatalyseur au combustible
- La modification de l'état de la surface de l'anode
- L'effet de la concentration du combustible sur la génération de courant
- L'effet de la température sur la génération de courant

Ensuite sont présentés trois tests complémentaires sur le même système :

- L'acclimatation cyclique du biocatalyseur au combustible sous polarisation
- L'effet de la concentration en combustible dans un mélange biocatalyseur-combustible à température élevée
- Production de courant dans un système modèle composé par du lactose, de la caséine et de l'acide humique

La deuxième partie du chapitre rassemble les essais avec des boues anaérobies comme biocatalyseurs. La démarche est similaire à celle de la première partie afin de réaliser des analyses comparatives. De cette manière la modification de l'état de la surface de l'anode et l'effet de la concentration du combustible sur la génération de courant ont été évalués.

Puis une comparaison de la biodépollution obtenue par les deux biocatalyseurs testés est effectuée en considérant l'abattement de la Demande Chimique d'Oxygène (DCO) ainsi que la teneur en protéines. Enfin sont exposées des comparaisons de ces études par rapport aux performances énergétiques et à la biodépollution.

## IV.2 Etudes en ensemençant avec des lixiviats de terreau

### IV.2.1 Acclimatation du biocatalyseur, effet de la concentration en combustible, prétraitement de l'anode, température optimale

Cette première partie des résultats est présentée sous la forme d'un article dont le manuscrit est soumis à la revue "Journal of Applied Electrochemistry". Il présente la procédure d'optimisation du système composé par du biofilm formé à partir de lixiviats de terreau sur feutre de graphite avec des résidus laitiers comme combustible. Les études d'optimisation se sont focalisées sur la production de courant et incluent l'acclimatation du biocatalyseur au combustible, l'effet de la concentration de combustible, la modification de l'état de surface de l'anode et l'effet de la température.

#### IV.2.1.1 Présentation de l'article « Treatment of dairy wastes with a microbial anode formed from garden compost »

---

**ARTICLE: Treatment of dairy wastes with a microbial anode formed from garden compost**

Les résultats obtenus montrent que l'acclimatation préalable par des ajouts successifs de combustible au biocatalyseur n'est pas indispensable; le courant généré par le mélange lixiviat de terreau avec résidus laitiers sans acclimatation (70 mA/m²) a dépassé en quelques heures celui du biocatalyseur acclimaté. L'étude de l'effet de la concentration en combustible a été réalisée en deux étapes : tout d'abord la formation de biofilm issus des lixiviats de terreau suivie du contact du biofilm avec des dilutions de combustible a permis d'écarter l'influence des microorganismes et des nutriments contenus dans la suspension du biocatalyseur. Des concentrations élevées de résidus de laiterie (6770 ± 14 mg DCO/L) se sont révélés être défavorables à la génération de courant, probablement à cause d'éléments entrant dans la composition des résidus laitiers tels que la graisse et des protéines insolubles. La valeur maximale de densité de courant, 95 mA/m², a été obtenue avec une dilution d'un facteur

200 (729 ± 7 mg DCO/L). Parmi les résultats encourageants, il a été trouvé qu'une action simple telle que l'adsorption des résidus laitiers sur l'anode a multiplié par 2 (1100 mA/m²) la densité de courant obtenue par rapport à une électrode propre. Finalement, l'augmentation de la température du système a amélioré ses performances grâce à l'effet synergique d'accélération des réactions électrochimiques et celles du métabolisme microbien ; une valeur maximale de densité de courant de 1400 mA/m² a été obtenue à 40°C avec des anodes prétraitées par l'adsorption des résidus laitiers.

La contribution essentielle de ce travail est une nouvelle approche d'utilisation du terreau pour tirer profit du potentiel de microorganismes électroactifs que notre groupe de recherche avait déjà mis en évidence. Ce travail a marqué la nécessité d'évaluer les combustibles complexes avant utilisation en PACMs, car la composition et la charge organique peuvent être défavorables à l'activité du biofilm électro-actif. De plus, des actions simples comme le prétraitement de l'électrode par adsorption de matière organique, ainsi que l'augmentation de la température opératoire, peuvent améliorer les performances par rapport à la génération d'électricité.

### IV.2.1.2 Article « Treatment of dairy wastes with a microbial anode formed from garden compost »

# TREATMENT OF DAIRY WASTES WITH A MICROBIAL ANODE FORMED FROM GARDEN COMPOST

Bibiana Cercado-Quezada, Marie-Line Delia, Alain Bergel*

Laboratoire de Génie de Chimique, CNRS - Université de Toulouse, 4, Allée Emile Monso, BP 74233 31430 Toulouse Cedex 4, France

* Corresponding author. Tel.: +33 5 34 61 52 48; fax: +33 5 34 61 52 51.

E-mail address: Bibiana.cercadoquezada@ensiacet.fr (B. Cercado-Quezada)
marieline.delia@ensiacet.fr (ML. Delia)
alain.bergel@ensiacet.fr (A. Bergel)

**Abstract**

Garden compost has already been identified as a source of efficient electro-active (EA) biofilms. The work described here consisted of lixiviating the compost and then using the leachate as a microbial source. This procedure gave promising results for the treatment of yogurt waste (YW) in a microbial fuel cell (MFC). Experiments performed in MFC set-ups were compared with electrochemical cells under polarization at +0.1 V vs. SCE. Different parameters were tested to optimize the microbial anode. Preliminary acclimation of the compost microbial flora to YW was revealed to be unnecessary. Forming biofilms firstly in pure leachate before exposing them to YW showed that high concentrations of this type of substrate were detrimental to current generation. Pre-treatment of the electrode by pre-adsorbing YW led to a 10-fold increase in the current density. The highest current densities were obtained at 40°C and 60°C, revealing the diversity of electro-active microorganisms coming from soils. Values up to 1,450 mA $m^{-2}$ were reached at 40°C.

**Keywords:** Microbial fuel cell, Dairy wastes, Garden compost, Inoculum acclimation, Anode pre-treatment, Temperature

## 1 Introduction

The double benefits of microbial fuel cells (MFCs), electricity production simultaneously with waste removal, have been reported since at least 1983 [1]. Interest in MFCs saw a strong revival in the early years of this century thanks to the discovery of the capacity of microbial biofilms to achieve direct electron transfer with the electrode surface [2,3]. Since then, MFCs have continuously increased their performance levels and widened their field of application as reviewed in numerous articles [4-6]. The double benefit of MFCs has been largely confirmed, mainly with domestic wastewater [7]. Most MFCs have been implemented with abiotic cathodes, and commonly with air-reducing cathodes [8,9]. Microbial cathodes have been proposed [10-13] but remain less numerous. Most studies devoted to MFCs have focused on the anode process, where consumption of the waste occurs. For the anode, the environment in which the MFC is implemented can play two different roles: it can provide the substrate (fuel) on the one hand, and can be the source of the microbial consortium that forms the electro-catalytic biofilm on the other.

Research on MFCs started by using low-molecular-weight molecules such as glucose and acetate as fuels [14,15]; then complex substrates like cellulose and chitin were tested to extend MFC applicability [16,17]. Wastes and wastewaters of different origins have been investigated: food wastewaters from the starch [18], cereal [19], potato [20], meat [21] or dairy [22] industries, and farm wastes such as swine wastewater [23], farm manure [22] and corn stover [24]. Surprisingly, when they were tested in the same MFC set-up, higher performance was obtained for the more complex substrates: acetate generated 506 mW $m^{-2}$ [15], while hydrolyzed corn stover generated 971 mW $m^{-2}$ [24].

Several reports have shown that current generally increases with the substrate concentration until a plateau value is reached, following a Monod-like profile. The current plateau obtained at high fuel concentrations may be caused by saturation of the electro-microbial process or by physical limitations or by an increase in alternative (soluble) electron acceptors that compete with the anode [5,15,25]. This diversity of possible causes of limitations can explain the large range of half-saturation constant (Ks) values that have been reported. For mixed bacterial culture coming from domestic wastewater fuelled with monosaccharides, Ks values ranged from 111 to 724 mg $L^{-1}$ substrate [26]. In a two-chamber MFC inoculated with anaerobic sludge and fed with ethanol, Ks of 0.0149 mM was obtained, while a one-chamber MFC led to Ks = 4.86 mM [27]. A membrane-free single chamber MFC inoculated with domestic wastewater gave Ks = 43 mg $L^{-1}$ with acetate and Ks = 93 mg $L^{-1}$ with butyrate [15] while, in the same type of MFC fuelled with hydrolyzed corn stover , Ks of 170 – 347 mg $L^{-1}$ COD were obtained [24]. In a flat plate MFC inoculated and fed with domestic wastewater, Ks was between 461 and 719 mg $L^{-1}$ COD [28]. This short review shows the large range of values that Ks can take. They are difficult to compare because of the diversity of the "biofilm/substrate" systems and also the differences in cell designs [23].

Many different sources of inoculum have been tested, such as marine sediments [29,30], aerobic and anaerobic sludge [27,31], garden compost [32], rumen microorganisms [33], and yogurt bacteria [22]. Acclimation or adaptation of the inoculum has sometimes been performed in a specific phase or observed during MFC running [27,34,35]. The electro-activity of a microbial consortium can also be obtained by re-cultivating biofilm collected from a running MFC. Power densities of up to 3 W $m^{-2}$ have thus been obtained using glucose as the substrate in a two-chamber MFC [14].

The surface state of the electrodes has been found to be an important parameter affecting MFC performance, either because it affects the electrochemical properties of the electrode [36-38] or through its effect on biofilm formation. Ammonia gas treatment of anodes or their oxidation in sulphuric acid has been reported to affect bacterial adhesion or microbial communities in anode biofilms [36,39]. Temperature is also an important parameter, as for any microbial process. Nevertheless, attempts to correlate MFC performance with temperature [40] through a Van't Hoff-Arrhenius equation [41] did not lead to clear conclusions. Two thermophilic microorganisms tested in the range 30 to 70°C in a two-chamber MFC showed maximal efficiency at 50°C, whereas the performance decreased rapidly at 70°C [42].

The purpose of the present work was to optimize a microbial anode for the treatment of wastes from a yogurt production line. These wastes themselves did not form efficient EA biofilms in a reproducible way (data not shown). Consequently, it was decided to form biofilms from garden compost, which has proved to be a source of efficient electro-active (EA) microorganisms [43-46], and to study the capability of these biofilms to treat the yogurt wastes. Preliminary experiments performed by forming the biofilm first in solid garden compost as already reported [32] and then transferring the bioanode into solution caused the biofilm to lose its electro-active properties. A new procedure was tested here: microbial species were first extracted from the compost by

lixiviating it and the leachate obtained was then used to form EA biofilms in solution. The first experiments, which were performed in a two-chamber MFC, confirmed that cell design could drastically affect the assessment of anode efficiency. Consequently, most of the study was carried out under well-controlled electrochemical conditions. The objective was to find optimal procedures and parameters (electrode pre-treatment, inoculum adaptation, operating temperature and substrate concentrations) that allowed the best synergy between the biofilm formed from compost and the dairy waste to be treated.

## 2 Experimental

*2. 1 Electrochemical set-ups*

A two-chamber MFC was constructed by connecting two culture flasks (500 mL) through a glass tube equipped with a 3 cm diameter proton exchange membrane in the middle (Ultrex, CMI-7000 Membranes International Inc., USA). Graphite felt (2 cm x 5cm x 0.5 cm) and platinum mesh (2 cm x 5 cm) were employed as the anode and cathode respectively. The catholyte was a phosphate buffer solution of pH 6.7. The anolyte and catholyte were stirred with magnetic bars (350 rpm). Cell voltage and anode and cathode potentials vs. Ag/AgCl reference electrode were measured with a multimeter (Integra series 2700, Keithley Instruments, Inc. USA) interfaced with a computer. The MFC electrical circuit was closed with an external resistance of 1000 Ω, following a rule of thumb commonly used in studies dealing with similar experimental set-ups [21, 23]. It was observed that this value of the external resistance generally ensured power densities that were not far from the maximum during the test period. Power curves were plotted by varying the external resistance from 100 to 56,324 Ω over a 3-minute period.

Potentiostatic electrolysis and cyclic voltammetry were performed using a multichannel potentiostat (SVP, BioLogic Science Instruments SA, EC/Lab 2.0 software) in 100 to 150 mL electrochemical cells with a three-electrode set-up: graphite felt (2 cm x 5 cm x 1 cm or 2 cm x 2 cm x 1 cm) as the working electrode, saturated calomel (SCE) or Ag/AgCl as the reference electrode and platinum mesh (2 cm x 5 cm) as the counter-electrode.

*2.2 Inoculum, substrate and procedures*

Leachate from garden compost was used as the source of electrochemically active bacteria. NaCl solution (10 mM) was added to 1 L of garden compost to obtain a final volume of 3 L. This mix was placed in 2 L Erlenmeyer flasks and stirred for 24 h using magnetic bars. The mix was filtered through felt cloth and the filtrate was used as inoculum.

Yogurt waste (YW) was used as fuel. It was collected from the waste compaction process of a dairy firm and stored in bottles of 1.5 L at 3°C for a short period or was frozen for long-term storage. Substrate dilutions were made with phosphate buffer solution pH 6.7 (g $L^{-1}$): $Na_2HPO_4$, 2.75; $NaH_2PO_4$, 3.67; NaCl, 0.584.

When indicated, anode pre-treatment was carried out by adsorbing yogurt waste onto anodized graphite felt. Anodization was achieved in 150 mL buffer solution by imposing a potential of +1.5 V vs. SCE on the graphite felt for 2 minutes and then using cyclic voltammetry at 30 mV $s^{-1}$ in the limits -1.0 V to +1.0 V vs. SCE. This cycle was repeated 5 times. Pre-treatment was performed in a vessel containing 250 mL YW by 10 min sonication (water sonicator Transsonic 950 $H^{-1}$. 35 kHz. Prolabo, Germany) to encourage YW adsorption by homogenizing the suspension. Finally, the electrode was cleaned by 5 min sonication in 500 mL distilled water.

In temperature tests, electrochemical cells filled with 150 mL compost leachate were placed in temperature-controlled water baths at 10°C, 30°C, 40°C, 50°C and 60°C. Pre-treated anodes with adsorbed YW were used.

*2.3 Analysis*

Total Chemical Oxygen Demand (COD) was determined in anolyte samples using standard methods (Method 8000 for 0 – 1,500 mg $L^{-1}$ COD, HACH France S.A.S.). pH was measured with a pH-meter CG 882 (Schott Gerate GMBH). Conductivity was determined with a conductimeter (Metrohm 660, Swiss). Colonized felt graphite electrodes obtained from MFC studies were observed by SEM at 7.5 kV (Leo 435VP microscope, Germany, SRV-32 software). Samples were fixed with 4% glutaraldehyde solution, post-fixed with 2% $OsO_4$ solution, gradually dehydrated with acetone 50%, 70%, 100% solutions, and finally coated with gold.

Charge was calculated from chronoamperograms by integrating current over time. COD / mg $L^{-1}$, corresponding to the experimental charge observed, was estimated using the equation

$$COD = \frac{C \cdot MW_{O2}}{F \cdot n \cdot V} \qquad (1)$$

where C is experimental coulombs, $MW_{O2}$ is oxygen molecular weight (32,000 mg $mol^{-1}$), F is Faraday's constant (96,485 coulombs electron-$mol^{-1}$), n is the number of electrons transferred (4 electron-mol COD-$mol^{-1}$) and V is the reaction volume (0.15 L).

**3 Results and discussion**

*3.1 Performance of microbial fuel cells*

A two-chamber microbial fuel cell (MFC) was implemented with phosphate buffer solution, pH 6.7, as the catholyte and platinum mesh as the cathode. The anode compartment contained 500 mL of compost leachate prepared following the procedure described in the "experimental" section. The compost leachate was the source of the microbial population that formed the electrochemically active biofilm. The anode compartment was fed with 1 mL raw yogurt waste (YW) and the electrical circuit was closed through a 1000 Ω resistance. The power provided reached 45 mW $m^{-2}$ after around 11 days and was sustained for more than one week. From time to time the global behaviour of the MFC was characterized by changing the external resistance and recording the current provided. Plotting the power density provided for each resistance value as a function of the current density commonly gives a bell-shaped polarisation curve that allows the maximal power provided by the cell to be assessed. Polarization recorded on 17th day gave a maximal power density of 91 mW $m^{-2}$ with a current density of 400 mA $m^{-2}$. SEM pictures taken after 34 days' operation showed no obvious biofilm formation on the external surface of the electrode (Fig 1a). It was necessary to explore the fibre surface in depth to observe a weak microbial colonization, mainly with single cells or small spots in a monolayer structure (Fig. 1b). Such a poor colonization indicates that considerable improvement may be achieved by improving the colonization of the electrode surface.

The second MFC, designed with an anode pre-treated by YW adsorption and maintained at 40°C, gave similar performance with a stable value around 38 mW $m^{-2}$. Substrate additions of 1 mL YW generated only small increases in cell voltage. Compared with the first MFC, anode pre-treatment, higher temperature and adding substrate did not affect MFC performance. It was concluded that this MFC was not limited by factors linked to the bio-electrochemical kinetics at the anode but more probably by internal resistance. This kind of limitation in H-type MFCs has already been observed [23], because of too small a surface area of the membrane and deformation of the electric field by the geometry of two containers joined by a tube [47,48]. To overcome limitations due to MFC design, further studies were carried out with a standard three-electrode electrochemical set-up, under constant polarization at +0.1 V vs. SCE. The value of +0.1V vs. SCE was chosen for the potentiostatic experiments because this value ensured a fair development of electro-active biofilms [32,45] while not being unrealistically positive, the aim being to approach optimal operating conditions in the MFC.

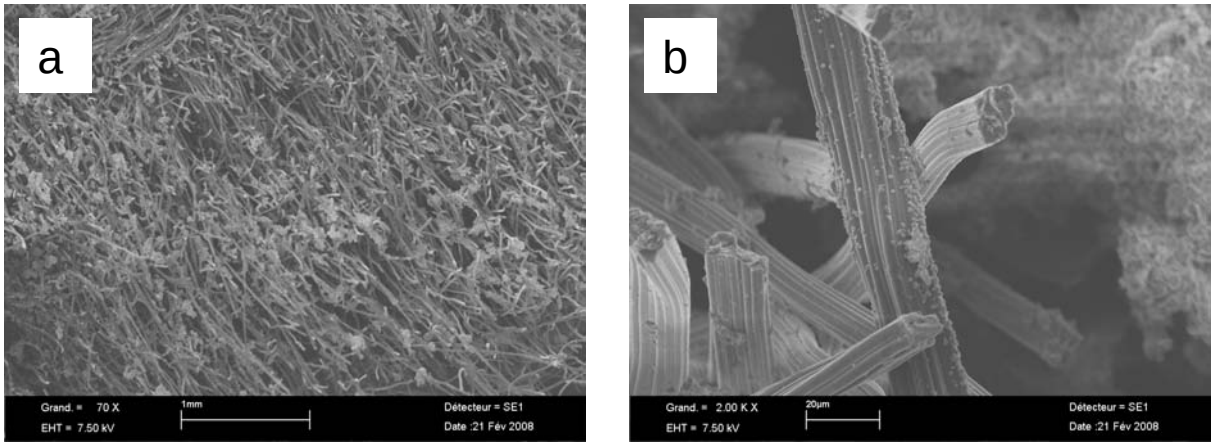



**Fig. 1** Scanning electron micrographs of the graphite felt anode in MFC. Compost leachate fuelled with yogurt waste operating for over 34 days at T = 25°C. (**a**) Anode surface, 70 X (**b**) Biofilm on graphite fibre, 2.0 KX

*3.2 Potentiostatic studies*

The effect of acclimation of the inoculum to YW was investigated. Five containers (n° 1 to 5) initially contained 100 mL compost leachate with 0.3 mL raw YW. Container n°1 was immediately equipped with 4 $cm^2$ graphite felt electrode polarized at +0.1V vs. SCE. At time t = 72 h, 0.3 mL YW was added to containers n°2 to 5 and container n°2 was equipped with a polarized graphite felt electrode. The same operation was repeated on containers n° 3 to 5 at time t= 144 h, then on containers n°4 and 5 at time t=216 h, and finally on container n°5 at t=312 h.

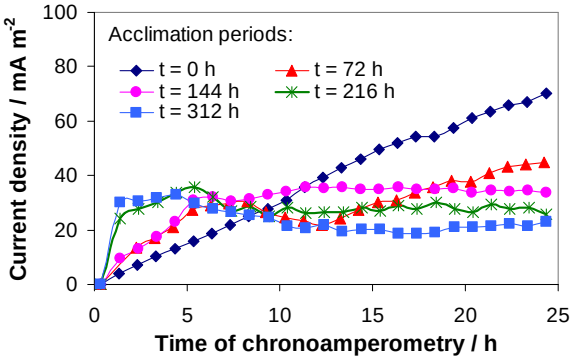



**Fig. 2** Effect on current generation of acclimation of the inoculum to yogurt waste substrate. Chronoamperogram on graphite felt polarized at +0.1 V vs. SCE in compost leachate, which had been acclimated for increasing periods from 0 h to 312 h. The x-axis gives the time from beginning of chronoamperometry. The acclimation periods that preceded chronoamperometry are given as the label of each curve.

The current density recorded during chronoamperometry is shown in Fig. 2 for the five different acclimation periods. Extended acclimation resulted in fast current increase at the beginning of the polarization. The current then showed an almost constant value throughout the chronoamperometry (24h). In contrast, the solution that was used for chronoamperometry just after mixing with YW produced a current that rose slowly but constantly and, after around 10 hours, overtook the current produced by the acclimated microbial populations. Inocula that were acclimated for longer periods before starting chronoamperometry gave faster initial current increases. It can be concluded that the acclimation phase induced the development of microbial species that were able to metabolize YW efficiently but the acclimated inocula were not able to sustain high current density. This behaviour was reproducible. The acclimation procedure of successive substrate addition resulted in substrate accumulation in the microbial environment. It is known that biofilm formation is enhanced by low substrate concentrations [49] and so the high substrate accumulation resulting from the successive additions probably hindered biofilm formation. High substrate concentrations enhance the growth of suspended microorganisms, promoting a fermentative microbial population rather than an anodophilic population [25]. Moreover, microorganisms aged in the vessel during the acclimation period and the microbial cells were probably no longer in their active growth phase when the electrode was plunged into the vessel. The cells were consequently in a less active state when the surface was made available to them. To sum up, the acclimation step produced microbial cells that were more active in metabolizing the organic matter contained in YW but it either favoured competitive oxidative pathways and/or resulted in detrimental cell ageing. As the actual gain of acclimation was only observed on the first few hours, further studies were carried out without an acclimation phase.

A series of experiments were performed by first forming the EA biofilm under chronoamperometry at +0.1 V vs. SCE in pure compost leachate for 2 days. Thereafter, the inoculum solution was eliminated and electrochemical cells were refilled with yogurt waste diluted 20, 50, 100, or 200 times in phosphate buffer, corresponding to 6 770±14, 2 855±106, 1 360±28 and 729±7 mg $L^{-1}$ COD, respectively. The fast current increase (Fig 3a) observed as soon as biofilm on the anode came into contact with YW dilutions confirmed the efficiency of the compost microorganisms in oxidizing organic matter contained in YW. The fastest current increases were observed with the lowest COD values. The high concentrations of YW clearly delayed the establishment of an active biofilm and also decreased the maximal current densities reached. The procedure consisting of two separate phases, biofilm formation followed by exposure of the anode to pure YW, revealed that low concentrations of this particular type of substrate increased current generation, contrarily to observations with other substrates [24,26-28]. Removing the microbial species coming from the inoculum reduced current density as compared with the acclimation test. At end of chronoamperometry, COD values were 594 ± 76, 285 ± 28, 250 ± 49, 91 ± 8 mg

COD $L^{-1}$ for dilutions 20, 50, 100 and 200 respectively, corresponding to COD removal of 91%, 90%, 81% and 87%.

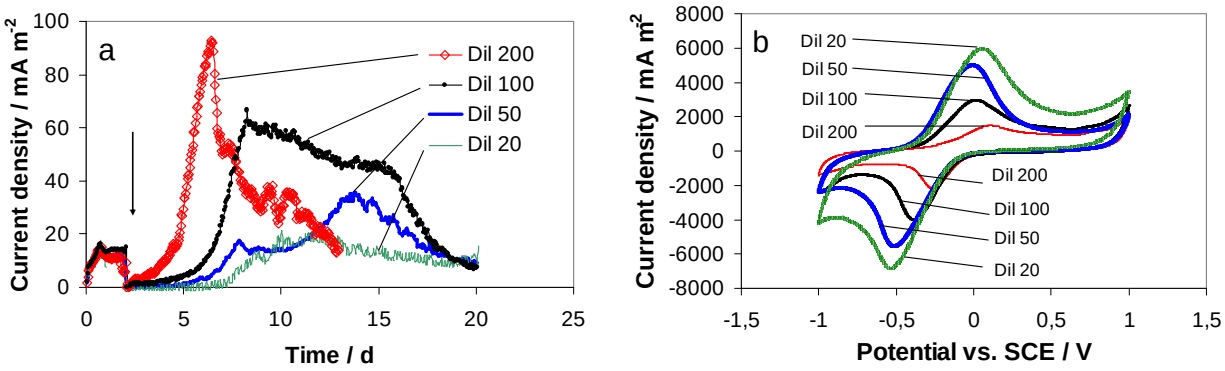



**Fig. 3** Influence of yogurt waste dilutions on anode performance. (**a**) Chronoamperometry on graphite felt polarized at +0.1 V vs. SCE. Arrow indicates removal of compost leachate from the electrochemical cells and refilling with dilutions (20 to 200 times) of yogurt waste (**b**) Cyclic voltammetry carried out at end of chronoamperometry, 13 and 20 days. Scan rate 10 mV $s^{-1}$

Cyclic voltammetry performed at days 13 and 20 showed close to reversible peaks, which were directly correlated with YW dilutions (Fig 3b). In contrast to what was observed in chronoamperometry, the current peak increased with COD concentration. Clearly, the current densities obtained in CV with a moderate scan rate (10 mV $s^{-1}$) were extremely high with respect to the current values recorded under chronoamperometry. This indicates that the two techniques addressed phenomena controlled by different limiting steps, as already reported with biofilm-covered electrodes [12,44]. Intermediate CV, performed from time to time by briefly interrupting chronoamperometry, indicated that current peaks increased with time. It can be concluded that the current peaks were either linked to the accumulation of metabolites in the reactor or to establishment of the biofilm. Such CV evolution may, for instance, be explained by the accumulation of an electrochemical mediator either linked to the cell or entrapped in the biofilm matrix. CV identified the quasi-reversible characteristics of this mediator, while chronoamperometry was limited by the rate of mediator oxidation by the microbial metabolism. Further investigations are needed to explain the surprisingly high currents obtained in CV. Nevertheless, the present work went ahead with a view to actually optimizing the electrode efficiency under chronoamperometry.

The surface state of the electrodes has been noted as an important parameter affecting MFC performance levels. A new procedure for biofilm formation was designed using pre-treated graphite felt. Pre-treatment consisted of graphite anodization followed by substrate (YW) adsorption. Then the electrode was polarized in 150 mL pure compost leachate (Fig. 4). Early on (two first days), a peak of current was observed with the YW pre-adsorbed anode, while the clean control anode did not provide any significant current. Adding 0.3 mL YW at the end of day 2 led to an immediate current increase on the clean anode, up to 600 mA $m^{-2}$, but the current dropped back to zero around day 8. In contrast, the pre-adsorbed anode presented a 3.5-day lag phase after YW addition but the current density then increased up to 1,000 mA $m^{-2}$. The charge generated by substrate addition (integrating the current as a function of time) was 138 and 607 coulombs for the clean and pre-adsorbed anodes respectively, which corresponded to 76 and 335 mg $L^{-1}$ COD consumed. The initial COD concentration was 792 ± 131 mg $L^{-1}$ COD on average. The pre-adsorbed anode allowed around 42% of the initial COD to be treated by the electrochemical process, while only 17% was treated when the biofilm was formed on a clean electrode.

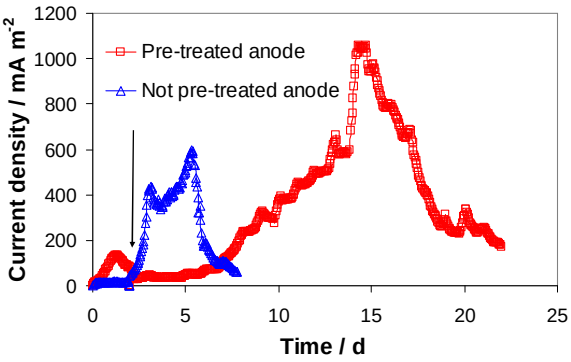



**Fig. 4** Effect of anode pre-treatment on current generation. Chronoamperograms on graphite felt pre-treated by yogurt waste adsorption (□) and control electrode not pre-treated (△). Polarization at +0.1 V vs. SCE in compost leachate. Arrow indicates yogurt-waste substrate addition

The initial small peak observed with the pre-treated electrode was easily explained by the oxidation of some adsorbed organic compounds by the forming EA biofilm. The differences that followed between pre-adsorbed and clean electrodes can be explained by the complex YW composition, including insoluble proteins, fatty acids and small solid particles, which masked a part of the electrode surface and/or modified its surface properties. It thus took longer for the settled bacteria to organize into a structured biofilm and to acquire the capability to provide current. This phenomenon is fully consistent with the delay in biofilm establishment that was observed with the higher concentration of YW in Fig. 3a. Actually, the effect of protein adsorption on biofilm formation is not clearly stated in the literature. It has been reported that casein enhances bacterial adsorption and albumin inhibits it [49]. On the other hand, the adsorption of non-soluble particles can induce mass transfer limitation during the early phase of biofilm formation, when the biofilm is composed of small colonies dispersed among the mineral and organic adsorbed matter. It took time for the biofilm to develop over the amount of adsorbed matter and to fully access the utilizable organic matter. Finally, although a few days were lost for biofilm formation, pre-adsorbing the substrate onto the anode surface was an effective strategy to increase long-term current generation and total substrate consumption.

The effect of temperature on MFCs has been dealt with in several studies [30,40,42,50]. Two thermophilic microorganisms tested in the range from 30°C to 70°C showed maximal efficiency at 50°C, whereas the performance decreased rapidly at 70°C [42]. Here, the effect of temperature was assessed in chronoamperometric conditions to reduce side-effects from other parameters as much as possible. Graphite felt electrodes were pre-treated by YW adsorption and polarized at +0.1 V vs. SCE in 150 mL compost leachate. Current generation increased until either a peak or plateau was reached due to adsorbed substrate. When the current began to fall (after 2-5 days), 0.3mL YW were added. The current density variation with time was highly dependent on temperature. A peak of current was observed at low and high temperatures of 10°C, 50°C and 60°C (Fig 5a), while two current peaks were observed at medium temperatures of 30°C and 40°C.

The maximal current densities obtained during the chronoamperometry at each temperature are reported in Fig. 5b (2 to 6 experiments for each temperature). The maximal current density increased with temperature from 10 to 40°C, reaching 1,452 ± 216 mA $m^{-2}$. Then it fell at 50°C and increased again at 60°C. Such a profile can be compared to the behaviour of composting processes, which enable the development of great diversity of mesophilic and thermophilic microorganisms [51]. It was observed here that 6 different experiments performed at 40°C gave a significant standard deviation, while the two experiments performed at 60°C gave exactly the same current/time variation (Fig. 5a). This may indicate a larger diversity of mesophilic microorganisms that showed electro-activity at 40°C, while only a few electro-active microorganisms were revealed at 60°C. Moreover, observation of two peaks at intermediate temperatures (30°C and 40°C) may also confirm a higher microbial diversity at medium temperature.

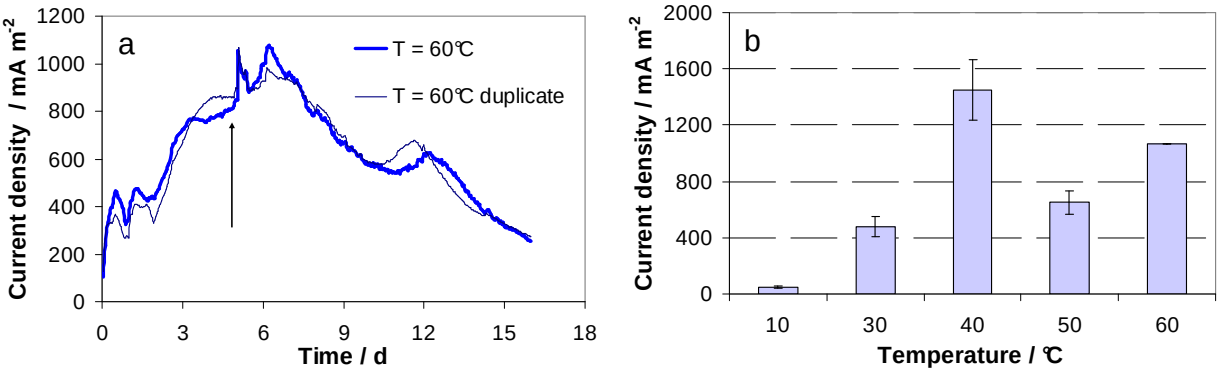



**Fig. 5** Effect of temperature on current generation. Graphite felt pre-treated by yogurt waste adsorption, polarized at +0.1 V vs. SCE in 150 mL compost leachate fuelled with 0.3 mL of yogurt waste (**a**) Example of chronoamperogram at 60°C. Arrow indicates substrate addition (**b**) Maximal current density reached at different temperatures. Error bars correspond to 2 to 6 replicates

The assumption was made that current generation was correlated with the microbial metabolism rate. Microbial electro-catalysis as a function of temperature was approached using the Arrhenius equation:

$$I \approx \mu = A \cdot \exp\left(\frac{-E_a}{RT}\right) \qquad (2)$$

where I is current (A), μ is specific microbial growth rate ($h^{-1}$), A is a constant ($h^{-1}$), Ea is the activation energy (J $mol^{-1}$), R is the ideal gas constant (8.317 J $mol^{-1}$ $K^{-1}$), T is temperature (K). Activation energy calculated from the maximal current values in the range 10-40°C was 85 kJ $mol^{-1}$. This value is in the same order of magnitude as Ea for bacterial growth at temperatures lower than that of maximal growth, 40-75 kJ $mol^{-1}$ [52]. It seems that Ea increases as growth temperature decreases, since Ea = 110 kJ $mol^{-1}$ is reported for bacteria in permafrost [52] and 25-57 kJ $mol^{-1}$ for species growing in the 31-40°C range [53]. Activation energy is a measure of microbial activity in response to temperature, in this case of electro-activity of the communities in compost leachate.

**4 Conclusions**

Garden compost has already been identified as an interesting source of efficient electro-active (EA) biofilms. Nevertheless, it was difficult to exploit the biofilms formed in garden compost by transferring them directly into solution. For the first time, a procedure is reported here that consists of lixiviating the compost and then using the leachate obtained as a microbial source. This procedure proved to be fully efficient to form electroactive biofilms.

Comparing different procedures for forming EA biofilms for the treatment of yogurt waste (YW) gave useful information on the way to optimize microbial anodes. Preliminary acclimation of the microbial flora did not prove to be useful; it was more important to work with microorganisms just after extraction from the compost. Forming biofilms firstly in pure leachate before exposing them to YW was also not the best procedure. In contrast, pre-treatment of the electrode by pre-adsorbing YW led to an increase in the current density by a factor of more than 10. Temperature around 40°C ensured the best performance, leading to current densities up to 1,450 mA $m^{-2}$ at +0.1 V vs. SCE. YW pre-adsorption was an excellent way to improve biofilm efficiency but some compounds of YW were suspected of having a detrimental effect on biofilm formation.

One of the most promising results of this study is certainly the new procedure based on using compost leachate rather than the raw medium. It should open up a new easy-to-handle route for exploiting the rich microbial flora contained in soils to form efficient EA biofilms. Investigations will be pursued to compare the microbial population of the biofilms formed following this new procedure to the population composing the EA biofilms formed directly in compost.

**Acknowledgments**

B. Cercado Quezada is supported by the European Union Programme of High Level Scholarships for Latin America (Program AlBan), scholarship No. E06D101223MX. The authors gratefully thank Luc Etcheverry (Engineer CNRS-LGC), Benjamin Erable (Researcher CNRS-LGC), Marie-Line DeSolan (Microscopy manager at LGC), Dr. Claire Albasi (Senior researcher CNRS-LGC) and Dr. Regine Basseguy (Senior researcher CNRS-LGC) for their efficient help.

**References**

1. Roller SD, Benetto HP, Delaney GM, Mason JR, Stirling JL, Thurston CF (1983) Proceedings of the international conference on the commercial applications and implications of biotechnology. Online Publications, London
2. Bond DR, Holmes DE, Tender LM, Lovley DR (2002) Science 295:483
3. Tender LM, Reimers CE, Stecher HA, Holmes DE, Bond DR, Lowy DA, Pilobello K, Fertig SJ, Lovley DR (2002) Nat Biotechnol 20:821
4. Logan B, Hamelers B, Rozendal R, Schröder U, Keller J, Freguia S, Aelterman P, Verstraete W, Rabaey K (2006) Environ Sci Technol 40:5172
5. Rabaey K, Rodriguez J, Blackall LL, Keller J, Gross P, Batstone D, Verstraete W, Nealson KH (2007) ISME J 1:9
6. Rozendal RA, Hamelers HVM, Rabaey K, Keller J, Buisman CJN (2008) Trends Biotechnol 26:450
7. Liu H, Ramnarayanan R, Logan BE (2004) Environ Sci Technol 38:2281
8. Liu H, Cheng S, Huang L, Logan BE (2008) J Power Sources 179:274
9. Erable B, Etcheverry L, Bergel A (2009) Electrochem Commun 11:6
10. Bergel A, Féron D, Mollica A (2005) Electrochem Commun 7:9
11. He Z, Angenent LT (2006) Electroanalysis 18:2009
12. Dumas C, Mollica A, Féron D, Basséguy R, Etcheverry L, Bergel A (2007) Electrochim Acta 53:468
13. Rabaey K, Read ST, Clauwaert P, Freguia S, Bond PL (2008) ISME J 1-9
14. Rabaey K, Lissens G, Siciliano S, Vestraete W (2003) Biotechnol Lett 25:1531
15. Liu H, Cheng S, Logan B (2005) Environ Sci Technol 39:658
16. Niessen J, Schröder U, Harnisch F, Scholz F (2005) Lett Appl Microbiol 41:286
17. Rezaei F, Richard TL, Brennan RA, Logan BE (2007) Environ Sci Technol 41:4053
18. Gil G, Chang I, Kim B, Kim M, Jang J, Park H, Kim H (2003) Biosens Bioelectron 18:327
19. Oh SE, Logan B (2005) Water Res 39:4673
20. Rabaey K, Clauwaert P, Aelterman P, Verstraete W (2005) Environ Sci Technol 39:8077
21. Heilmann J, Logan B (2006) Water Environ Res 78:531
22. Scott K, Murano C (2007) J Chem Technol Biotechnol 82:92
23. Min B, Kim JR, Oh SE, Reagan J, Logan B (2005) Water Res 39:49
24. Zuo Y, Maness P, Logan B (2006) Energy Fuels 20:1716
25. Freguia S, Rabaey K, Keller J (2007) 11th IWA World Congress on Anaerobic Digestion. Brisbane, Australia
26. Catal T, Li K, Bermek H, Liu H (2008) J Power Sources 175:196
27. Kim JR, Jung SH, Regan JM, Logan B (2007) Bioresour Technol 98:2568
28. Min B, Logan BE (2004) Environ Sci Technol 38:5809
29. Reimers CE, Tender LM, Fertig S, Wang W (2001) Environ Sci Technol 35:192
30. Mathis BJ, Marshall CW, Milliken CE, Makkar RS, Creager SE, May HD (2008) Appl Microbiol Biotechnol 78:147
31. Lee J, Phung N, Chang I, Kim B, Sung H (2003) FEMS Microbiol Lett 223:185
32. Parot S, Délia ML, Bergel A (2008) Bioresour Technol 99:4809
33. Rismani-Yazid H, Christy AD, Dehority BA, Morrison M, Yu Z, Tuovinen OH (2007) Biotechnol Bioeng 97:1398
34. Kim N, Choi Y, Jung S, Kim S (2000) Biotechnol Bioeng 70:109
35. Liu Z, Li H, Liu J, Su Z (2008) J Appl Microbiol 104:1163
36. Liu JL, Lowy DA, Baumann RG, Tender LM (2007) J Appl Microbiol 102:177
37. Niessen J, Schröder U, Rosenbaum M, Scholz F (2004) Electrochem Commun 6:571
38. Scott K, Rimbu GA, Katuri KP, Prasad KK, Head IM (2007) ICHemE 85:481
39. Cheng S, Logan BE (2007) Electrochem Commun 9:492
40. Liu H, Cheng S, Logan B (2005) Environ Sci Technol 39:5488
41. Tchobanoglous G, Burton FL (1991) Wastewater Engineering. Treatment, disposal, reuse, 3rd edn. McGraw-Hill International Editions, Singapore

42. Choi E, Jung H, Park S, Paik S, Jung S, Kim B (2004) Bull Korean Chem Soc 25:813
43. Niessen J, Harnisch F, Rosenabaum M, Schröder U, Scholz F (2006) Electrochem Commun 8:869
44. Dulon S, Parot S, Délia ML, Bergel A (2007) J Appl Electrochem 37:173
45. Parot S, Délia ML, Bergel A (2008) Electrochim Acta 53:2737
46. Parot S, Nercessian O, Delia ML, Achouak W, Bergel A (2009) Electrochemical checking of aerobic isolates from electrochemically active biofilms formed in compost. J Appl Microbiol (in press) doi:10.1111/j.1365-2672.2008.04103.x
47. Larminie J, Dicks A (2003) Fuel Cell Systems Explained, 2nd edn. Wiley Inc, London
48. Wendt H, Kreysa G (1999) Electrochemical Engineering. Springer-Verlag, Berlin
49. Characklis WG (1990) In: Characklis WG, Marshall KC (ed) Biofilms. John Wiley & Sons Inc, Toronto
50. Min B, Roman OB, Angelidaki I (2008) Biotechnol Lett 30:1213
51. Miyatake F, Iwabuchi K (2005) Bioresour Technol 96:1821
52. Buford P, Sowers T (2004) Proc Natl Acad Sci U S A 101:4631
53. Yongjun L, Yangjun D, Zhaodong N, Haitao S, Hongling Z (1997) J Therm Anal Calorim 50:897

## Résultats complémentaires de l'article : Voltampérogramme du biofilm de lixiviats de terreau sur feutre de graphite pour une dilution au 1/200 de résidus de laiterie

Des voltampérométries cycliques ont été effectuées pour chaque dilution en interrompant brièvement le cours des chronoampérométries. Les voltampérogrammes réalisés au début, près du maximum de densité de courant et à la fin de la chronoampérométrie ont mis en évidence deux pics d'oxydation et un pic de réduction (Fig IV.1).

Les pics d'oxydation se sont déplacés vers les potentiels négatifs, et l'augmentation de l'amplitude de ces pics pourrait correspondre à la formation dans le temps de métabolites qui favorisent la génération de courant.

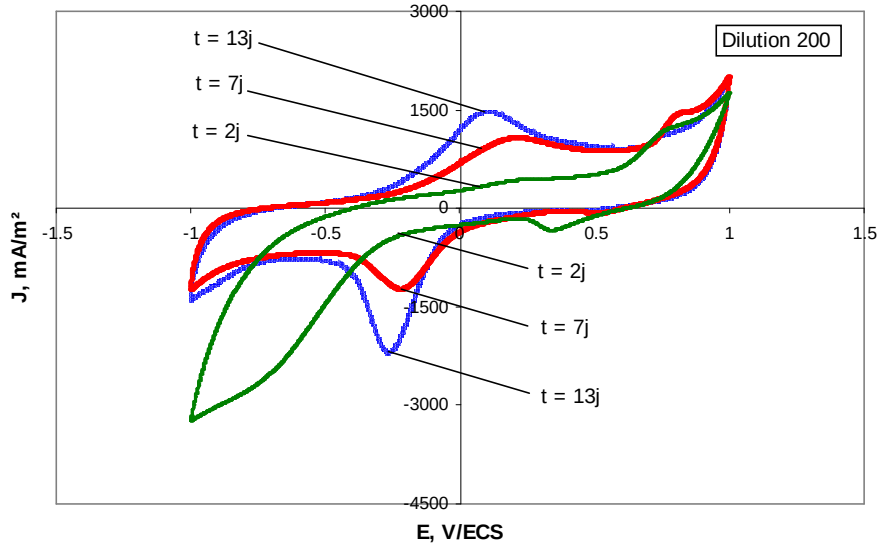



*Fig IV.1 Voltampérogrammes à différents temps pour des biofilms de lixiviats de terreau sur feutre de graphite en présence de résidus laitiers dilués au 200$^{ème}$ .*

### IV.2.2 Acclimatation cyclique du biocatalyseur au combustible

Des tests complémentaires à ceux qui apparaissent dans l'article ont été effectués. Le premier concerne l'adaptation du biofilm formé sur l'anode par l'ajout successif de résidus laitiers dans la cellule électrochimique.

Il a été observé que les performances des PACMs sont améliorées soit par l'adaptation du biocatalyseur au combustible (Kim et al. 2005), en utilisant du biofilm de l'anode d'une PACM précédente pour inoculer une nouvelle PACM (Rabaey et al. 2003), ou bien par des cycles successifs de charge par l'ajout de combustible et de décharge en faisant débiter la PACM (Heilmann & Logan, 2006 ; Kim et al. 2000). Etant donné que l'étape d'adaptation du biocatalyseur implique une consommation de temps et, dans une moindre mesure, de matière première (combustible), pour juger de la pertinence de cette approche, nous avons évalué l'effet du temps d'acclimatation des lixiviats de terreau aux résidus laitiers sur la génération de courant. Nous avons testé la procédure des ajouts successifs de combustible pour l'acclimatation du biocatalyseur. Pour cela nous avons utilisé une cellule électrochimique contenant un mélange de 150 mL de lixiviats de terreau et 300µL de résidus de laiterie, l'anode en feutre de graphite (2 x 5 x 1 cm) a été polarisée à +0,1V/ECS. Deux ajouts d'un volume identique de résidus laitiers ont été effectués aux 5$^{ème}$ et 13$^{ème}$ jours. Comme on l'observe sur la figure (Fig IV.2). chaque ajout provoque une augmentation de courant suivie d'une diminution de celui-ci

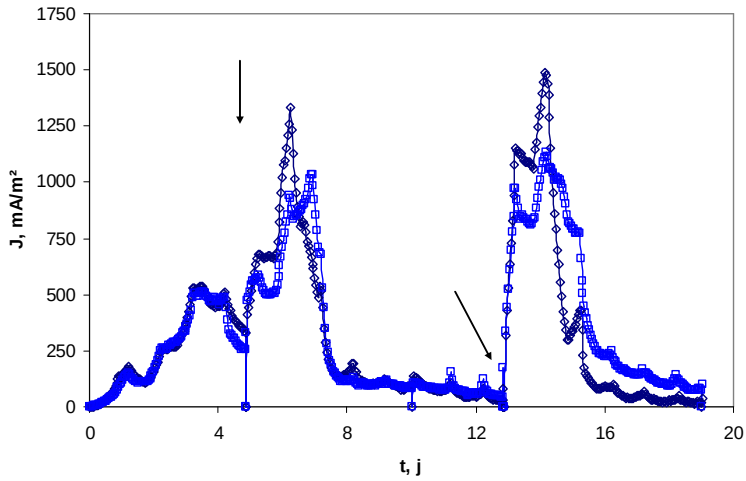



*Fig IV.2 Chronoampérogramme pour une électrode en feutre de graphite colonisée en présence de lixiviat de terreau à potentiel imposé +0,1V/ECS. Effet de l'acclimatation par ajouts successifs de résidus laitiers (ajouts indiqués par les flèches).*

La vitesse de production de courant (cinétique électrochimique-microbienne) que traduit la pente de la courbe de densité de courant par rapport au temps, a augmenté à chaque ajout de combustible. Ainsi, 523 ± 20 mA/m² ont été générés en 3 jours, une augmentation de 901 ± 145 mA/m² en 2 jours et de 1304 ± 246 mA/m² en seulement 1 jour, i .e. un courant légèrement plus élevé dans un temps plus court. Les microorganismes se sont adaptés favorablement aux ajouts successifs de résidus laitiers quand l'anode est polarisée dans le mélange biocatalyseur-combustible (qui simule le compartiment anodique d'une PACM en opération). Un épaulement a été observé juste après l'ajout de combustible. Si nous considérons la vitesse de production de courant au niveau de ces épaulements, les sauts de courant sont de plus en plus marqués, ainsi une augmentation immédiate de 337 ± 6 mA/m² est observée après le deuxième ajout et de 1062 ± 129 mA/m² après le troisième ajout de combustible. La cinétique a donc bien été améliorée, la charge observée a aussi augmenté de 106 ± 5 à 157 ± 6 puis à 205 ± 20 Coulombs à chaque ajout de combustible.

L'adaptation du biocatalyseur en circuit fermé par l'ajout successif de résidus laitiers améliore les performances de l'anode en deux points: la vitesse de production de courant et la charge totale produite. La maturité du biofilm développé a aussi eu un effet positif contrairement au vieillissement du biocatalyseur en suspension vu antérieurement.

### IV.2.3 Effet de la concentration en combustible dans un mélange biocatalyseur-combustible

Le deuxième test complémentaire a consisté à évaluer l'effet de la concentration en combustible sur la génération de courant. De petits volumes de résidus de laiterie de 100, 300, 900 et 2500 µL (dilutions 1/1500, 1/500, 1/167 et 1/60) ont été ajoutés aux cellules électrochimiques remplies de 150 mL de lixiviats de terreau. Les conditions les plus favorables déterminées précédemment ont été appliquées, soit : l'anode prétraitée par adsorption des résidus laitiers (Chapitre II, section 3.3.3) et une température de 40°C.
Ainsi un mélange de biocatalyseur et combustible a été évalué, dans un contexte différent de celui décrit dans l'article, où le biofilm préalablement développé a été immergé dans des dilutions de combustible.

Le biofilm a été développé pendant 1 jour dans les lixiviats de terreau sans ajout supplémentaire de résidus laitiers. La densité de courant dans cette période a varié de 200 à 500 mA/m² (Fig IV.3,A). Le premier jours, les volumes de résidus de laiterie ont été ajoutés et la densité de courant a augmenté jusqu'à une densité de courant maximale pour former un pic, ensuite le courant est descendu puis est remonté quelques jours plus tard pour former un deuxième pic (Fig IV.3,B).

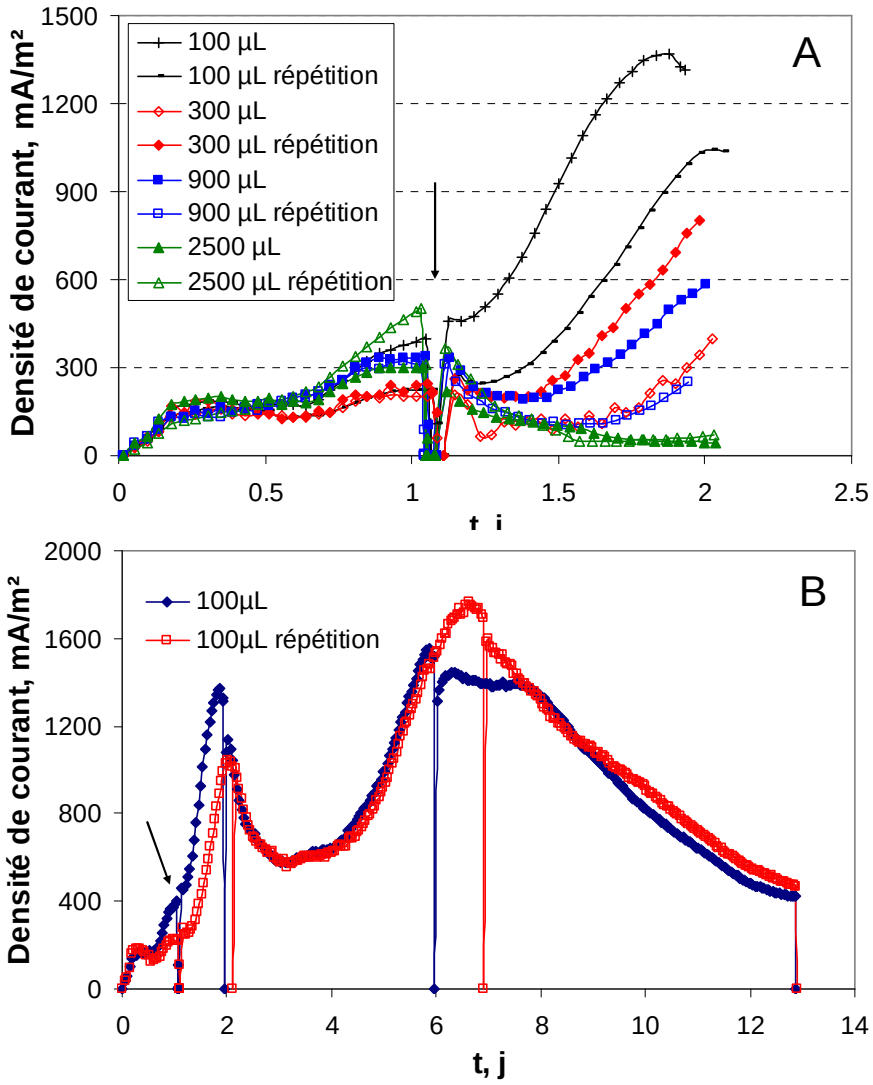



*Fig IV.3 Effet de la concentration en combustible, résidus laitiers sur la génération de courant dans un mélange biocatalyseur-combustible. Electrode en feutre de graphite prétraitée et T = 40°C. A) formation du biofilm dans des lixiviats de terreau. B) exemple de chronoampérogramme après l'ajout de 100µL de déchets laitiers. La flèche indique l'ajout de combustible. Potentiel imposé +0,1V/ECS.*

La réponse immédiate à l'ajout de résidus laitiers a montré que la génération de courant est inverse au volume de combustible ajouté. Le volume plus faible, 100µL, a généré une augmentation instantanée et continue de courant, par contre, après l'ajout de 2500 µL de résidus laitiers, le courant a diminué et est resté faible au moins pendant un jour. Le test s'est déroulé sur une durée de 14 jours et durant cette période la densité de courant des premiers pics a montré une variabilité importante, de 1009 à 1289 mA/m². Aucune corrélation entre le volume de combustible et le courant des premiers pics n'a été observée. Cependant la densité de courant des deuxièmes pics a diminué légèrement avec le volume de combustible. Ces derniers pics ont atteint des densités de courant plus élevées, de 1433 à 1796 mA/m² (Fig IV.4, A). Pour la concentration 2500µL, la réponse observée a été moins reproductible que pour les autres concentrations, l'écart entre les deux courbes est plus important ce qui explique les barres d'erreur plus grandes dans ce cas.

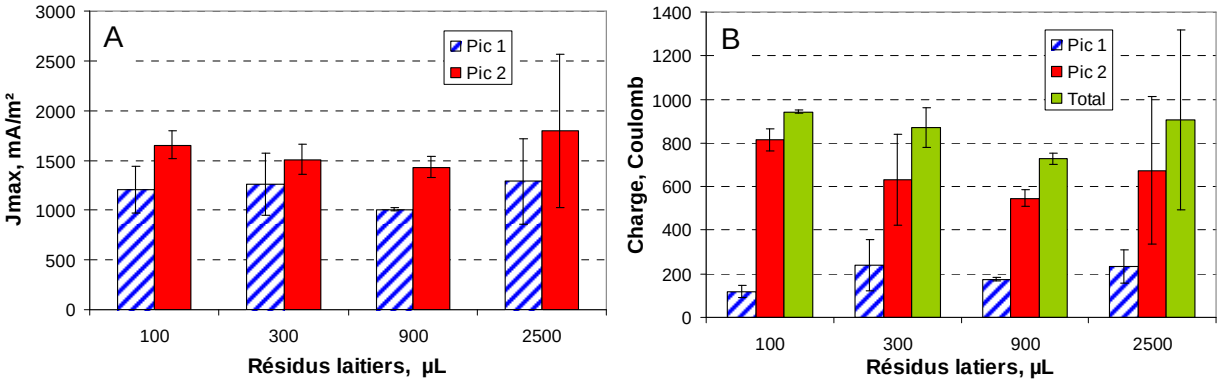



*Fig IV.4 Effet de la concentration en combustible résidus laitiers sur la génération de courant sur une électrode en feutre de graphite dans du lixiviat de terreau. A) valeurs des pics de densité de courant observés à potentiel imposé +0,1V/ECS ; B) quantité d'électricité des pics et totale observée.*

La présence de ces deux pics pourrait être due à deux conditions : soit il s'agit d'un profil diauxique de consommation du combustible qui est à l'origine de la génération de courant, soit elle résulte d'une succession de populations. La quantité d'électricité, de même que les pics de densité de courant, a diminué avec l'augmentation du volume de combustibles résidus laitiers ajoutés, (Fig IV.4, B). L'ensemble de résultats confirme qu'une concentration élevée en combustible complexe diminue les performances de l'anode comme nous l'avons observé auparavant (Article, Fig 3).

### IV.2.4 Effet des constituants de résidus de laiterie sur la génération de courant dans un système modèle : Caséine-Lactose-Ac. Humique.

Dans le Chapitre III, il a été démontré que les résidus provenant d'une chaine de fabrication de yaourts produisaient les meilleures performances tant pour un ensemencement avec des boues anaérobies qu'avec des lixiviats de terreau. Ces derniers s'avérant les plus performants, nous avons réalisé l'évaluation de constituants tant carbonés qu'azotés entrant dans la composition des résidus laitiers, i.e. le lactose et la caséine, avec du biofilm établi à partir de lixiviats de terreau afin de déterminer celui qui possède la meilleure influence sur la production de courant.

Le biofilm a été formé sur des électrodes en feutre de graphite (2 x 2 x 0,5 cm) polarisées à +0,1V/ECS dans des cellules électrochimiques contenant 100 mL de lixiviat de terreau complété à 10mM NaCl. Les électrodes avec le biofilm incubées pendant 2 jours ont été transférées dans les cellules électrochimiques contenant différents mélanges de solutions de lactose et de caséine. La caséine a été testée pour les concentrations (g/L) suivantes: 0; 1,5; 15 et le lactose pour les concentrations (g/L): 0; 0,5; 5. Les valeurs ajoutées moyennes de chaque constituant ont été déterminées à partir de la concentration mesurée dans les résidus laitiers (1,5 g/L caséine et 0,5 g/L lactose). Des acides humiques (1,5 g/L) ont été ajoutés à toutes les combinaisons testées pour favoriser la génération de courant (Thygesen et al. 2009).

Les chronoampérogrammes réalisés pour des électrodes en feutre de graphite pour chaque combinaison de concentrations en caséine – lactose ont montré qu'au démarrage de la génération de courant, la concentration de caséine a eu une forte influence. Deux groupes de chronoampérogrammes peuvent être distingués : en absence ainsi que pour la concentration maximale de caséine les densités de courant générées sont faibles, seule la valeur moyenne (1,5 g/L caséine) a permis une augmentation significative de la densité de courant (Fig IV.5).

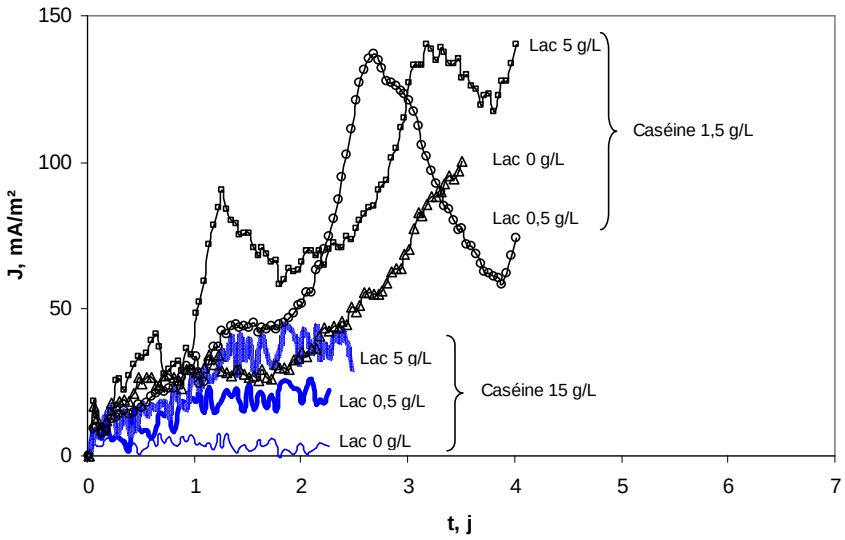



*Fig IV.5 Effet de la concentration en caséine sur la densité de courant au cours des premiers jours (phase de démarrage). Le biofilm est obtenu à partir de lixiviats de terreau sur feutre de graphite à potentiel imposé +0,1V vs Ag/AgCl.*

Sans limitation de lactose (5 g/L lactose), la génération de courant a présenté une phase de latence en absence de caséine et pour 1,5 g/L. Les pics de densité de courant atteignent des valeurs proches de 170 mA/m² (Fig IV.6). Par contre pour la concentration maximale de caséine (15 g/L) un profil quasiment plat sans génération de courant significative est enregistré soit un profil de type inhibition

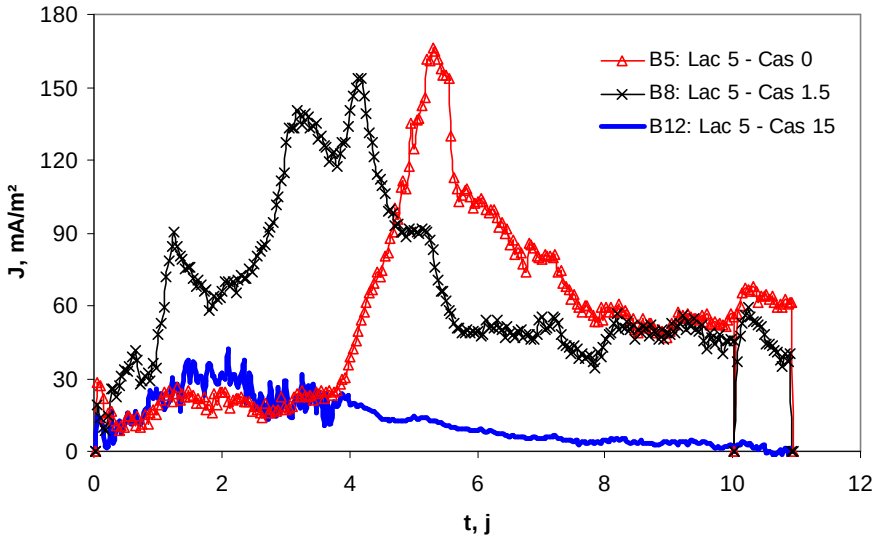



*Fig IV.6 Effet de la concentration de caséine sur la densité de courant pour la concentration la plus favorable en lactose. Biofilm obtenu à partir de lixiviats de terreau sur feutre de graphite à potentiel imposé +0,1V vs Ag/AgCl*

A partir des pics de densité de courant observés dans les chronoampérogrammes, l'évaluation des mélanges caséine – lactose sur la performance du biofilm issu de lixiviats de terreau a été faite. Même en absence de caséine ou de lactose, du courant est produit; ce qui signifie que dans tous les cas les protéines et/ou les sucres des résidus laitiers sont utilisés pour la production du courant. Les acides humiques ne permettent pas la production de courant comme cela peut être observé pour les concentrations nulles en caséine et en lactose dans la Fig IV.7, bien que certaines études aient observé un effet favorable de la présence de ces acides pour la génération de courant (Thygesen et al. 2009).

Une valeur de densité de courant extrêmement élevée a été observée pour les concentrations 0 g/L caséine et 0,5 g/L du lactose (1276 mA/m²). Nous avons décidé d'écarter cette valeur de la Figure IV.7 afin de visualiser la production de courant pour les autres conditions opératoires. Il semble que la présence d'un seul substrat favorise la génération de courant que ce soit la caséine seule et dans une moindre proportion le lactose seul. Cette observation pourrait renforcer l'hypothèse d'un comportement diauxique dans le cas d'un substrat complexe comme nous l'avons évoqué précédemment. Sans limitation en caséine (15 g/L caséine) le courant a augmenté de pair avec la concentration en lactose.

| Densité de courant (mA/m²) | | Lactose (g/L) | | |
|---|---|---|---|---|
| | | **0** | **0,5** | **5** |
| Caséine (g/L) | **0** | 7 | *1276* | 166 |
| | **1,5** | 330 | 137 | 154 |
| | **15** | 7 | 26 | 44 |

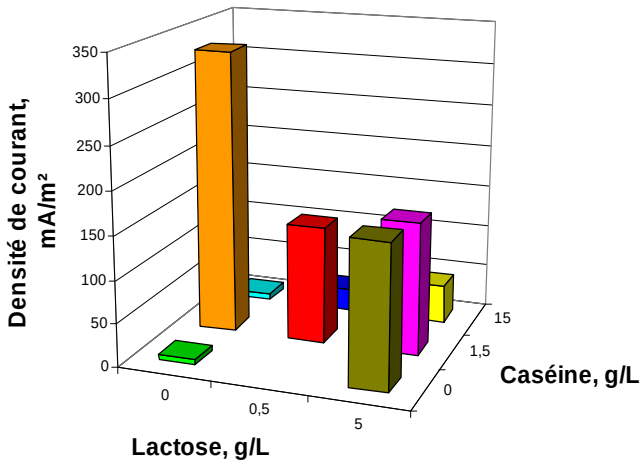



*Fig IV.7 Valeur des pics de densité de courant (mA/m²) générés pour les diverses concentrations de caséine et de lactose par du biofilm de lixiviats de terreau à potentiel imposé +0,1V vs Ag/AgCl. NB La valeur 1276 mA/m² n'est pas représentée sur la graphique.*

Néanmoins les fortes teneurs en caséine s'avèrent toujours défavorables pour la production de courant. Pour le même niveau de lactose (soit 0,5 ou 5 g/L lactose), la densité de courant est diminuée quand la concentration de caséine est augmentée. Cette observation est confirmée par les concentrations de COT plus élevées à la fin du test pour tous les niveaux de lactose et 15 g/L de caséine (Fig IV.8).

| COT (g/L) | | Lactose (g/L) | | |
|---|---|---|---|---|
| | | **0** | **0,5** | **5** |
| Caséine (g/L) | **0** | 50 | 38 | 71 |
| | **1,5** | 286 | 30 | 61 |
| | **15** | 416 | 447 | 440 |

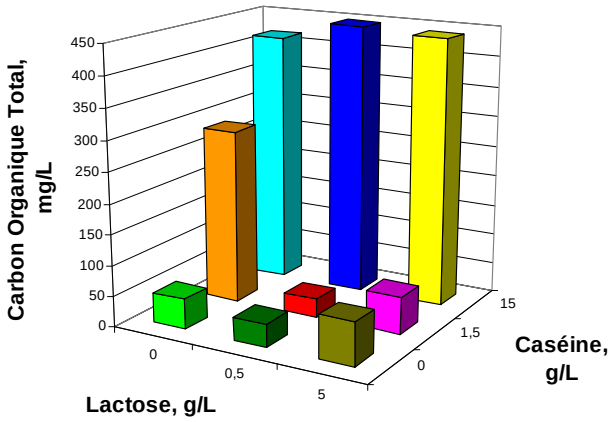



*Fig IV.8 Carbone organique total (mg/L) déterminé à la fin des tests dans le milieu synthétique de déchets de laiterie.*

La concentration en protéines a l'influence la plus importante lors du démarrage de la production de courant, l'analyse des pics confirme que des concentrations élevées en nutriments sont défavorables à la génération de courant. Des études en PACM avec des effluents d'une industrie d'emballage de viande comme biocatalyseur, ont montré que la densité de puissance produite par des protéines (sérum albumine bovine ou peptone) ou des effluents riches en protéines étaient généralement légèrement plus faible qu'en utilisant des combustibles simples comme de l'acétate et du glucose (Heilmann & Logan, 2006). Les auteurs indiquent que la puissance est corrélée à la complexité du combustible. La transformation des polymères en monomères, en acides gras volatiles ou simplement en molécules de consommation rapide par les microorganismes semble favoriser-accélérer la production de courant. De façon remarquable la concentration moyenne du lactose a généré une densité de courant du même ordre de grandeur (1270 mA/m²) que celle observée dans les études précédentes (effet du volume de combustible ajouté, de l'acclimatation cyclique du biocatalyseur, effet de la température et du prétraitement de l'anode) qui a variée entre 1000 et 1500 mA/m². Nous pouvons conclure que le premier pic de courant est lié à la consommation des protéines, tandis que le second pic est corrélé aux des sucres.

## IV.3 Etudes en ensemençant avec des boues anaérobies

Cette section du chapitre est consacrée aux essais d'ensemencement et de concentration de combustible en utilisant des boues anaérobies comme biocatalyseurs. Les conditions expérimentales sont similaires à celles des études avec les lixiviats de terreau.

### IV.3.1 Modification de l'état de surface de l'anode

L'adsorption de particules organiques (carbohydrates et protéines) sur des supports inorganiques, donne lieu à la formation d'un film conditionnant qui favorise le développement ultérieur du biofilm. Ce film conditionnant modifie les caractéristiques du support, par exemple, son hydrophobicité peut être diminuée et sa charge devenir négative. Ce phénomène a été observé en milieux naturels tels que des environnements marins et de rivière, mais aussi dans des installations industrielles où divers liquides circulent dans des tuyaux, notamment dans l'industrie alimentaire car les liquides contentant de la matière organique favorisent encore plus le développement de biofilm (Characklis et al. 1990).

Tenant compte de ces phénomènes, il a été décidé pour ce travail d'adopter une démarche de préconditionnement de l'électrode et d'en vérifier les effets. L'anode en feutre de graphite a été immergée dans des résidus de laiterie de façon à former un film conditionnant et ainsi favoriser la formation du biofilm. L'anode a été placée dans 250 mL de résidus laitiers et l'ensemble a été soniqué pendant 10 minutes, puis elle a été immergée dans 500 mL d'eau distillée sous ultra sons pendant 5 min. Des chronoampérométries à +0 ,3V/ECS ont ensuite été effectuées en cellules électrochimiques contenant 150 mL d'une suspension de boues anaérobies. Une chronoampérométrie de contrôle a été réalisée avec une anode adsorbée avec des résidus de laiterie mais en substituant le biocatalyseur par une solution de tampon phosphate.

La densité de courant a augmenté instantanément après la polarisation. La valeur la plus élevée (60 mA/m²) a été obtenue avec l'anode sans résidus laitiers adsorbés contrairement à ce que nous attendions. Cependant ce courant a diminué de façon constante jusqu'au moment où un ajout de combustible a été fait, alors le courant a commencé à augmenter. La densité de

courant initiale produite avec l'anode prétraitée a été moindre, 40 mA/m², néanmoins celle-ci a augmenté jusqu'à un pic de 90 mA/m². Dans ce cas, après l'ajout de combustible le courant a diminué pour re-augmenter le jour suivant et former un deuxième pic. En moyenne, le courant final observé a été de 50 mA/m² avec l'anode prétraitée et 70 mA/m² pour l'anode sans prétraitement (Fig IV.9).

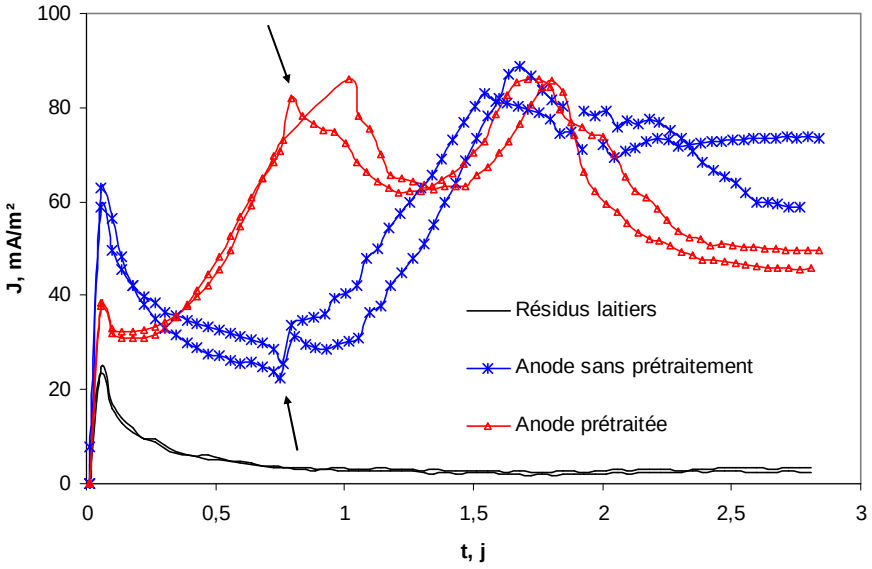



*Fig IV.9 Effet de l'adsorption des résidus de laiterie sur le feutre de graphite sur la génération de densité de courant. Biocatalyseur des boues anaérobies. Potentiel imposé +0,3V/ECS. Les flèches indiquent l'ajout de résidus de laiterie.*

Dans un premier temps une densité de courant initiale plus élevée avec l'anode propre par rapport à l'anode prétraitée pourrait être due à la rapide consommation-oxydation du combustible par les microorganismes qui commencent à adhérer sur une surface propre. Les résidus laitiers sur l'anode sont alors une limitation physique pour ces premières réactions. La réduction de densité de courant avec l'anode propre pourrait être due à une limitation de la concentration de ces composants qui sont consommés-oxydés près du biofilm en développement car le système n'est pas agité. Par contre, passé la première phase de développement, les microorganismes du biofilm en formation sur l'anode prétraitée, ont la source de nutriments immédiatement disponible pour l'oxydation et la génération de courant donc ils s'avèrent plus efficaces.

Le prétraitement de l'anode par adsorption du combustible avant connexion pour la génération de courant n'a pas montré d'avantages à l'issue des deux jours suivants l'ajout de combustible. Nous considérons que ce prétraitement n'est pas nécessaire avant le démarrage de la PACM lorsque des boues anaérobies sont utilisées comme biocatalyseur.

### IV.3.2 Influence de la concentration du combustible sur les performances de l'anode

Une cellule électrochimique à trois électrodes a été utilisée. L'électrode de travail est en feutre de graphite (2 x 2 x 0,5 cm), la contre-électrode est une grille de Pt (2 x 5 cm), et une électrode au calomel saturée (ECS) a été utilisée comme référence. Le volume initial de l'électrolyte est de 40 mL. Le potentiel est imposé à +0.3V/ECS. Initialement la cellule est remplie de solution tamponnée (pH 6.5) et le potentiel imposé quelques heures afin d'obtenir la ligne de base, ensuite le feutre de graphite est inoculé par l'ajout de 10 mL de boues anaérobies. L'électrode est laissée sous polarisation pendant 5 jours afin qu'un biofilm bactérien se développe à sa surface, ensuite la suspension microbienne est remplacée par des échantillons dilués d'un facteur 20, 50, 100 et 200 de résidus de laiterie. Un contrôle de la dilution 20 sans ajout du biocatalyseur est réalisé en même temps.

Les chronoampérogrammes peuvent être décomposés en trois sections, au début une ligne de base qui correspond à l'immersion dans la solution tamponnée, ensuite une section de courant faible généré après l'ensemencement et qui se poursuit pendant le développement du biofilm, à la fin une section de densité de courant plus élevée qui est occasionnée par le remplacement de la suspension d'ensemencement par la dilution du combustible (Fig IV.10).

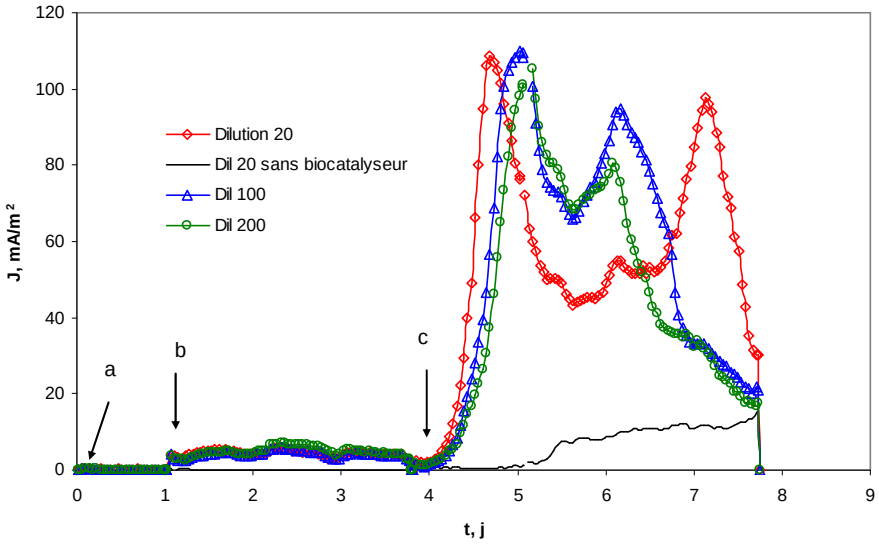



*Fig IV.10 Chronoampérogrammes pour des électrodes en feutre de graphite en présence de a) Solution tampon, b) Suspension de boues anaérobies, c) Dilutions de résidus laitiers. Potentiel imposé +0,3V/ECS.*

Sous polarisation à +0.3V/ECS, la densité de courant maximale observée pendant l'étape de formation du biofilm est de 7 mA/m². Lorsque la suspension bactérienne est remplacée par des dilutions de résidus laitiers, la densité de courant augmente jusqu'à des valeurs de 109, 26, 110, 101 mA/m² pour les milieux suivants: dilutions 20, 20-sans inoculum, 100 et 200 respectivement. Deux pics ont été observés dans les chronoampérogrammes pendant la consommation du combustible.

La pente des premiers pics de densité de courant observés en chronoampérométrie a montré une légère proportionnalité avec la dilution du combustible (Fig IV.10). La quantité d'électricité générée du jour 4 au jour 8 est de 7, 3, 7, 6 Coulomb pour les dilutions considérées. On peut conclure que la génération de courant n'a pas été affectée par la concentration en combustible quand des boues anaérobies ont été utilisées comme biocatalyseurs.

D'autre part, les voltampérogrammes ont montré des pics d'oxydation autour de 0,1V/ECS et de réduction pour -0,25V/ECS (Fig IV.11, A). Nous pensons que ces pics ont un rapport avec la biocatalyse de l'oxydo-réduction du combustible par le biofilm, car ils augmentent avec la concentration du combustible et apparaissent diminués dans le contrôle sans inoculum de la dilution 20. Les voltampérogrammes déterminés pendant la chronoampérométrie pour chaque dilution montrent que le pic d'oxydation se déplace vers les potentiels négatifs et que l'amplitude du pic devient plus grande pendant la polarisation. L'exemple obtenu pour la dilution 20 est présenté dans la Fig IV.11,B. Donc nous pouvons affirmer que la maturation du biofilm au cours du temps permet l'amélioration de l'anode.

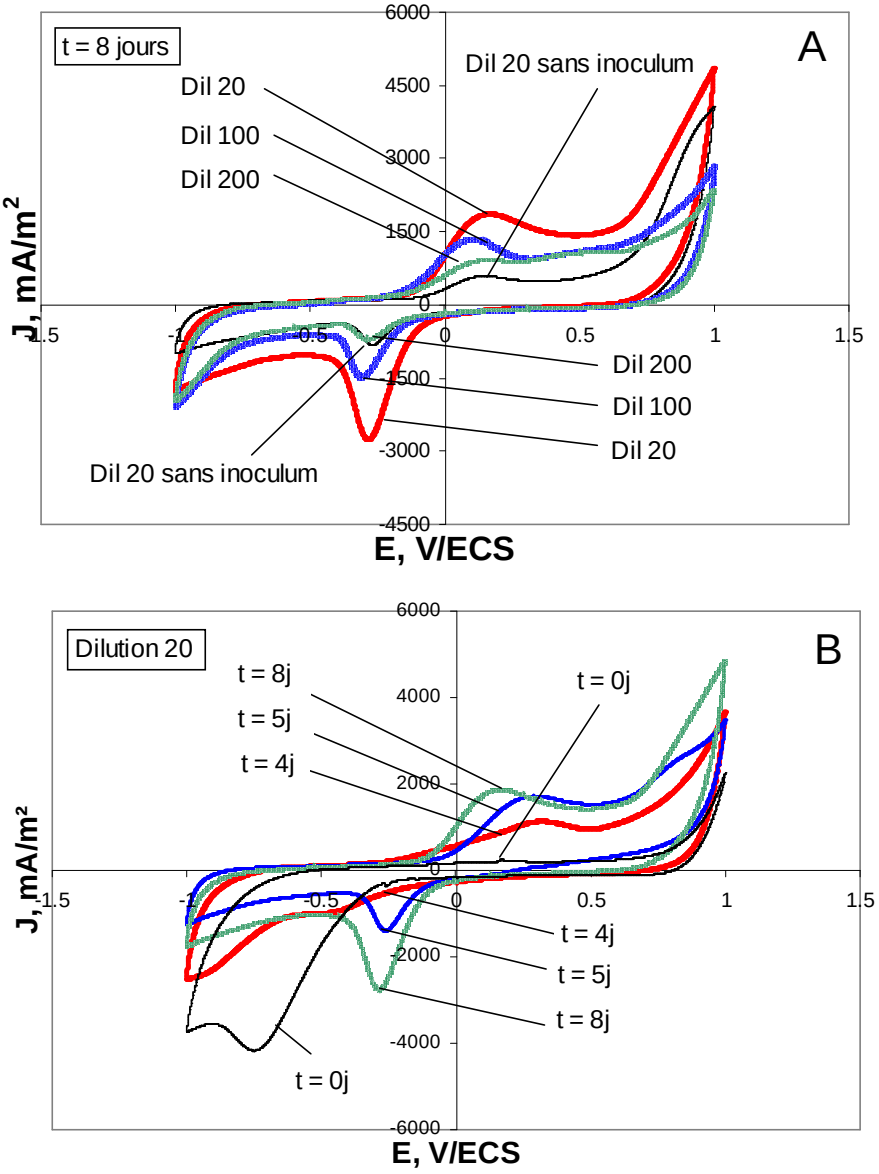



*Fig IV.11 Voltampérogrammes pour des biofilms de boues anaérobies sur du feutre de graphite A) de différentes dilutions de résidus laitiers, cycles effectués pendant la chronoampérométrie au 8$^{ème}$ jour. B) évolution des cycles pendant la chronoampérométrie, exemple de la dilution 20.*

## IV.4 Comparaisons des performances des biocatalyseurs

Les performances des anodes avec des boues anaérobies et des lixiviats de terreau comme biocatalyseurs des systèmes décrits dans les sections précédentes ont été comparées. Il a été considéré la génération de courant observé par chronoampérométrie ainsi que par voltampérométrie cyclique, et le rendement faradique a été déterminé.
D'autre part, un bilan de la biodépollution obtenue dans les mêmes systèmes, a été effectué en termes d'abattement de la DCO et des protéines.

### IV.4.1 Performance électrique : Rendement faradique

A partir des chronoampérogrammes, le rendement faradique (RF) a été calculé avec la relation RF = $Coulomb_{expérimental}/Coulomb_{théorique.}$, $Coulomb_{expérimental}$ est obtenu par l'intégration de la courbe de densité du courant dans le temps; $Coulomb_{théorique}$ est calculé à partir de la quantité de combustible consommé, déterminée comme la variation en DCO (△DCO), avec l'équation IV.1

$$Coulomb_{théorique} = \frac{F \cdot n \cdot \Delta DCO \cdot V}{M} \qquad \text{Eq IV.1}$$

Où F est la constante de Faraday (96485 Coulomb/mol), n est le nombre d'électrons transférés (4 électron-mol/mol DCO), V est le volume de la cellule électrochimique (0,05 ou 0,10 L), M est le poids moléculaire de l'oxygène (32 g/mol).

Le rendement faradique est calculé pour chaque dilution dans le Tableau IV.I. Les valeurs de densité de courant maximal observées en voltampérométrie et les valeurs observées en chronoampérométrie sont indiquées.

Tableau IV.1 Performances des anodes pour différents biocatalyseurs : boues anaérobies et lixiviats de terreau, alimentées avec des résidus laitiers.

| Dil | Maximum de densité de courant en chronoampérométrie (mA/m²) | Pic d'oxydation en voltampérométrie (mA/m²) | Coulomb théorique | Coulomb expérimental | Rendement Faradique % |
|---|---|---|---|---|---|
| | BOUES ANAEROBIES | | | | |
| 20 | 156 | 1839 | 1947 | 12 | 0,63 |
| 50 | 119 | 1503 | 470 | 6 | 1,2 |
| 100 | 129 | 1357 | 385 | 8 | 2,1 |
| 200 | 131 | 1065 | 110 | 7 | 6,6 |
| | LIXIVIATS DE TERREAU | | | | |
| 20 | 21 | 5962 | 11173 | 6 | 0,05 |
| 50 | 35 | 4976 | 4650 | 9 | 0,19 |
| 100 | 62 | 2954 | 2009 | 20 | 0,99 |
| 200 | 93 | 1471 | 1155 | 12 | 1,03 |

Dans le cas des boues anaérobies, les données suggèrent que la densité de courant augmente avec la concentration du combustible, ce qui est confirmé par la pente observée dans le chronoampérogramme ainsi que le pic d'oxydation du voltampérogramme (Fig IV.12A). De plus, le rendement faradique augmente avec les faibles concentrations en combustible, comme cela a déjà été observé par d'autres auteurs (Heilmann and Logan, 2006; Min et al. 2005).

L'augmentation du rendement faradique avec la diminution de la concentration de combustible a été également observée sur le système lixiviat de terreau – résidus laitiers. (Table IV.1). Nous pouvons remarquer que les rendements faradiques du système lixiviats de terreau sont inférieurs à ceux obtenus avec les boues anaérobies. Dans ce sens, les boues anaérobies sont considérées comme étant un meilleur biocatalyseur.

Les Coulomb expérimentaux ont été du même ordre de magnitude (6 à 20 Coulomb) avec les deux biocatalyseurs, ce qui signifie que les deux flores semblent posséder des capacités équivalentes de production d'électricité mais en termes de rendement faradique, les boues anaérobies semblent plus efficaces.

Afin de comparer, la Fig IV.12 montre côte à côte les chronoampérogrammes obtenus avec les boues anaérobies et les lixiviats de terreau en oxydation pour des résidus laitiers dilués. Si la quantité d'électricité ne semble pas être affectée par le niveau de dilution du combustible,

les profils des chronoampérogrammes ont permis de détecter une cinétique électro-microbienne différente entre les deux biocatalyseurs.

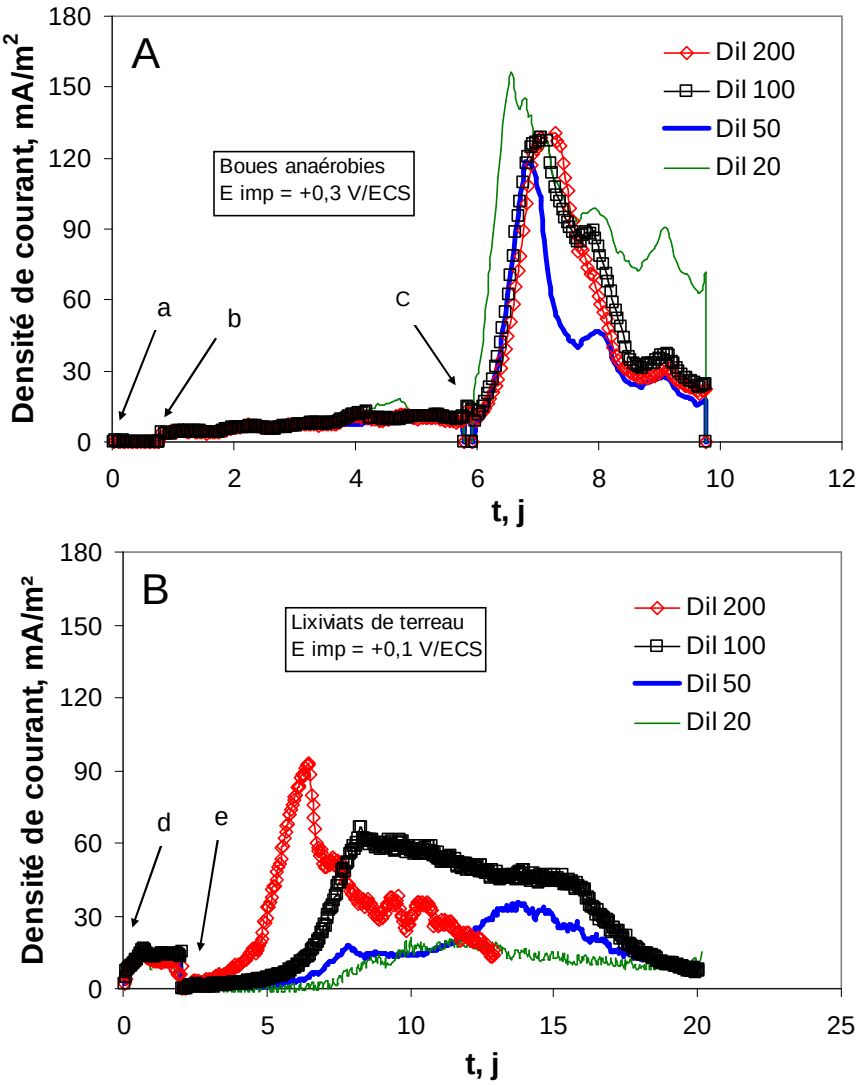



*Fig IV.12 Effet de la concentration en combustible sur la génération du courant. Essais en cellule électrochimique avec feutre de graphite à potentiel imposé. A) boues anaérobies à +0,3 V/ECS en présence de : a) solution tampon b) suspension de boues c) dilutions des résidus laitiers. B) lixiviats de terreau à +0,1V/ECS en présence de : d) suspension de lixiviats de terreau e) dilutions des résidus laitiers.*

## IV. 4. 2 Performance de la biodépollution : Abattement de la DCO et de la concentration en protéines

Des analyses de DCO et de teneur en protéines ont permis d'estimer l'abattement de la pollution au cours des essais concernant la concentration en combustible. La DCO et la concentration en protéines ont diminué pour toutes les dilutions testées tant pour les expériences menées avec les boues anaérobies que pour celles avec les lixiviats de terreau (Fig IV.13 ; Tableau IV.2).

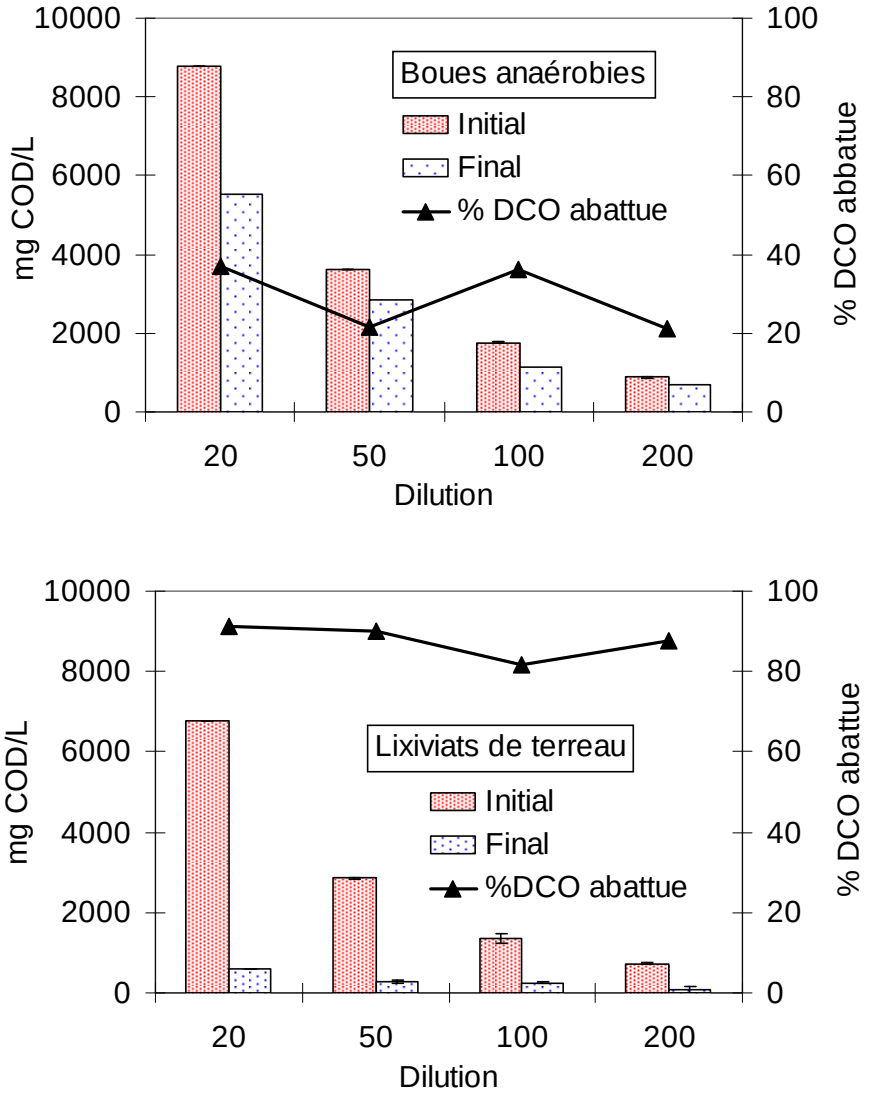



*Fig IV.13 Abattement de la DCO dans des résidus laitiers en fonction du biocatalyseur utilisé.*

L'efficacité de la biodépollution de résidus organiques par des PACMs a été rapportée par plusieurs auteurs sur des combustibles divers. A partir d'eau résiduaire urbaine, Min et al. (2005) ont obtenu un pourcentage de biodépollution en DCO de 27% ; Oh et al. (2005) ont utilisé des effluents d'une industrie des céréales et ont obtenu un abattement de 95%. Heilmann & Logan (2006) pour des effluents à forte charge organique, effluents de transformation et emballage de la viande, ont atteint une biodépollution de 86% en DCO et de 90% en protéines; enfin Zuo et al. (2006), en hydrolysant de la paille de maïs afin d'utiliser les hydrolysats comme combustible pour la PACM, sont parvenus à une diminution de 60 – 70% de la DCO.

Les pourcentages de dépollution observés au cours de cette étude (Tableau IV.2) indiquent que l'abattement en DCO obtenue avec les boues anaérobies a été faible par rapport à la gamme des valeurs rapportées dans la bibliographie et par rapport à celle obtenue avec les lixiviats de terreau qui se situe dans le haut de la gamme (Oh et al 2005). Les micro-organismes provenant du terreau montrent de meilleures performances ; la flore du terreau est peut-être plus diverse et possède une meilleure capacité d'oxydation des résidus laitiers mais sans nécessairement être électroactive. Par ailleurs, ces résultats sont aussi affectés par la durée des essais; 4 jours pour la chronoampérométrie avec les boues, tandis que celle avec les lixiviats de compost a une durée 18 jours (Fig. IV.12), soit une période plus longue qui a permis un abattement de pollution supérieur.

Tableau IV.2 Biodépollution des résidus laitiers en cellule électrochimique avec une anode en feutre de graphite pour différents biocatalyseurs : soit des boues anaérobies (Potentiel imposé +0,3V/ECS) soit des lixiviats de terreau (Potentiel imposé +0,1V/ECS)

| | BOUES ANAEROBIES | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Dilution | DCO (mg/L) | | | Protéines (mg/L) | | |
| | Initial | Final | Abattement % | Initial | Final | Abattement % |
| 20 | 8770 ± 0 | 5540 | 36 | 1275 ± 47 | 721 ± 3 | 43 |
| 50 | 3620 ± 6 | 2840 | 21 | 518 ± 46 | 376 ± 32 | 27 |
| 100 | 1760 ± 28 | 1122 | 36 | 384 ± 94 | 144 ± 3 | 62 |
| 200 | 874 ± 5 | 691 | 21 | 204 ± 107 | 62 ± 59 | 69 |
| | LIXIVIATS DE TERREAU | | | | | |
| Dilution | DCO (mg/L) | | | Protéines (mg/L) | | |
| | Initial | Final | Abattement % | Initial | Final | Abattement % |
| 20 | 6770 ± 14 | 594 ± 76 | 91 | 201 ± 17 | 55 ± 8 | 73 |
| 50 | 2855 ± 106 | 285 ± 29 | 90 | 126 ± 7 | 33 ± 5 | 74 |
| 100 | 1360 ± 28 | 250 ± 49 | 82 | 88 ± 0,1 | 63 ± 16 | 28 |
| 200 | 729 ± 7 | 91 ± 8 | 88 | 50 ± 0,0 | 57 ± 27 | 0 |

Une légère différence de la DCO initiale a été observée entre les deux biocatalyseurs en raison de la différence des échantillons de résidus laitiers utilisés ; malgré cette légère différence nous n'avons observé aucun rapport entre la concentration de combustible et l'efficacité de biodépollution. Ce résultat corrobore ceux que Zuo et al (2006) ont obtenus pour des hydrolysats de maïs dans la gamme de DCO initiale de 250 à 1000 mg/L. Cependant d'autres auteurs rapportent une augmentation de la biodépollution avec l'augmentation de la concentration en combustible ; ces différences pourraient être dues à l'ordre de magnitude de la charge organique testée. Les dilutions de résidus laitiers correspondaient à une DCO entre 800 et 8700 mg/L (forte charge), alors que les études mentionnées font état d'une DCO entre 0 et 350 mg/L (Min & Logan, 2004).

Enfin, l'abattement en protéines observé oscille entre des valeurs allant de 30 à 70 % d'abattement, sans être corrélées à la concentration en combustible. Heilmann & Logan (2006) trouvent un abattement en protéines de 94% pour une PACM d'une chambre avec des effluents d'emballage de viande comme biocatalyseur, de la peptone et du sérum d'albumine bovine comme combustible.

## IV.5 Conclusions

Dans ce chapitre différentes procédures d'optimisation ont été menées sur le système lixiviats de terreau comme biocatalyseur et résidus laitiers comme combustible.

L'étape de démarrage des PACMs inclue fréquemment l'acclimatation du biocatalyseur au combustible, les études menées ici ont révélé cette procédure inutile. L'utilisation immédiate du mélange lixiviats de terreau - résidus laitiers a permis une génération de courant continue et supérieure à celle des biocatalyseurs acclimatés. Une autre stratégie pour améliorer le démarrage est la préparation des anodes. Dans ce cas nous avons trouvé que la simple adsorption des résidus laitiers sur l'anode, avant ensemencement par le biocatalyseur, a produit une augmentation de la quantité d'électricité et du maximum de densité de courant, en conséquence cette méthode a été conservée pour les essais postérieurs.

Etant donné que, dans le cadre de ce travail, cette biotechnologie est focalisée également sur l'aspect biodépollution, il serait souhaitable de traiter des concentrations élevées de matière organique. Malheureusement, les résidus laitiers à fortes concentrations se sont révélés défavorables à la génération de courant. Leur composition complexe semble gêner le développement ainsi que l'activité du biofilm. Cependant ces réponses ne sont pas constantes, et sont influencées par la nature du biocatalyseur. Dans le cas d'un ensemencement par des boues anaérobies l'effet négatif des concentrations élevées en résidus laitiers n'a pas été observé. Cette analyse démontre que dans le cas du traitement des effluents industriels par PACM, une sélection adéquate du biocatalyseur devra être effectuée en fonction des caractéristiques de l'effluent. Des tests préliminaires pourraient être effectués avec les biocatalyseurs communément utilisés en évaluant simultanément par chronoampérométrie la capacité des effluents à traiter à fournir des microorganismes électroactifs.

Ayant observé l'effet négatif des concentrations élevées des résidus laitiers, une étude approfondie portant sur l'influence des constituants de ces résidus sur la génération de courant a permis de détecter que la caséine a une influence marquée pendant le démarrage de production de courant, alors que le lactose contrôle le courant produit par la suite.

Le niveau de biodépollution en termes d'abattement de la DCO atteint 80 – 90% avec les lixiviats de terreau, ce qui le situe parmi les plus hauts niveaux de dépollution reportés dans la bibliographie. Malheureusement, le rendement faradique associé, bien qu'il augmente avec les faibles concentrations en combustible, est resté faible par rapport aux boues anaérobies et aux systèmes étudiés par les autres auteurs. Ceci confirme la limitation toujours présente pour les PACMs : le faible rendement faradique.

Par la suite, l'étude de l'effet de la température sur les performances de l'anode, a révélé deux groupes électroactifs, l'un à 40°C et l'autre à 60°C. Ces résultats confirment la richesse de la microflore électroactive présente dans le terreau.

Enfin, toutes les conditions favorables déterminées par les essais antérieurs ont été alors réunies, un démarrage avec des lixiviats de terreau non acclimatés, l'utilisation d'une anode prétraitée par adsorption des résidus laitiers, la plus forte dilution du combustible et une température opératoire de 40°C. Ainsi une densité de courant maximale de 1.7 A/m² a été obtenue.

## IV.6 Références

Characklis WG, Marshall KC (1990) "Biofilms" John Wiley & Sons Inc. Toronto.

Heilmann J, Logan B (2006) Production of electricity from proteins using a microbial fuel cell. *Water Environ. Res*. 78(5):531-537.

Kim N, Choi Y, Jung S, Kim S (2000) Effect of initial carbon sources on the performance of microbial fuel cells containing *Proteus vulgaris. Biotechnol. Bioeng*. 70(1):109-114.

Kim JR, Min B, Logan BE (2005) Evaluation of procedures to acclimate a microbial fuel cell for electricity production. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 68:23-30.

Min B, Logan BE (2004) Continuous electricity generation from domestic wastewater and organic substrates in a flat plate microbial fuel cell. *Environ. Sci. Technol*. 38(21):5809-5814.

Oh SE, Logan B (2005) Hydrogen and electricity production from a food processing wastewater using fermentation and microbial fuel cell technologies. *Water Res*. 39:4673-4682.

Korneel R, Geert L, Steven S, Willy V (2003) A microbial fuel cell capable of converting glucose to electricity at high rate and efficiency. *Biotechnol. Lett*. 25:1531-1535.

Thygesen A, Poulsen F, Min B, Angelidaki I, Thomsen AB (2008) The effect of different substrates and humic acid on power generation in microbial fuel cell operation. *Bioresour. Technol*. 100:1186-1191.

Zuo Y, Maness P, Logan B (2006) Electricity production from steam-exploded corn stover biomass. *Energy Fuels*. 20:1716-1721.

# CHAPITRE V

# Evaluation des performances de piles à combustible microbiennes

V.1 Introduction 121

V.2 Performances des biocatalyseurs dans une PACM avec de l'acétate comme combustible modèle 122

V.2.1 Pile inoculée avec des boues de station d'épuration 123
V.2.2 Pile inoculée avec des lixiviats de terreau 126

V.3 PACMs inoculés avec des boues alimentées en déchets agro-alimentaires 130

V.3.1 Procédure de démarrage des piles 130
V.3.2 Performances comme fonction de l'agitation, ajout de combustible et rapport biocatalyseur/combustible 132

V.4 PACMs inoculées avec des lixiviats de terreau alimentés en déchets agro-alimentaires 137

V.4.1 Présentation de l'article "Testing different food industry wastes for electricity production in MFC" 137
V.4.2 Article "Testing different food industry wastes for electricity production in MFC" 138

V.5 Biodépollution emmenée par les PACMs 161

V.5.1 Abattement de la DCO et rendement faradique 161
V.5.2 Conversion idéale d'énergie chimique en énergie électrique 163

V.6 Evaluation de la PACM inoculé avec des lixiviats de terreau alimentés en déchets de laiterie en conditions opératoires optimales 164

V.7 Conclusions 168

V.8 Références 169

## V.1 Introduction

Les chapitres antérieurs ont dégagé une procédure pour sélectionner des media qui peuvent servir tant comme biocatalyseur que comme combustible dans une PACM. Cette sélection a été faite en utilisant des techniques électrochimiques, la chronoampérométrie, principalement, et la voltammétrie cyclique. Les résidus laitiers et les lixiviats de terreau se sont ainsi relevés comme des media contenant une flore électro-chimiquement active assez importante pour être valorisée en PACM. Par la suite, les conditions opératoires du procédé de génération de courant et biodépollution ont été évaluées-optimisées en utilisant de la même façon des conditions bien contrôlées de type chronoampérométrie. Le prétraitement de l'anode par adsorption de matière organique s'est révélé une procédure efficace pour augmenter le courant et la quantité d'électricité produits par une électrode donnée. L'augmentation de la température opératoire a permis la multiplication de la densité de courant par un facteur de l'ordre de dix. De plus, il a été remarqué que l'effet de la concentration de combustible dépend du biocatalyseur, ainsi alors que les boues anaérobies ont une performance similaire avec diverses dilutions des résidus laitiers, les lixiviats de terreau donnent de meilleurs résultats avec de faibles concentrations de ce combustible.

Dans ce dernier chapitre, les media utilisés-évalués dans les chapitres antérieurs sont testés en PACM. Tout d'abord, les biocatalyseurs sont évalués avec de l'acétate pris comme substrat modèle. Ensuite, les systèmes composés par la combinaison du biocatalyseur et du combustible sont testés par l'évolution de la densité de puissance en fonction du temps et par le tracé de courbes de polarisation et courbes de puissance obtenus en faisant varier la résistance externe. Finalement, une PACM est étudiée en appliquant les conditions les plus favorables issues des chapitres antérieures : la pile utilise une anode prétraitée par adsorption des résidus laitiers, un anolyte composé d'un mélange de lixiviats de terreau et de résidus laitiers et la température est maintenue à 40°C. Certains résultats sont regroupés dans l'article inclus dans le chapitre, les résultats complémentaires sont développés dans les paragraphes suivants. Le Tableau V.1 liste les principaux essais présentés dans ce chapitre.

Tableau V.1 Résumé des expériences menées en pile à combustible.

| Nombre d'essai | Biocatalyseur | Combustible | Objectif |
|---|---|---|---|
| 1 | Boues anaérobies | Acétate de sodium | Evaluation préliminaire des sources de biocatalyseurs |
| 2 | Lixiviats de terreau | Acétate de sodium | |
| 3 | Boues anaérobies | Jus de pommes fermenté | Evaluation de l'effet de la concentration initiale de DCO, de l'agitation, de l'ajout de combustible, du rapport biocatalyseur/combustible |
| 4 | Boues anaérobies | Lies du vin | |
| 5 | Boues anaérobies | Résidus de laiterie | |
| 6 | Lixiviats de terreau | Jus de pommes fermenté | Evaluation des conditions anaérobies dans l'anolyte et de l'aération du catholyte, effet de l'ajout de combustible. |
| 7 | Lixiviats de terreau | Résidus de laiterie | |
| 8 | Lixiviats de terreau | Résidus de laiterie | Mise en place de conditions opératoires améliorées : anode prétraitée et 40°C |

D'autres expérimentations ont été menées en configuration pile, telles que les tests de combustibles sans l'ajout du biocatalyseur. Les résidus de laiterie ont été testés dilués et concentrés, cependant les performances étaient si faibles que les résultats ne sont pas décrits dans le mémoire.

## V.2 Performances des biocatalyseurs dans une PACM avec de l'acétate comme combustible modèle

Les études qui proposent des comparaisons de biocatalyseurs composés de consortia ou cultures mixtes en PACMs sont encore peu nombreuses. Heilmann & Logan (2006) ont comparé la densité de puissance produite par une pile à partir de protéines avec deux sortes d'inocula : de l'eau résiduaire urbaine (domestique) et les effluents d'une industrie d'emballage de viande. La performance avec les effluents alimentaires a été supérieure, de l'ordre de 139 mW/m² dans une PACM composée d'un seul compartiment.

Dans cette section nous comparons les performances de deux PACMs, l'une inoculée avec de boues anaérobies, et l'autre avec des lixiviats de terreau, en utilisant comme combustible de l'acétate de sodium.

Les essais ont été menés dans une pile à deux compartiments, chacun de 500 mL, séparés par une membrane échangeuse de protons. Les électrodes sont généralement reliées par une résistance externe de 1000 ohms ou d'une autre valeur lorsque indiqué. L'anode est en feutre de graphite (2x5 cm) et la cathode est une grille de platine (2x5 cm).

### V.2.1 Pile inoculée avec des boues de station d'épuration

Dans les premiers essais l'anolyte est composé de boues activées issues d'une station d'épuration d'effluents urbains (Brax, près de Toulouse) et acclimatées environ 2 mois dans de l'eau résiduaire synthétique contenant essentiellement du Viandox® à un pH de 6,32. Les boues sont initialement des boues aérobies, et le temps d'acclimatation en présence du substrat dans des flacons complètement remplis permet le développement de micro-organismes anaérobies. Un bullage d'azote ou d'air ont été appliqués à l'anolyte ou au catholyte suivant les cas. La Fig V.1 donne la tension aux bornes de la pile en fonction du temps avec diverses résistances externes. Nous pouvons observer que la tension de la pile en circuit ouvert atteint facilement la valeur de 0.8V, valeur classique pour les meilleures piles qui donnent le plus souvent des valeurs de l'ordre de 750 – 800 mV (Rabaey & Verstraete, 2005).

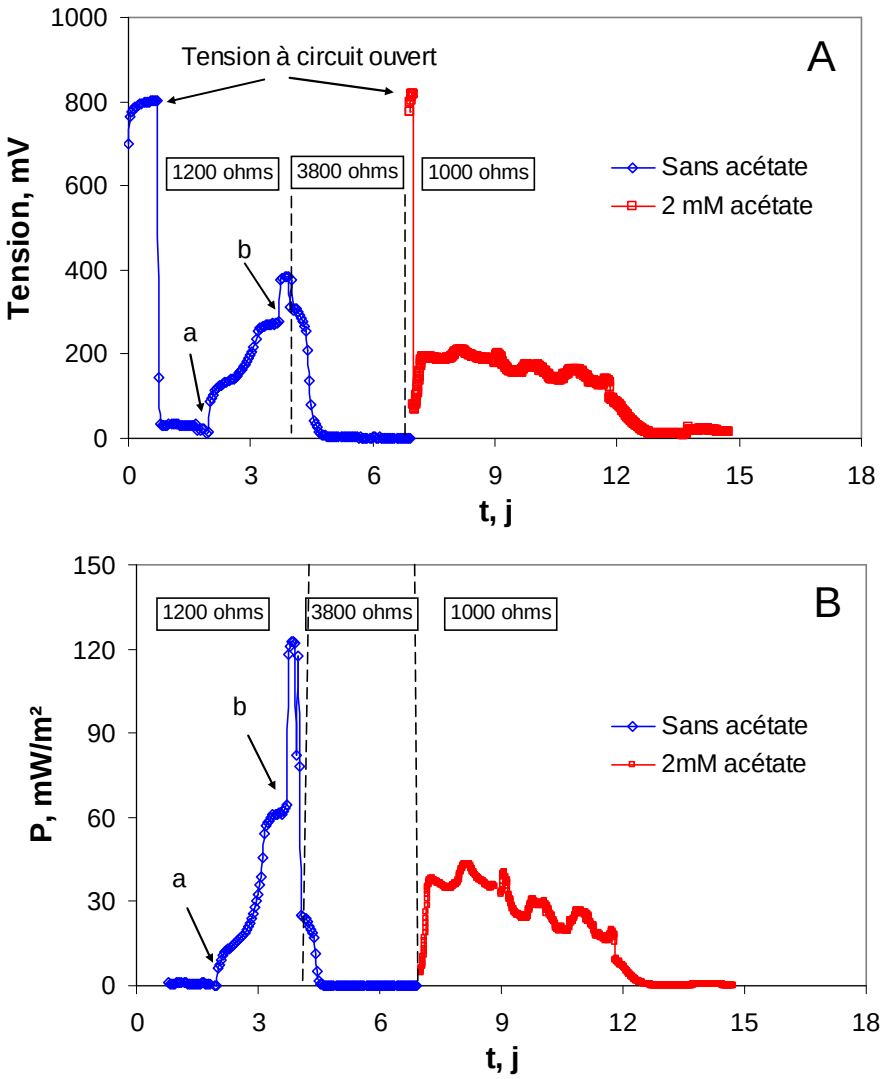



*Fig V.1 A) évolution de la tension d'une pile inoculée avec des boues anaérobies et alimentée avec de l'acétate. B) densité de puissance en fonction du combustible disponible, a) et b) augmentation ponctuelle de l'agitation.*

La pile a été déchargée en la faisant débiter sans ajout initial de substrat d'abord au-travers d'une résistance de 1200 Ω qui correspond sur la courbe de puissance à la valeur assurant la puissance maximale. L'augmentation de la tension aux bornes jusqu'à environ 400 mV indique la formation progressive d'un biofilm électro-actif du jour 1 au jour 4 (Figure V.1 A ). Ensuite, la mesure de la tension a été brièvement interrompue pour tracer une nouvelle courbe de puissance qui indiquait une résistance optimale de 3800 ohms. La résistance a donc été changée à 3800 Ω. La tension de la pile est alors descendue rapidement certainement à cause d'un épuisement du combustible utilisable. On peut remarquer qu'après la décharge la pile a toutefois conservé son potentiel de circuit ouvert initial. La résistance externe assurant la densité de puissance maximale a augmenté dans le temps de 1200 à 3800 ohms, car une pile

en cours de décharge débite un courant de plus en plus faible, il est donc nécessaire d'utiliser une résistance plus importante pour maintenir la puissance maximale $P = R.I^2$. L'augmentation immédiate de la tension observé au jour 2 a été provoquée par l'augmentation brusque de l'agitation de l'anolyte qui a été nécessaire afin d'homogénéiser la suspension des boues qui étaient coincées tout près de la membrane dans le tube qui relie les deux compartiments. Il est clair qu'une barrière physique aux transferts de matière était responsable d'une limitation des performances de la pile.

Au jour 7 de l'acétate de sodium est ajoutée pour obtenir une concentration de 2 mM dans l'anolyte. Cette fois la résistance externe a été choisie égale à 1000 ohms car, comme décrit précédemment, la résistance optimale change dans le temps quand la pile débite, donc afin d'obtenir des résultats comparables qui correspondent aux conditions les plus courantes de la littérature, tous les résultats des PACMs suivantes ont été obtenus avec une résistance externe 1000 ohms (Cheng et al. 2006, Heilmann & Logan, 2005, Liu et al. 2004, Min & Logan, 2005). La Fig V.1B donne l'évolution de la densité de puissance en fonction du temps. Après l'ajout d'acétate au jour 7 la densité de puissance s'est élevée jusqu'à 37 mW/m², elle descend ensuite lentement jusqu'au jour 12 où elle entame une descente rapide de18 mW/m² jusqu'à une valeur proche à zéro en 24 heures seulement. Cette diminution finale correspond à l'épuisement en acétate. Il faut noter qu'un tel profil de chute brusque de la puissance ou du courant est observé fréquemment quand l'acétate est utilisé comme combustible (Choi et al. 2007, Lefebvre et al. 2007, Liu et al. 2005).

La densité de puissance maximale avec l'acétate a atteint une valeur de 54 mW/m² déterminée par le tracé d'une courbe de puissance le jour 8, ce qui est en accord avec les rapports des auteurs qui exploitent des systèmes similaires des boues alimentées avec de l'acétate (Liu et al. 2004 ; Rabaey et al. 2005).

### V.2.2 Pile inoculée avec des lixiviats de terreau

Les résultats suivants sont obtenus avec une PACM inoculée avec des lixiviats de terreau et alimentée ensuite avec de l'acétate.

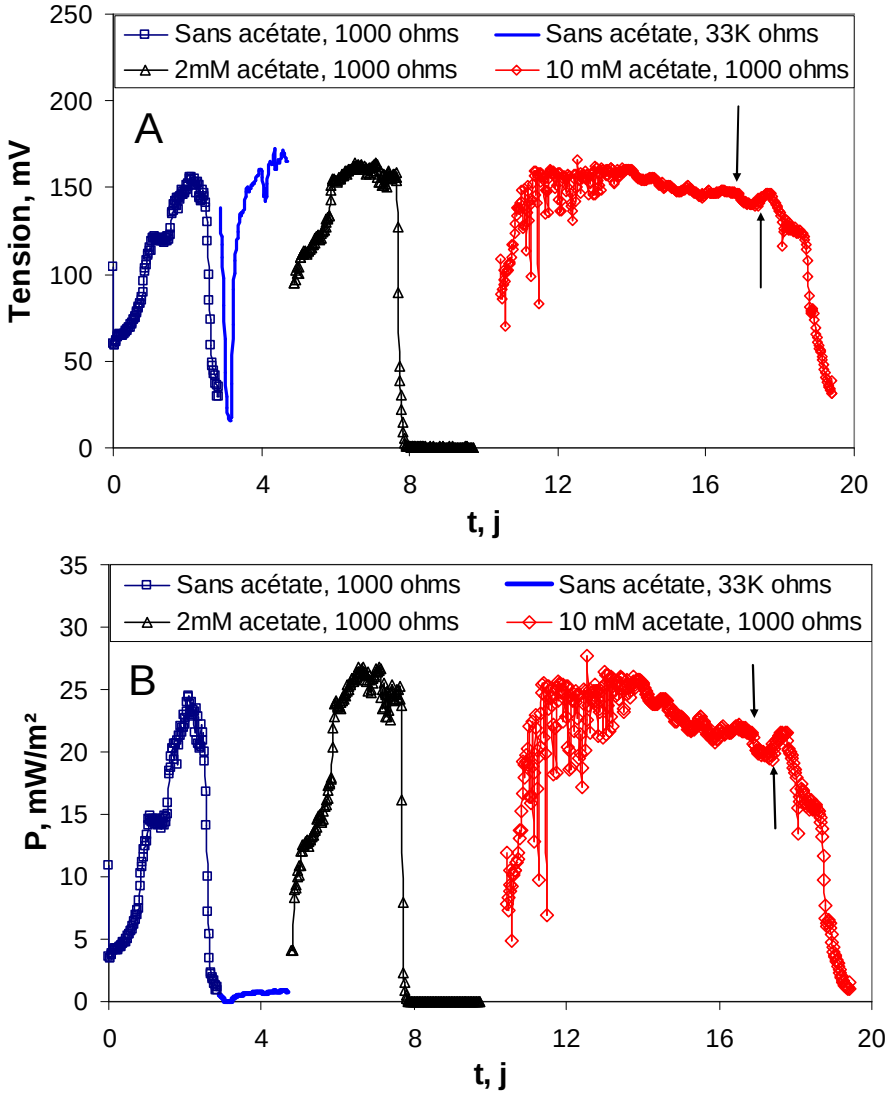



*Fig V.2 A) évolution de la tension d'une pile inoculée avec des lixiviats de terreau et alimentée avec de l'acétate. B) densité de puissance en fonction de la concentration du combustible. Les flèches indiquent l'ajout de l'antibiotique-antimycotique Gibco®.*

La pile inoculée avec des lixiviats de terreau et sans ajout initial d'acétate a été déchargée pendant 3 jours avec une résistance externe de 1000 ohms. Une tension de 155 mV est atteinte progressivement (Fig V.2A). Afin de vérifier que la pile déchargée pouvait continuer à assurer une tension maximale comme observé dans le section V.2.1, la résistance externe a été

portée à 33KΩ, valeur qui correspond à la puissance maximale indiquée par la courbe de puissance ; notons que cette valeur conduit la pile à fonctionner dans des conditions proches du circuit ouvert. La Fig V.2A indique que la tension dans ces conditions se rapproche de la tension maximale. Bien entendu la pile étant déchargée, la densité de puissance de 0,75 mW/m² est bien plus faible que la tension maximale avant décharge de 24 mW/m² (Fig V.2B).

Une fois la pile déchargée, de l'acétate est ajouté pour obtenir une concentration de 2 mM dans l'anolyte. La pile reconnectée avec une résistance de 1000 ohms donne une densité de puissance jusqu'à 26,5 mW/m². Un deuxième ajout d'acétate est réalisé à une concentration 5 fois plus élevée, soit 10 mM. La puissance maximale obtenue n'est pas considérablement différente de la valeur précédente, ce qui indique que la puissance de la pile n'est pas limitée par la disponibilité du combustible, mais plus probablement par la cinétique de transfert des électrons contrôlée par le métabolisme microbien.

Au jour 17, l'injection d'un produit antibiotique-antimycotique (Gibco®) a été réalisée afin de déterminer si la production d'énergie est le résultat du métabolisme microbien ou de réactions électrochimiques abiotiques. Après l'ajout, la puissance de la pile est descendue de 20,6 mW/m² à 0,96 mW/m² en quelques heures (18 h). La quantité d'électricité produite par la pile calculée par l'intégration du courant en fonction du temps est de 36 Coulomb et 107 Coulomb avec 2 et 10 mM acétate respectivement. Si l'on applique une simple règle de proportionnalité, le second ajout à 10mM aurait dû produire jusqu'à 36x5=180 Coulomb. Ce calcul indique que la pile a été stoppée après avoir seulement produit environ 60% de la charge possible. On peut donc raisonnablement conclure que c'est bien l'ajout de l'antibiotique qui a provoqué l'arrêt de la pile. En fait le temps de réaction relativement long (18 h) indique certainement une certaine protection des micro-organismes par leur organisation en biofilm. On pensait il y a quelques années que les cellules étaient protégées par une barrière diffusionnelle due aux exopolymères qui constitueraient une sorte de gel protecteur incluant des glucides et des protéines (Characklis et Marshall, 1990). On pense actuellement que l'effet de barrière diffusionnelle est négligeable, mais que les composés antibiotiques sont plutôt retenus et/ou dégradés par les couches externes du biofilm, voire que les microorganismes développent des résistances génétiques liées au phénotype biofilm.

La Fig V.3A donne les courbes de puissance réalisées aux jours 3 et 5, c'est-à-dire juste après la décharge de la pile et lorsqu'elle débite de façon optimale après l'ajout de 2 mM d'acétate.

La faible densité de puissance et de courant observées au jour 3 est évidemment le résultat de la décharge de la pile. Par contre, une augmentation notable de 3 à 20 mW/m² est observée au 5ème jour avec l'ajout de l'acétate. Les valeurs de la densité de courant enregistrées avec les différentes résistances sont également reportées en fonction du potentiel de chaque électrode mesuré par rapport à une électrode de référence Ag/AgCl placée dans le compartiment anodique (Fig V.3B). Les courbes intensité-potentiel ainsi obtenues sont donc justes pour l'anode, mais elles intègrent la chute ohmique de la cellule dans les caractéristiques de la cathode. Les courbes intensité-potentiel montrent que le gain de puissance provoqué par l'ajout d'acétate est dû à une augmentation notable de la pente de la courbe de polarisation de l'anode, alors que le gain en potentiel à courant nul est relativement mineur. D'autre part, les courbes de polarisation de la cathode indiquent des variations tant de pente que de potentiel à courant nul, ce qui représente un problème, car la cathode abiotique ne devrait pas trop évoluer dans le temps. Ceci démontre le caractère très relatif des comparaisons de bioanodes qui sont encore réalisées beaucoup trop souvent dans la bibliographie sur les seules mesures de performances globales de PACM.

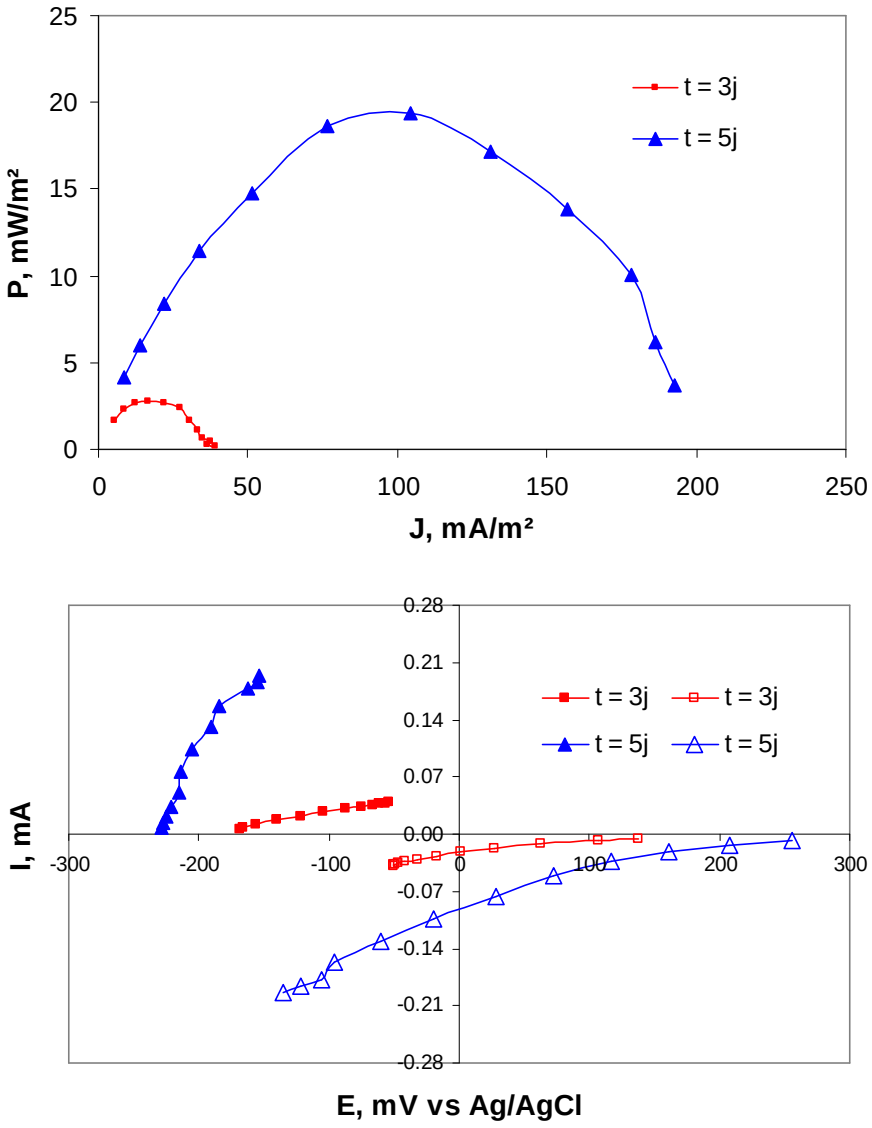



*Fig V.3 Performance d'une pile inoculée avec des lixiviats de terreau et alimentée avec de l'acétate. A) courbes de puissance ; B) courbes de polarisation des électrodes (Anode : symboles pleins ; Cathode : symboles ouverts).* $E_{anode}$ *vs. Ag/AgCl ;* $E_{cathode} = U - E_{anode}$.

Cette comparaison des performances des deux biocatalyseurs, boues anaérobies et lixiviats de terreau, réalisées avec le substrat modèle met en évidence une meilleure performance des boues anaérobies : 37 mW/m² *versus* 27 mW/m² selon l'évolution de la densité de puissance avec une résistance de 1000Ω, et 54 mW/m² *versus* 20 mW/m² selon les courbes de puissance.

## V.3 PACMs inoculées avec boues alimentés en déchets agro-alimentaires

Cette section est dédiée aux études de piles inoculées avec des boues anaérobies et alimentées avec des jus de pomme fermentés, des lies du vin et des résidus de laiterie. Les résultats principaux sont présentés dans l'article « Testing different food industry wastes for electricity production in MFC » à soumettre au journal « Bioresource Technology ». Certaines données complémentaires sont développées.

### V.3.1 Procédure de démarrage des piles

Les boues ont d'abord été acclimatées par des ajouts successifs de combustibles pendant environ 2 semaines. Les piles avec un compartiment anodique de volume utile de 500 mL, ont été remplies dans une première phase avec 50% en volume de la suspension du biocatalyseur acclimaté et 25% du combustible. Après 7 jours de fonctionnement avec une résistance externe de 1000 ohms, un second ajout de combustible de 25% en volume a été effectué.

La tension des piles en circuit ouvert était initialement de 445, 476 mV et 260 mV pour les piles alimentées avec le jus de pommes fermenté, les résidus de laiterie et les lies de vin respectivement. Le potentiel a augmenté rapidement dans les premières heures pour se stabiliser à environ 700 mV après 22 heures dans le cas du jus de pommes fermenté et des déchets de laiterie. Le potentiel pour la pile alimentée en lies de vin était erratique, avec une moyenne de 254 mV après 40 heures. On verra par la suite que ces résultats vont correspondre aux performances respectives de chaque pile. Ceci ouvre une piste intéressante, en suggérant que la performance d'une PACM pourrait être prédite par la simple mesure de sa tension initiale en circuit ouvert.

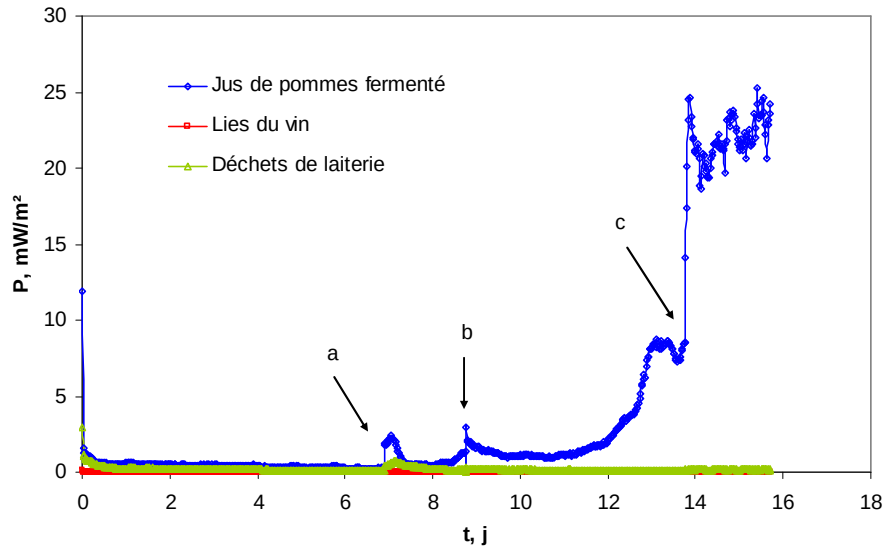



*Fig V.4 Evolution de la densité de puissance des piles inoculées avec des boues anaérobies en fonction du combustible. a) ajout de 25% complémentaire de combustible, b) bullage de $N_2$ dans l'anolyte, c) ajout d'acétate de sodium 2 mM*

La Fig V.4 donne les densités de puissance des piles en fonction du temps suivant le combustible utilisé. Il n'a pas été observé de production d'énergie durant les 7 premiers jours avec le mélange de 250 mL biocatalyseur et 125 mL de combustible. L'ajout du combustible en deux étapes de 125 mL avait été décidé afin d'éviter un stress possible provoqué par des concentrations de nutriments trop élevées. Lors du second ajout au jour 7, la densité de puissance augmente de quelques milliwatts pour une courte période avant de redescendre ensuite vers zéro dans les trois piles. Un bullage d'azote a été établi dans les compartiments anodiques à la fin du jour 8 afin de favoriser le développement de microorganismes anaérobies et de réduire la concentration d'oxygène au cas où sa diffusion aurait lieu depuis le compartiment cathodique. La performance des piles alimentées en lies du vin et résidus laitiers n'a pas été modifiée, par contre, la pile alimentée en jus de pommes fermenté a commencé à augmenter lentement pendant 3 jours puis beaucoup plus rapidement. Il est possible de penser que le bullage d'azote a bien favorisé une activité microbienne en raison du profil d'évolution de la puissance qui comporte une première phase d'initiation suivie d'une croissance exponentielle.

Finalement, le jour 14, de l'acétate a été ajouté pour obtenir une concentration de 2 mM dans chaque pile. Une augmentation remarquable de la densité de puissance de 9 à 23 mW/m² a été observée avec la pile alimentée en jus de pomme fermenté, alors que les deux autres piles n'ont pas présenté d'amélioration. Ces résultats peuvent être expliqués par la composition du

jus de pomme dont la fermentation pourrait produire de l'acétate. Dans ce cas, le biocatalyseur aurait donc déjà travaillé avec de l'acétate pendant la phase d'acclimatation.

Les densités de puissance très faibles obtenues ici peuvent être imputées à des concentrations trop fortes de combustible. Dans cette première étape la DCO initiale des anolytes a été 7 600, 20 200, et 14 300 mg/L DCO pour les piles alimentées en jus de pommes fermenté, lies de vin et résidus de laiterie respectivement. La pile avec la charge en DCO la plus faible (jus de pommes fermenté) a été la seule à donner une génération de courant significative.

### V.3.2 Performances en fonction de l'agitation, ajout de combustible et rapport biocatalyseur/combustible

L'article à soumettre « Testing different food industry wastes for electricity production in MFC» présente des résultats sur l'effet de l'agitation de l'anolyte, l'ajout de combustible, ainsi que l'effet du rapport biocatalyseur/combustible sur les performances des piles. Dans les paragraphes suivants des résultats complémentaires sont montrés.

Les trois déchets agro-alimentaires, jus de pommes fermenté, lies du vin et déchets de laiterie ont été testés en PACMs avec des boues anaérobies comme biocatalyseur. L'anolyte des piles était composé par 250 mL de boues et 250 mL de combustible diluée 1:200 avec une solution tamponnée. Les montages des piles décrits dans la section V.3.1 sont restés en circuit ouvert pendant un mois. Suite à cette période appelée de « décharge » à cause de la consommation des combustibles, les piles ont été connectées à une résistance de 1000 ohms et la densité de puissance suivie dans le temps. Après 8 jours en débitant, les électrolytes ont été mis en agitation, à partir du jour 14 des combustibles ont été ajoutés périodiquement, finalement 450 mL d'anolyte ont été enlevés et substitués par 450 mL de combustible dilué afin d'évaluer le changement du rapport biocatalyseur/combustible de 1/1 à 1/9 v/v. La Fig V.5 montre le suivi des piles, son analyse est incluse dans l'article.

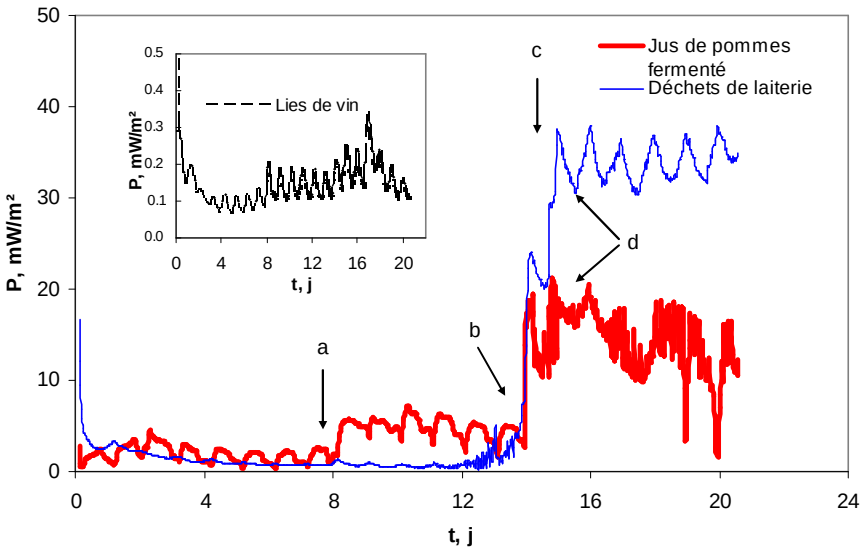



*Fig V.5 Effet de l'agitation et l'ajout de combustible sur la densité de puissance des PACMs inoculées avec des boues. a) agitation. Ajout de combustible b) 1 mL, c) 1 mL, d) 2 mL.*

La Fig V.6 présente les courbes de puissance qui correspondent à la période de décharge, la période d'agitation, le début et la fin de la période des ajouts de combustible, ainsi que le changement du rapport biocatalyseur/combustible 1/9. La pile alimentée avec des résidus laitiers est pris comme exemple.

Logiquement, la courbe de la pile déchargée se situe dans une région de densité de courant très faible (Fig V.6 A, B). La densité de puissance a augmenté notablement avec l'ajout de combustible. On peut y voir deux causes, d'une part la simple accumulation de substrat au cours des ajouts successifs, d'autre part certains composés du substrat qui ne sont pas métabolisables directement peuvent se dégrader au cours du temps et constituer ainsi une source de combustible additionnel. Ce phénomène a été mis en évidence avec les résidus laitiers (Chapitre III, section 2 .1.2). La densité de courant maximale pendant l'agitation ainsi qu'avec le rapport biocatalyseur/combustible = 1/9 n'est pas clairement identifiable car les courbes sont déformées. Lors du tracé de la courbe de polarisation, qui s'effectue en faisant varier la valeur de la résistance externe, il est probable que les valeurs les plus faibles de la résistance externe (316, 178 et 100 ohms) étaient inférieures à la résistance interne de la pile, ce qui a occasionné cette déformation (Fig V.6B).

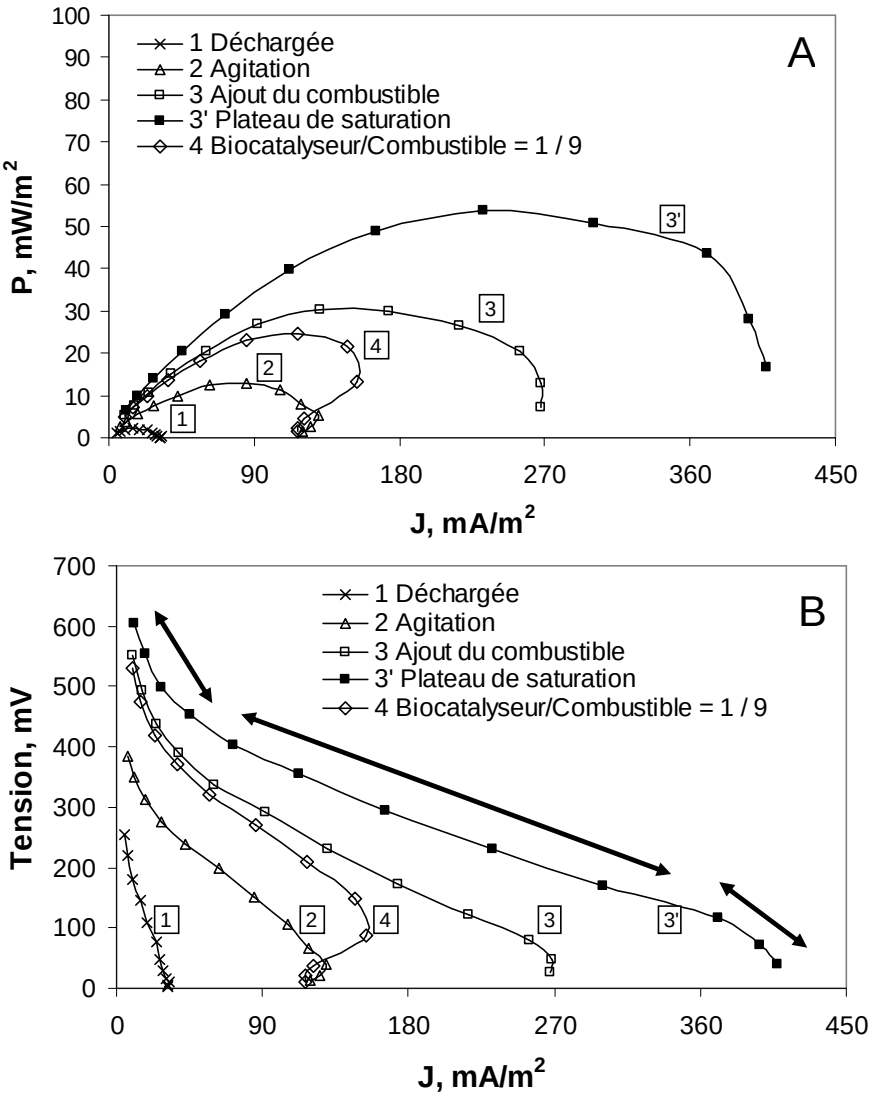



*Fig V.6 Performances de la pile inoculée avec des boues anaérobies et alimentée avec des résidus laitiers. A) courbes de puissance (Densité de puissance-Densité de courant), B) courbes de polarisation (Tension-Densité de courant)*

Les courbes Tension-Intensité des piles à combustible traditionnelles montrent généralement que:

- la tension de circuit ouvert (ou tension à courant zéro) est inférieure à la valeur théorique,
- il y a une descente rapide de tension en début de courbe (Région I),
- ensuite, la tension descend plus lentement et de façon linéaire lorsque l'intensité croît (Région II),
- éventuellement, il est ensuite observé une région de densité de courant élevée, pour laquelle la tension descend rapidement (Région III).

Ces trois régions sont clairement identifiables sur la courbe à la fin de la période des ajouts de combustible (Fig V.6B, courbe 3'). A faible densité de courant (Région I), les cinétiques électrochimiques contrôlent le comportement de la pile qui peut être approché en termes de pentes de Tafel. Dans la Région II, où la courbe est linéaire, l'effet de la résistance interne prédomine (U = IR) ; elle est due à une limitation de la conduction ionique ou sein de l'électrolyte et/ou du séparateur. Le courant maximal qui peut être produit par la pile se trouve dans la Région III. Ce courant est généralement limité par la vitesse de transport de matière, tel que la diffusion des espèces réactives vers les électrodes ou le transport des ions au sein de l'électrolyte (Larminie & Dicks, 2003). Une étude récente évoque la possibilité que la densité de courant soit limitée par le transfert des protons du biofilm vers le milieu (Torres et al. 2008).

Les courbes Tension-Intensité tracées sous agitation (Fig V.6B, courbe 2) et après la réduction du rapport biocatalyseur/combustible (Fig V.6B, courbe 4) ne présentent pas les trois régimes caractéristiques des piles (Chapitre I, section 1.1). Ceci révèle que l'état stationnaire de génération de courant n'a pas été atteint. Etant donné que la résistance interne contrôle la pente de la Région II, la chute de la tension est d'autant plus rapide que la résistance est élevée, ce qui peut être observé clairement sur la courbe 1.

Les performances des PACMs pour chaque combustible, déterminées par des courbes de polarisation est résumé dans le Tableau V.2. La pile avec la plus faible performance a été celle alimenté en lies du vin à cause de la charge tellement élevée en DCO de ce type de combustible (voir Tableau II.1). Ensuite, définir le meilleur système paraît compliqué, et varie selon les conditions expérimentales; alors que l'ajout de combustible a amélioré considérablement la performance de la pile alimenté en résidus laitiers, la diminution du rapport biocatalyseur/combustible a augmenté la densité de puissance de la pile alimentée en jus de pommes fermenté. Néanmoins, l'agitation des électrolytes ainsi que l'ajout de combustibles à amélioré l'efficacité de tous les systèmes.

Tableau V.2 Densité de puissance et de courant maximal des PACMs inoculées avec des boues alimentées en déchets agro-alimentaires. Données obtenues à partir des courbes de polarisation.

| Conditions expérimentales | Jus de pommes fermenté | | Lies De vin | | Déchets de laiterie | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | $P_{max,}$ $mW/m^2$ | J, $mA/m^2$ | $P_{max,}$ $mW/m^2$ | J, $mA/m^2$ | $P_{max,}$ $mW/m^2$ | J, $mA/m^2$ |
| 1. PACM déchargée | 10 | 57 | 0.5 | 5 | 2 | 15 |
| 2. Agitation de l'anolyte | 15 | 69 | **0.7** | **6** | 13 | 85 |
| 3. Ajout de combustible | 27 | 123 | 0.8 | 7 | **54** | **232** |
| 4. Biocat./Combu. = 1/9 | **44** | **118** | 0.4 | 3 | 24 | 117 |

De ces expériences nous pouvons conclure que la détermination de la tension à circuit ouvert est un moyen simple de prédire les performances d'une pile microbienne. En outre, le démarrage de piles inoculées avec des boues anaérobies a été long, principalement à cause de la charge organique trop élevée. Comme cela a déjà été largement commenté, des concentrations élevées de combustible gênent la production de courant. Dans les systèmes étudiés ici la limite favorable est d'environ 7600 mg/L de DCO pour la pile alimentée en jus de pomme fermenté. Certains paramètres opératoires comme l'agitation de l'anolyte et le rapport biocatalyseur/combustible ont un effet significatif sur les performances, effet qui dépend toutefois des caractéristiques particulaires de chaque système, la combinaison de paramètres qui s'avère favorable pour un système pouvant être défavorables pour un autre. Les courbes de puissance et de polarisation qui sont communément utilisées pour l'analyse des piles à combustible traditionnelles sont à utiliser avec précaution pour la comparaison de piles microbiennes, car celles-ci développent de faibles tensions, ce qui limite l'analyse des dites courbes. Nous avons trouvé qu'une densité de courant autour de 270 $mA/m^2$ permettait la différentiation des trois régions classiques des courbes de polarisation (Tension-Intensité). Enfin, les observations en microscopie électronique à balayage (MEB) ont indiqué que, bien que la colonisation des fibres de graphite de l'anode soit faible, les piles avec des lixiviats de terreau ont démontré des performances satisfaisantes eu égard à celles rencontrées dans la bibliographie ; ainsi nous considérons que ce système est certainement susceptible d'amélioration notable en favorisant la formation plus homogène du biofilm.

## V.4 PACMs inoculées avec lixiviats de terreau et alimentées en déchets agro-alimentaires

Les résultats des piles inoculées avec des lixiviats de terreau et alimentées soit avec les jus de pommes fermenté soit avec les résidus laitiers sont entièrement présentés dans l'article soumis «Testing different food industry wastes for electricity production in MFC». Un résumé de cette section est présenté dans les paragraphes suivants. A noter que les lies de vin n'ont pas été testées dans ce deuxième groupe de piles, étant donné les faibles puissances obtenues avec ce combustible dans les piles inoculées avec des boues (Tableau V.2).

### V.4.1 Présentation de l'article "Testing different food industry wastes for electricity production in MFC"

**ARTICLE : Testing different food industry wastes for electricity production in MFC**

Les piles ont été inoculées avec des lixiviats de terreau acclimatés aux combustibles. Avant l'ajout de combustible, les piles ont été déchargées en les laissant débiter au-travers d'une résistance externe de 1000 ohms. On a évalué l'effet sur les performances des piles de l'ajout de combustible, du bullage de $N_2$ dans le compartiment anodique et d'air dans le compartiment cathodique. La production de courant a démarré dès 1 à 2 jours, ce qui constitue un démarrage rapide par rapport aux piles inoculées avec des boues. Les combustibles bruts ont d'abord été ajoutés dans les piles sans bullage de $N_2$ ni d'air. La pile alimentée avec du jus de pommes fermenté a généré des pics de puissance avec de très faibles rendements faradiques (0,98%) ; à l'inverse la puissance de la pile alimentée avec des résidus laitiers a été stable autour de 20 mW/m². Ces différences sont attribuées aux composants et à la concentration des combustibles testés. L'ajout de combustible brut lors de l'aération du compartiment cathodique a donné des pics de puissance avec la pile à jus de pommes et la puissance de la pile utilisant les déchets de laiterie à été doublée. Ces résultats indiquent que les réactions sur la cathode avaient un effet limitant. Finalement, l'ajout de combustible durant le bullage de $N_2$ dans l'anolyte et l'aération du catholyte a permis la génération continue et stable pour plusieurs jours de densités de puissance de l'ordre de 23 mW/m² et 44 mW/m² respectivement pour les piles alimentées en jus de pommes et déchets de laiterie. Les conditions opératoires les plus favorables ont ainsi été établies, confirmant la nécessité d'un environnement strictement anaérobie de l'anode.

## V.4.2 Article "Testing different food industry wastes for electricity production in MFC"

# TESTING VARIOUS FOOD INDUSTRY WASTES FOR ELECTRICITY PRODUCTION IN MICROBIAL FUEL CELL

Bibiana Cercado-Quezada, Marie-Line Delia, Alain Bergel*

Laboratoire de Génie de Chimique, CNRS - Université de Toulouse, 4, Allée Emile Monso, P.O. Box 74233, 31430 Toulouse Cedex 4, France

* Corresponding author. Tel.: +33 5 34 61 52 48; fax: +33 5 34 61 52 51.
E-mail address: alain.bergel@ensiacet.fr (A. Bergel).

**Abstract**

Three food-industry wastes: fermented apple juice (FAJ), wine lees, and yogurt waste (YW) were evaluated in combination with two sources of inoculum, anaerobic sludge and garden compost, to produce electricity in microbial fuel cells. Preliminary potentiostatic studies suggested that YW was the best candidate, able to provide up to 250 mA/m² at poised potential +0.3V/SCE. Experiments conducted with two-chamber MFCs confirmed that wine lees were definitely not suitable. FAJ was not able to start an MFC by means of its endogenous microflora, while YW was.

Both FAJ and YW were suitable fuels when anaerobic sludge or compost leachate was used as inoculum source. Sludge-MFCs had better performance using YW (54 mW/$m^2$ at 232 mA/$m^2$). In contrast, compost-leachate-MFCs showed higher power density with FAJ (78 mW/$m^2$ at 209 mA/$m^2$) than with YW (37 mW/$m^2$ at 144 mA/$m^2$) but YW gave more stable production. Under optimized operating conditions, compost-leachate-MFCs fueled with YW gave up to 92 mW/$m^2$ at 404 mA/$m^2$ and 44mW/m2 in stable conditions.

**Keywords:** Microbial fuel cell; Food-industry waste; Dairy waste; Electroactive biofilm

## 1. Introduction

Microbial fuel cells (MFC) are electrochemical devices that use the metabolic activity of microorganisms to oxidize fuels, generating electric current by direct or mediated electron transfer to electrodes (Rabaey et al., 2007; Schröder et al., 2007). In the anodic compartment, organic matter is oxidized by microbial metabolism, which transfers the electrons to the anode. In the cathodic compartment, oxygen or oxidized compounds are reduced either via an abiotic process or by microbially mediated reduction (He and Angenent, 2006).

Early studies on fuels in MFCs dealt with low molecular weight substrates, carbohydrates like glucose, fructose, xylose, sucrose, maltose, and trehalose (Chaudury and Lovley, 2005; Kim et al., 2000), organic acids like acetate, propionate, butyrate, lactate, succinate, and malate (Bond and Lovley, 2005; Holmes et al., 2004; Min and Logan, 2004), alcohols like ethanol and methanol (Kim et al., 2007) and inorganic compounds like sulfate (Rabaey et al., 2006). Later, the interest in complex substrates led to tests on starch, cellulose, dextran, molasses, chitin and pectin (Melhuish et al., 2006; Niessen et al., 2005, 2006; Rezaei et al., 2007). In parallel, the use of domestic wastewater as fuel and microbial source was largely reported (Liu et al., 2004; Rabaey et al., 2005). Research on domestic wastewater was extended to a large variety of industrial wastewaters, e.g. from starch (Gil et al., 2003) and wastewaters coming from the meat packing industry (Heilmann and Logan, 2006), swine farms (Min et al., 2005), and cereal- (Oh and Logan, 2005) and potato-producing units (Rabaey et al., 2005). Solid agricultural wastes such as corn stover (Zuo et al., 2006) and manure (Scott and Murano, 2007) have also been tested as fuel after being pretreated.

Numerous variants of the experimental conditions affected the results but the power density obtained in these studies was generally in the range of 1 to 3 600 $mW/m^2$, with most values lying between 10 and 1 000 $mW/m^2$.

The choice of the inoculum source is a key parameter in MFC design. The most common sources of electroactive microorganisms have been domestic wastewater, activated and anaerobic sludge, and marine sediments (Erable et al., 2009; Kim et al., 2007; Liu et al., 2004; Rezaei et al., 2007). Alternative sources have been reported: heat treated soils (Niessen et al., 2006), garden compost (Parot et al., 2008a), manure (Scott and Murano, 2007) and rumen (Rismani-Yazid et al., 2007). However, very little research has investigated electroactive native microflora in agro-industrial wastes although numerous agro-industrial wastes are rich in mixed populations.

The present work tested three kinds of waste coming from different sectors of the agricultural and food industries: fermented apple juice (FAJ), wine lees (WL) and yogurt wastewater (YW). Each waste was tested for its possible capacity to form electroactive biofilms from its endogenous flora. The same wastes were then tested as fuels to feed bioanodes that were formed with two different sources of inoculum: anaerobic sludge and garden compost. Anaerobic sludge (actually aerobic sludge driven to anaerobic conditions during an acclimating period) was chosen because of its common use as MFC inoculum. Bioanodes formed in garden compost have shown efficient electroactive properties with acetate (Parot et al., 2008b) and have revealed a rich microbial flora with remarkable electroactive capabilities (Parot et al., 2009). It was consequently expected that such bioanodes might be appropriate for a large variety of different substrates.

## 2. Methods

### *2.1. Waste media*

To simulate a leachate of apple farm wastes, fermented apple juice (FAJ) was prepared by

pressing Braeburn 65/75 apples; the juice was fermented in a sealed container at room temperature for at least 15 days. Flasks of 500 mL were filled and stored at 3°C. Lees coming from the wine making process (WL) were obtained from a local wine grower. Yogurt waste (YW) was collected from the yogurt production line of a local dairy. Samples of both substrates were stored in 1.5L plastic bottles at 3°C or were deep-frozen for long-term storage.

When indicated, the media were diluted (1:20) with the buffer solution described below. pH and conductivity were systematically measured using a Schott Gerate pH-meter CG 882 and a Metrohm 660 conductimeter (Swiss). Total chemical oxygen demand (COD) was measured in anolytes and raw substrates following the standard method 8000 for 0 – 1 500 mg COD/L (HACH France S.A.S.). Characteristics of the raw media and after dilution are reported in Table 1.

Table 1. Characteristics of raw and diluted substrates.

| **Substrate** | **Conductivity[a] mS/cm** | **pH[a]** | **COD[a] mg/L** | **Dil.** | **COD[b] mg/L** | **Conductivity[b] mS/cm** | **pH[b]** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| FAJ | 4.20 | 4.01 | 52 514 ± 19 926 | 1:20 | 3 501 ± 2 510 | 4.77 | 6.14 |
| WL | 1.45 | 3.69 | 349 250 ± 39 527 | 1:20 | 10 843 ± 3 904 | 5.12 | 6.06 |
| YW | 4.82 | 4.05 | 136 542 ± 37 983 | 1:20 | 8 169 ± 2 568 | 4.53 | 6.15 |

[a] Raw substrate. [b] Diluted substrate.

2.2. *Inoculum sources and acclimation*

Aerobic sludge was obtained from an urban wastewater treatment plant. Sludge was distributed in fully filled, closed 0.5L bottles and acclimated to the different waste media by

daily addition of 1mL of raw substrate with a syringe placed in the screw cap. Substrate was added daily for 16 days and the whole acclimatizing period was one month. During the acclimating period, the sludge evolved rapidly to anaerobic conditions; for this reason we refer to anaerobic sludge in what follows.

The microbial flora was extracted from the garden compost by lixiviation. 10 mM NaCl solution was added to 1 L of compost to give a final volume of 3 L. This mixture was placed in 2 or 3 L Erlenmeyer flasks, stirred for 24h and then filtered through felt cloth. The filtrate was placed in 0.5L fully filled flasks and acclimated by addition of 1 mL waste media twice a week for 30 days; it was used one month after the last addition.

*2.3. Electrochemical tests*

The experimental unit was a cap-sealed three-electrode cell of 50 mL, or 500 mL when indicated, with graphite felt (2 x 2 x 0.5 cm, RVG, Carbone Loraine, France) as the working electrode, an Ag/AgCl or an Standard Calomel Electrode (SCE) reference electrode and a platinum mesh (2 x 5 cm) as counter electrode.

Chronoamperometry was performed at different potentials and cyclic voltammetry was recorded in the range -1.0V to +1.0V/SCE at 10mV/s in triplicate, using an SVP multichannel potentiostat (BioLogic Science Instruments; EC/Lab 2.0 software)

*2.4. Microbial fuel cell studies*

The two-chamber MFC was similar to the design already reported (Min et al., 2005). Two culture flasks (500 mL) were connected by a glass tube with a proton exchange membrane (3 cm diameter) in the middle (Ultrex, CMI-7000 Membranes International, Inc., USA).

Graphite felt (2 x 5 x 0.5 cm or 4 x 2 x 0.5 cm, RVG, Carbone Loraine), and platinum mesh (2 x 5 cm) were used as the anode and cathode respectively. Anolyte and catholyte had a volume of 500 mL. Four kinds of anolyte systems were used as follows:

a) diluted substrate without exogenous inoculum;
b) anaerobic sludge or compost leachate as inoculum with sodium acetate 2mM as model substrate;
c) sludge inoculum fed with different diluted substrates;
d) compost leachate inoculum fed with different raw substrates.

The catholyte consisted of NaCl phosphate buffer (g/L): $Na_2HPO_4$, 2.75; $NaH_2PO_4$, 3.67; NaCl, 0.584 g/L; pH 6.7, conductivity 5.2 mS/cm. This buffer solution was also used in substrate dilutions. Gas diffusers were placed in both compartments to inject nitrogen into the anodic compartment and air into the cathodic compartment when indicated. Nitrogen was supplied from a laboratory line and air was supplied by an aquarium pump (1.5-2 L/min). Anolyte and catholyte were stirred with magnetic barrels (350 rpm).

The electrical circuit was closed with an external resistance of 1000 Ω. The cell potential drop $U_{cell}$ (V) was recorded with a multimeter (Integra series 2700, Keithley Instruments, Inc. USA) interfaced with a computer. Current density J ($A/m^2$) was calculated as $J = U_{cell}/(R \cdot A_g)$, where R (Ω) is the external resistance and $A_g$ ($m^2$) is the anode projected surface area. The power density ($W/m^2$) was measured as a function of current density by varying the external resistance from 100 to 56 324 Ω over a 3-minute period.

*2.5. Scanning electron microscopy (SEM)*

SEM micrographs were taken with a Leo 435VP microscope (Germany) using the software SRV-32. Samples were fixed with 4% glutaraldehyde solution, post-fixed with 2% $OsO_4$

solution, gradually dehydrated with acetone 50%, 70%, 100% solutions, and finally coated with gold to be observed in SEM at 7.5 kV.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Formation of electroactive biofilms under chronoamperometry with three different waste media (FAJ, WL, YW)

Chronoamperometry of three waste media: fermented apple juice (FAJ), wine lees (WL) and yogurt waste (YW) was performed at different potential values in the range +0.3 to +0.7V/SCE with graphite felt electrodes. Media were used as obtained, without dilution. As soon as electrodes were polarized, FAJ and WL gave significant current density, which rose with rising imposed potential and then dropped continuously with time to lower values around 50mA/$m^2$ whatever the potential value. This behavior indicated the presence of a soluble compound that was initially oxidized and progressively consumed, but it did not indicate any formation of electrochemically active biofilm.

In contrast, the current generated in raw YW (Fig. 1A) at +0.3 and +0.5V/SCE rose after five days lag-time up to value around 250 mA/$m^2$. Such a trend in current has commonly been identified as characteristic of the formation of an electroactive microbial biofilm on the electrode surface (Dulon et al., 2007). Biofilm formation was delayed at higher potential value (+0.7 V/SCE). As already reported, too high a potential value can be detrimental to biofilm formation or lower the reproducibility of the results (Parot et al., 2008-a).

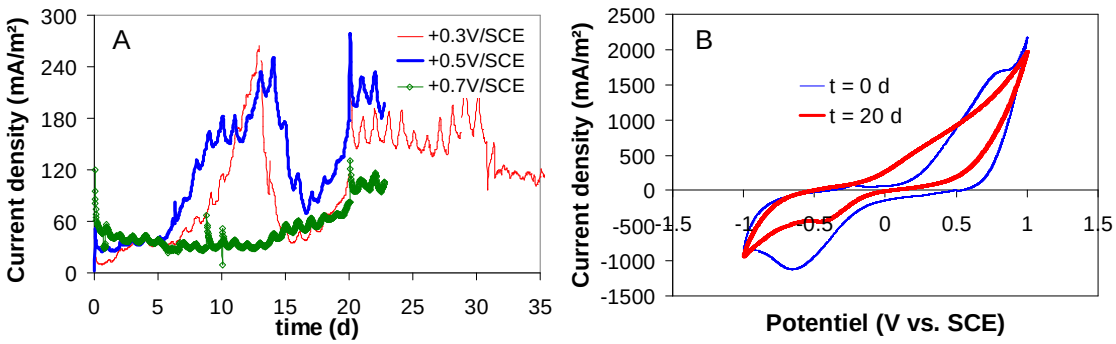



*Fig 1. Electroactivity in raw YW. A) Chronoamperometry at poised potentials +0.3, +0.5, +0.7V/SCE. B) Cyclic voltammetry performed initially and after 20 days with electrode poised at +0.5V/SCE*

Voltammograms plotted at the beginning of the experiment (Fig 1, B) showed an oxidation wave that reached its maximal current value from around +0.7V/SCE. Occurrence of this oxidation reaction can explain why chronoamperometry performed at +0.7V/SCE led to fast modification of the composition of the medium in the vicinity of the electrode in a way that was unfavorable to biofilm formation. The oxidation wave was no longer observed on the voltammograms plotted at the end of the 20 days' polarization. The oxidation reaction that appeared from around -0.3V/SCE can be attributed to a biofilm-driven process. On the reduction side, the peak observed at -0.6 V/SCE on the initial curve was due to the reduction of dissolved oxygen trapped in the felt fibers, as was observed in control voltammograms (data not shown). The reduction wave that started near 0V/SCE after the 20 days of polarization was due either to a biofilm-driven reduction process or to the reduction of components that formed during chronoamperometry.

It can be concluded that FAJ and WL did not contain an endogenous microflora able to support the development of electroactive biofilms, while YW presented promising capabilities that led to current densities of up to 250 mA/m$^2$ at +0.3V/SCE.

### 3.2. Formation of electroactive biofilms under chronoamperometry with two inoculum sources (sludge, compost leachate)

Two sources of inoculum were used, anaerobic sludge and compost leachate. Actually, efficient bioanodes have been formed in garden compost (Parot et al., 2008-a) but it has not yet been possible to use these biofilms out of the compost medium in which they were formed. For this reason, the bioanodes were formed in compost leachate here, i.e. in filtrate that was obtained by lixiviating garden compost with a saline solution (see experimental section). Chronoamperometry was performed in 500 mL compost leachate or in 50 mL anaerobic sludge suspension, both with 10 mM NaCl added. No acetate or other substrate was added.

Compost leachate tested at different potential values gave the three-phase current-time curves (lag-time, exponential increase, plateau) that indicated formation of an electroactive biofilm. Anaerobic sludge showed a faster current increase, almost linear from the beginning of the experiment. This behavior can be explained by the quite long acclimating period in closed flasks (see experimental section). Anaerobic sludge gave higher maximal current density, which was reached in a shorter period (110 $mA/m^2$ at +0.7V/SCE, day 6) than for compost leachate (70 $mA/m^2$ at +0.6V/Ag/AgCl, day 10). These results confirm the capacity of both media to be the source of efficient electroactive microbial species and suggest that biofilm microbial populations coming from wastewater may be more promising than those from compost.

### 3.3. Yogurt wastewater (YW) as inoculum and substrate in MFC

Following the results obtained with YW alone in section 3.1, YW were tested for their capacity to form an MFC by themselves. The anode compartment was filled with YW diluted 1:20 v/v in buffer solution and the cathode compartment contained the buffer only. The electrical circuit was closed with a 1000 Ω external resistance. The power density increased with time to a maximal value of 1.9 mW/$m^2$ (49.4 mA/$m^2$) at the $6^{th}$ day, then fell slowly to 0.3 mW/$m^2$ (18.6 mA/$m^2$) at the $13^{th}$ day and kept this value for 5 days.
Polarization curves, which were recorded periodically during the test by changing the value of the external resistance, showed maximal power density of 3.9 mW/$m^2$ at current density of 22 mA/$m^2$ on the $8^{th}$ day. This maximal power density remained small compared to the high current density (up to 250 mA/$m^2$) observed under chronoamperometry (section 3.1). The anode potential was measured during MFC operation vs. an Ag/AgCl reference electrode placed in the anode compartment. The polarization curves recorded by varying the value of the external resistance indicated that the open circuit potential was around -0.5 V and did not change significantly during MFC operation. The anode worked in the potential range from -0.35 to -0.25 V during MFC operation, i.e. very far from the potential values used for chronoamperometry tests (+0.3 to +0.7V vs. SCE). The biofilm consequently remained in the MFC configuration far from its full capacity. Besides, biofilm formed under poised potential may develop different electrochemical behavior than biofilms formed in MFC conditions.

### 3.4. Sludge MFC and compost-leachate MFC fed with acetate

In order to compare the electrochemical activity of the inoculum sources, MFCs were implemented with anaerobic sludge and compost leachate in the anode compartment.

Anolytes were added with NaCl 10 mM to improve ionic conductivity. MFCs operated first for several days without any addition of supplementary substrate, with a 1000 Ω external resistance. The current first increased, corresponding to biofilm formation, and then decreased back to zero, similarly to a cell discharge. When the current was back to around zero, 2 mM sodium acetate was added. In both cases, the current density increased very fast and returned close to zero after around 3 or 6 days for the compost-leachate MFC and the sludge MFC respectively (Figure 2). The sludge MFC gave higher performance (J in the range from 120 to 210 mA/m$^2$, Coulombic efficiency 9.6%) than the compost-leachate MFC (J from 100 to 160 mA/m$^2$, Coulombic efficiency 4.7%). The current densities obtained were in approximately the same ratio as the values obtained under chronoamperometry but had higher values (section 3.2), which is consistent because acetate was added in the MFC experiments and not in the chronoamperometry tests.

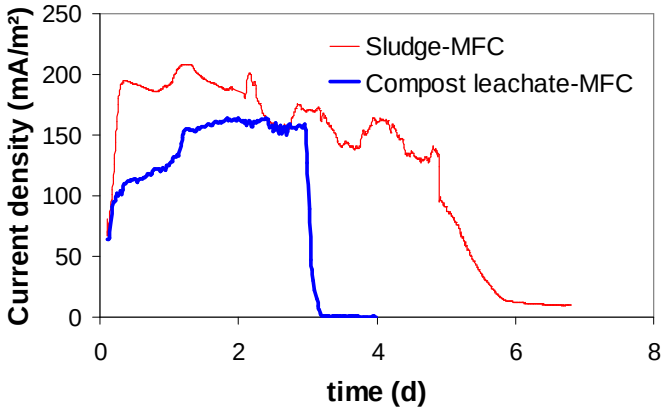



*Fig 2. Current density versus time in sludge MFC and compost-leachate MFC with sodium acetate 2mM. (R = 1000 Ω, $A_g$ = 10 cm$^2$). The curves start just after the addition of acetate.*

### 3.5. Sludge MFC fed with FAJ, WL and YW

Studies on MFC with complex substrates generally use diluted solutions. Heilmann and Logan (2006) diluted meat packing wastewater 1:4, Oh and Logan (2005) diluted cereal

wastewater from 5 950 to 595 mg COD/L, Zuo et al. (2006) diluted corn stover hydrolysates from 82 200 to 1 000 mg COD/L. Complex industrial wastes are generally diluted to avoid undesirable planktonic metabolisms that may compete with the biofilm-catalyzed electricity generation and also to decrease fouling on electrode and membrane surfaces. The three waste media FAJ, WL and YW, were consequently tested here after 1:20 v/v dilution with phosphate buffer 50 mM containing 10 mM NaCl.

Three sludge MFC systems were implemented with FAJ, WL or YW in the anode compartment. Anolytes were composed of 250 mL acclimated sludge (see experimental section) and 250 mL of diluted substrate. The resulting initial CODs in anolytes were 7 600, 20 200 and 14 300 mg/L for FAJ, WL and YW respectively. MFCs operated at 1000 Ω without appreciable current generation for 16 days (less than 5 $mW/m^2$). MFCs were kept for another month on open circuit for further acclimation of the inoculum sources to the substrate media and "spontaneous" COD removal. Thereafter, the electrical circuit was closed again through the 1000 Ω resistor (day 0 in Fig. 3), anolyte and catholyte were stirred at 350 rpm (from $8^{th}$ day), and raw substrate was added sequentially at the $14^{th}$, $15^{th}$ and $16^{th}$ days. Neither nitrogen nor air flowed into the MFC.

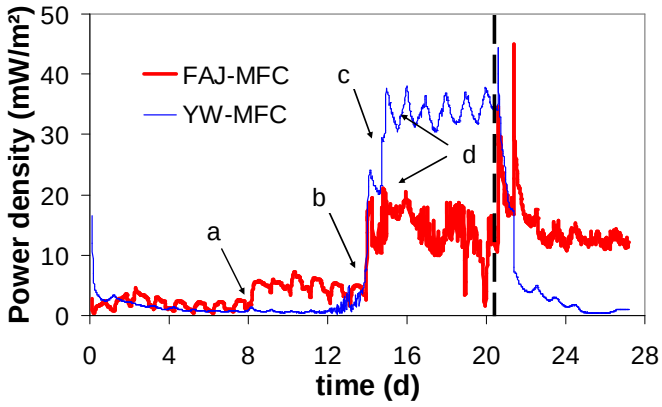



*Fig 3. Effect of substrate addition in sludge-MFC fueled with fermented apple juice (FAJ), and yogurt waste (YW). a) Stirring at 350 rpm. Substrate addition: b) 1 mL, c) 1 mL, d) 2 mL. Dashed line at day 20 indicates change of the anolyte (replacing 450 mL with substrate).*

Stirring improved MFC performance instantaneously with FAJ but not with YW. There was certainly no longer any substrate that could be metabolized by microorganisms in the YW-fed MFC. Power density increased with the first two additions of 1 mL raw substrate up to plateau values around 35 mW/m$^2$ with YW and 15 mW/m$^2$ with FAJ. WL never gave appreciable power density (always less than 0.25 mW/m$^2$). The last addition of 2 mL raw substrate did not increase the power for FAJ and YW. Similar saturation profiles have been reported by numerous authors: electricity generation is dependent on fuel concentration until a plateau is reached. This saturation value can be attributed to a maximum rate of electron transfer reached by the metabolic mechanisms and/or by an increase in alternate electron acceptors that compete with the anode (Catal et al., 2007, Gil et al., 2003, Kim et al., 2007, Lee et al., 2002, Liu et al., 2005, Min and Logan, 2004, Zuo et al., 2006). At the end of the experiment, polarization curves were recorded by changing the external resistance in order to determine the maximal power density that could be reached by each MFC. The values reported in Table 2 confirm that anaerobic sludge is promising source of electrochemical biocatalysts to enlarge the variety of fuels for MFC towards food industry wastes, even though some substrates, such as WL, remain quite recalcitrant.

A second experimental campaign was carried out by removing 450 mL of the solution from the anodic compartment and replacing it by fresh diluted substrate (1:20 v/v). The power density diminished continuously from 34 to 3 mW/m$^2$ with YW, while the MFC with FAJ kept the same power density of 13 – 14 mW/m$^2$. The reduction of power density in the MFC fueled with YW can be explained by a rise in fermentable compounds that favored fermentative microbial metabolisms against electron transfer to the anode (Freguia et al., 2007). Competitive fermentation processes did not occur with FAJ, probably because the fermentation process had already been completed during the preparation of the substrate.

The maximal power density ($P_{max}$) obtained during 1000 Ω operation and correlated current

densities (J), measured by varying the value of the external resistance, confirmed the conclusions (Table 2): sludge MFC fed with YW had the best performance and YW was optimally exploited at low concentration of substrate.

Table 2. Maximal power density and correlated current density extracted from polarization curves in MFC inoculated with anaerobic sludge and fed with FAJ, WL and YW. Time corresponds to power density evolution depicted in Fig 5.

| Time, days | FAJ | | WL | | YW | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | $P_{max,}$ mW/m$^2$ | J, mA/m$^2$ | $P_{max,}$ mW/m$^2$ | J, mA/m$^2$ | $P_{max,}$ mW/m$^2$ | J, mA/m$^2$ |
| 8 | 10.2 | 56.8 | 0.5 | 5.2 | 2 | 14.5 |
| 14 | 15.1 | 69.1 | 0.7 | 6.3 | 12.8 | 84.7 |
| 15 | 26.9 | 123.0 | 0.8 | 6.6 | 30.2 | 130.4 |
| 21 | 19.9 | 79.5 | 0.6 | 5.7 | 53.8 | 231.9 |
| 22 | 43.7 | 117.7 | 0.4 | 3.4 | 24.4 | 117.3 |
| 27 | 27.5 | 124.3 | $10^{-4}$ | 1.8 | 4.6 | 28.7 |

### 3.6. Compost-leachate MFC fed with FAJ and YW

The two substrates that gave the best performance in the sludge MFC (section 3.5), FAJ and YW, were tested in MFCs inoculated with leachate from garden compost. The anode compartments were filled with 500 mL previously acclimated compost leachate (see experimental section) and the external circuit was closed with a 1000 Ω resistance for 6 days in order to “discharge” the cell from the substrate contained in the inoculum. Then 1 mL of raw FAJ or YW was added to each cell. Figure 4 gives the power density obtained, starting from the addition of the substrate.

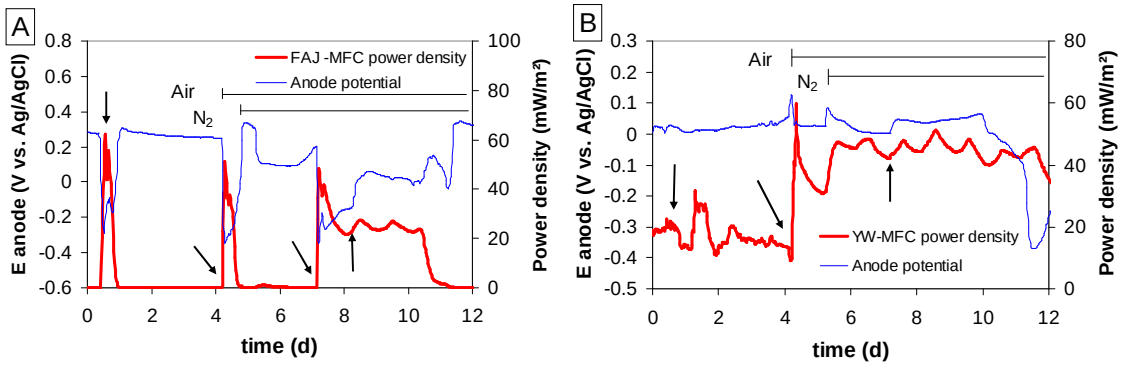



*Fig 4. Effect of substrate addition, nitrogen (anode) and air (cathode) sparging on compost-leachate MFCs. A) FAJ-fed MFC, B) YW-fed MFC. Arrows indicate additions of 1 mL raw substrate. R = 1000 ohms, $A_g$ = 10 $cm^2$*

With neither air nor nitrogen sparging, the first FAJ addition resulted in a power peak up to P = 62 $mW/m^2$, which returned to zero in less than one day (Figure 4A). The Coulombic efficiency corresponding to this peak was around 1 % with respect to the COD contained in the added aliquots. This suggests that the components that contributed to current generation in FAJ were easily utilized by the compost microorganisms (immediate increase of power density) but at low concentration (low value of Coulombic efficiency). In contrast, the first addition of YW did not induce any significant power increase from the baseline, around 20 $mW/m^2$ (Figure 4B).

The second substrate addition was simultaneous with air sparging in the cathode compartment (day 4). It resulted in a similar one-day peak with FAJ. The cathode reaction consequently did not affect this MFC. The second YW addition provoked an immediate increase of the power. In this case, air sparging in the cathode compartment significantly improved the behavior of the cell, indicating that the cathode introduced a limitation step in the YW-fed MFC. The power provided decreased from day 4 to day 5 and it rose again at day 5 when nitrogen was bubbled into the anode compartment. This behavior clearly indicated that oxygen diffused

though the membrane to the anode and disturbed the anode functioning, while nitrogen bubbling restored its full performance. The anode compartment likely contained facultative anaerobic microorganisms that were able to switch their metabolism from anode respiration to aerobic respiration. At the end of the experiment, the anode potential (Ea) varied towards negative values, indicating an improvement in anode efficiency.

In the FAJ-fed MFC, nitrogen sparging at day 5 did not have any effect on the power provided because compounds able to be metabolized had already been consumed at day 5. In contrast, the third FAJ addition (day 7) no longer resulted in a one-day power peak but in stable power. The two-day nitrogen sparging before the third FAJ addition likely modified the composition of the microbial population on the electrode surface, which became able to metabolize a larger range of organic compounds contained in the FAJ medium, confirming the beneficial effect of strict anaerobic conditions for both MFCs.

After continuous nitrogen (anode) and air (cathode) sparging, the power generation was stable in both MFCs. An ultimate substrate addition was made to verify the saturation value and determine the maximal power density provided in stationary conditions at 1000 Ω, which were 23 $mW/m^2$ for FAJ-fed MFC and 44 $mW/m^2$ for YW-fed MFC. The polarization curves (Figure 5) gave maximal values around 64 $mW/m^2$ (at 253 $mA/m^2$) and 92 $mW/m^2$ (at 404 $mA/m^2$) respectively

Strict control of simultaneous cathode aeration and anode deoxygenation are the main parameters that optimize MFC performance. These results obtained with similar compost-leachate MFCs also indicate that MFCs, even inoculated from the same source, can have different behaviors depending on the nature of the fuel. Such observations can explain, for instance, the discrepancies reported in the literature about the effect of aeration. It has often been observed that power density decreased as the air flow rate increased. Forcing air through a cathode tube has been shown to result in cell voltage reduction by 25% in an MFC

inoculated and fed with wastewater (Liu et al. 2004). In a test using 0 to 200 mL/min air flow rates, the power density of a similar MFC was reduced from 60 to 40 mW/m$^2$ (Min and Logan, 2004) but, conversely to these reports, Gil et al. (2003) showed a sharp current increase resulting from aeration of the cathode compartment at 100 mL/min in an MFC enriched over 3 years by feeding with starch processing wastewater.

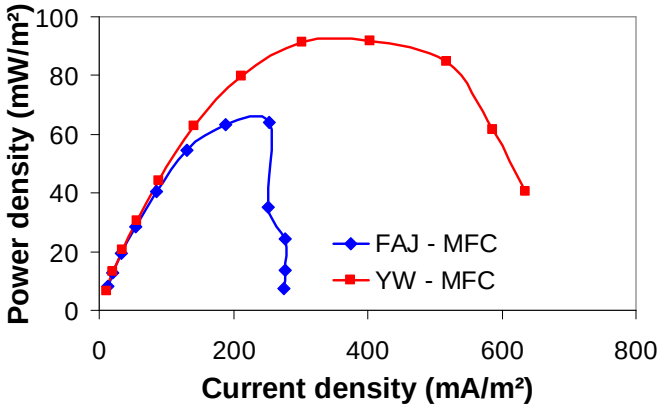



*Fig. 5 Power density recorded with various external resistances for compost-inoculated MFC fed with fermented apple juice (FAJ) or yogurt waste (YW).*

### 3.7. SEM observations

Electrodes from sludge MFC and compost-leachate MFC fed with YW were observed by SEM after 35 days of operation. The graphite fibers were poorly and non-uniformly colonized by bacteria. Dense microbial clusters with obvious formation of exopolymeric substances were rare, generally located only at the external electrode surface and not on the inner fibers (Fig 6A). Figure 6 presents pictures that are specific to the numerous observations made at different plots of each electrode. Fiber colonization was low with both inoculums (Fig 6B, C) and similar to that observed by other authors (Lee et al., 2003). Bacteria appeared to be predominantly *coccus* shaped; *coccus* shaped microbial colonization has also been mentioned by Liu & Logan (2004). Nevertheless, whatever the nature of the bioanodes, overall

colonization appeared to be very poor. There is much room for improving MFC performance by promoting biofilm colonization onto anodes, as has been demonstrated in MFC with single or mixed cultures (Bond and Lovley, 2003; Ren et al., 2007).

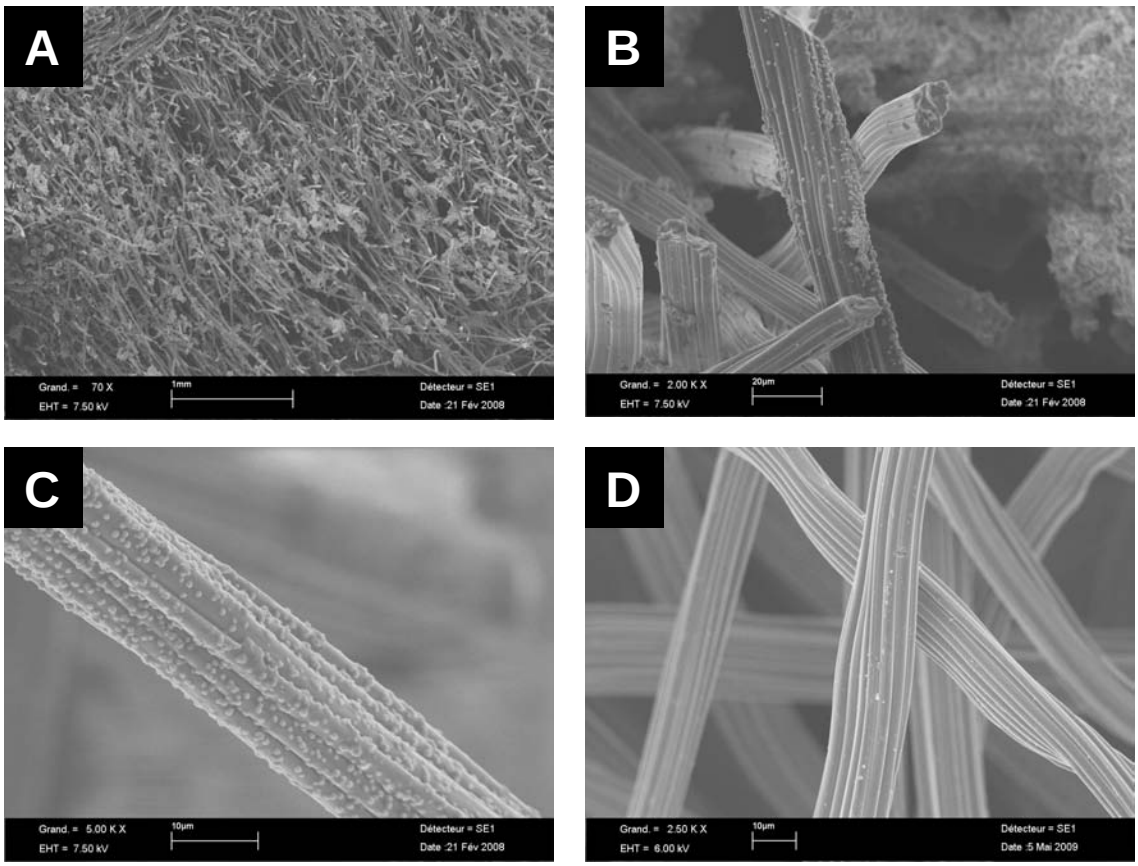



*Fig 6. Scanning electron micrographs of electrodes from MFC fed with YW after 35 days of operation at 1000Ω. A) External anode colonization from compost-leachate MFC. B) Graphite fiber colonization for compost-leachate MFC. C) Graphite fiber colonization for sludge MFC. D) Clean graphite fiber.*

## 4. Conclusions

Fermented apple juice, wine lees and yogurt waste were investigated here as possible fuels for MFC. Wine lees were definitely not suitable, yogurt waste was able to start an MFC with its endogenous microflora, while fermented apple juice was not. Nevertheless both FAJ and YW

can be used in MFC using anaerobic sludge or compost leachate as inoculum source. Performance was drastically influenced by nitrogen/oxygen sparging in the anodic/cathodic compartments. Under optimized conditions, compost-leachate-inoculated MFC fed with yogurt waste provided stable power density around 44 $mW/m^2$ (maximal value 92 $mW/m^2$ at 404 $mA/m^2$). Using microflora coming from garden compost or from sludge revealed both efficient to exploit food industry wastes as fuels. The low colonization of the graphite felt anode indicated that significant improvement can be expected by increasing microbial settlement on the electrode surface.

**Acknowledgments**

B. Cercado Quezada is supported by the European Union Programme of High Level Scholarships for Latin America (Program Alban), scholarship No. E06D101223MX. The authors gratefully thank L. Etcheverry (Engineer CNRS-LGC), B. Erable (Researcher CNRS-LGC), ML. de Solan (Microscopy manager at LGC), Dr. Albasi (Senior researcher CNRS-LGC) and Dr. Basseguy (Senior researcher CNRS-LGC) for their efficient help.

**References**

Bond, D. R., Lovley, D. R., 2005. Evidence for involvement of an electron shuttle in electricity generation by *Geothrix fermentans*. Appl. Environ. Microbiol. 71(4), 2186-2189.

Catal, T. Li K, Bermek H, Liu, H., 2008. Electricity production from twelve monosaccharides using microbial fuel cells. J. Power Sources. 175,196-200.

Chauduri, S. K., Lovley, D. R., 2003. Electricity generation by direct oxidation of glucose

in mediatorless microbial fuel cells. Nat. Biotechnol. 21(10), 1229-1232.

Dulon, S., Parot, S., Delia, M.L., Bergel, A., 2007. Electroactive biofilms: new means for electrochemistry. J. Appl. Electrochem. 37, 173-179.

Erable, B., Etcheverry, L., Bergel, A., 2009. Increased power from a two-chamber microbial fuel cell with a low-pH air-cathode compartment. Electrochem. Commun. 11, 619-622.

Freguia, S., Rabaey, K., Yuan, Z., Keller, J., 2007. Electron and carbon balances in microbial fuel cells reveal temporary bacterial storage behaviour during electricity generation. Environ. Sci. Technol. 41(8), 2915-2921.

Gil, G., Chang, I., Kim, B., Kim, M., Jang, J., Park, H., Kim, H., 2003. Operational parameters affecting the performance of a mediator-less microbial fuel cell. Biosens. Bioelectron. 18, 327-334.

He, Z., Angenent, L.T., 2006. Application of bacterial biocathodes in microbial fuel cells. Electroanalysis. 18(19-20), 2009-2015.

Heilmann, J., Logan, B., 2006. Production of electricity from proteins using a microbial fuel cell. Water Environ. Res. 78(5), 531-537.

Holmes, D.E., Bond, D.R., Lovley, D.R., 2004. Electron transfer by *Desulfobulbus propionicus* to Fe (III) and graphite electrodes. Appl. Environ. Microbiol. 70(2), 1234-1234.

Kim, N., Choi, Y., Jung, S., Kim S., 2000. Effect of initial carbon sources on the performance of microbial fuel cells containing *Proteus vulgaris*. Biotechnol. Bioeng. 70(1), 109-114.

Kim, J.R., Jung, S.H., Regan, J.M., Logan, B., 2007. Electricity generation and microbial community analysis of alcohol powered microbial fuel cells. Bioresource Technol. 98, 2568-2577.

Lee, J., Phung, N., Chang, I., Kim, B., Sung, H., 2003. Use of acetate for enrichment of electrochemically active microorganisms and their 16S rDNA analyses. FEMS Microbiol. Lett. 223, 185-191.

Lee, S., Choi, Y., Jung, S., Kim, S., 2002. Effect of initial carbon sources on the electrochemical detection of glucose by *Gluconobacter oxydans*. Bioelectrochem. 57, 173-178.

Liu, H., Ramnarayanan, R., Logan, B.E., 2004. Production of electricity during wastewater treatment using a single chamber microbial fuel cell. Environ. Sci. Technol. 38(7), 2281-2285.

Liu, H., Logan, B.E., 2004. Electricity generation using an air-cathode single chamber microbial fuel cell in the presence and absence of a proton exchange membrane. Environ. Sci. Technol. 38(14), 4040-4046.

Liu, H., Cheng, S., Logan, B. 2005. Production of electricity from acetate or butyrate using a single-chamber microbial fuel cell. Environ. Sci. Technol. 39(2), 658-662.

Melhuish, C., Ieropoulos, I., Greenman, J., Horsfield, I., 2006. Energetically autonomous robots: Food for thought. Auton. Robot. 21(3), 187-198.

Min, B., Logan, B. E., 2004. Continuous electricity generation from domestic wastewater and organic substrates in a flat plate microbial fuel cell. Environ. Sci. Technol. 38 (21), 5809-5814.

Min, B., Kim, J.R., Oh, S.E., Regan, J., Logan, B., 2005. Electricity generation from sewine wastewater using microbial fuel cells. Water Res. 39, 4961-4968.

Niessen, J., Schröder, U., Harnisch, F., Scholz, F., 2005. Gaining electricity from in situ oxidation of hydrogen produced by fermentative cellulose degradation. Lett. Appl. Microbiol. 41, 286-290.

Niessen, J., Harnisch, F., Rosenabaum, M., Schröder, U., Scholz, F., 2006. Heat treated soil

as convenient and versatile source of bacterial communities for microbial electricity generation. Electrochem. Commun. 8, 869-873.

Oh, S., Logan, B., 2005. Hydrogen and electricity production from a food processing wastewater using fermentation and microbial fuel cell technologies. Water Res. 39, 4673-4682.

Parot, S., Nercessian, O., Delia, M.L., Achouak, W., Bergel, A., 2009. Electrochemical checking of aerobic isolates from electrochemically active biofilms formed in compost. J. Appl. Microbiol. 106, 1350-1359.

Parot, S., Delia, M.L., Bergel, A., 2008b. Acetate to enhance electrochemical activity of biofilms from garden compost. Electrochim. Acta. 53, 2737-2742.

Parot, S., Delia, M.L., Bergel, A., 2008a. Forming electrochemically active biofilms from garden compost under chronoamperometry. Bioresour. Technol. 99, 4809-4816.

Rabaey, K., Clauwaert, P., Aelterman, P., Verstraete, W., 2005. Tubular microbial fuel cells for efficient electricity generation. Environ. Sci. Technol. 39 (20), 8077-8082.

Rabaey, K., Rodriguez, J., Blackall, L.L., Keller, J., Gross, P., Batstone, D., Verstraete, W., Nealson, K.H., 2007. Microbial ecology meets electrochemistry: electricity-driven and driving communities. The ISME Journal. 1, 9-18.

Rabaey, K., Van de Somperl, K., Magnien, L., Boon, N., Aelterman, P., Caluwaert, P., De Schamphelaire, L., Pham, H., Vermeulen, J., Verhaege, M., Lens, P., Verstraete, W., 2006. Microbial fuel cells for sulfide removal. Environ. Sci. Technol. 40 (17), 5218-5224.

Ren, Z., Ward, T.E., Regan, J.M., 2007. Electricity production from cellulose in a microbial fuel cell using a defined binary culture. Environ. Sci. Technol. 41, 4781-4786.

Rezaei, F., Richard, T.L., Brennan, R.A., Logan, B. E., 2007. Substrate-enhanced microbial fuel cells for improved remote power generation from sediment-based systems. Environ. Sci. Technol. 41, 4053-4058.

Rismani-Yazid, H., Christy, A. D., Dehority, B. A., Morrison, M., Yu, Z., Tuovinen, O. H., 2007. Electricity generation from cellulose by rumen microorganisms in microbial fuel cells. Biotechnol. Bioeng. 97(6), 1398-1407.

Schröder, U., 2007. Anodic electron transfer mechanisms in microbial fuel cells and their energy efficiency. Phys. Chem. Chem. Phys. 9, 2619-1629.

Scott, K., Murano, C., 2007. Microbial fuel cells utilizing carbohydrates. J. Chem. Technol. Biotechnol. 82, 92-100.

Zuo, Y., Maness, P., Logan, B., 2006. Electricity production from steam-exploded corn stover biomass. Energy Fuels. 20, 1716-1721.

## V.5 Biodépollution emmenée par les PACMs

### V.5.1 Abattement de la DCO et rendement faradique

L'abattement de la demande chimique en oxygène (DCO) a été mesuré sur des périodes de 7 jours dans le compartiment anodique de piles inoculées avec des boues anaérobies. Ces piles ont été mises en œuvre avec un rapport biocatalyseur/combustible de 1/9. Par contre, cette détermination a été faite durant des périodes variables, entre 1 et 2 jours, dans les piles inoculées avec des lixiviats de terreau, comme indiqué dans le Tableau V.3

Tableau V.3 Abattement de la DCO et rendements faradiques dans les piles inoculées avec des boues et des lixiviats de terreau alimentés en déchets agro-alimentaires.

| Biocatalyseur | Combustible | DCO initiale de l'anolyte (mg /L) | DCO abattue % | Densité puissance maximale ($mW/m^2$) | Rendement faradique % | Période (jours) | Référence |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Boues anaérobies[a] | Jus de pomme fermenté | 1 362 | 54 | 44 | 1,3 | 7 | Ce travail |
| | Lies de vin | 11 820 | 79 | 0,37 | $4.10^{-3}$ | 7 | Ce travail |
| | Résidus laitiers | 5 036 | 66 | 24 | 0,08 | 7 | Ce travail |
| Lixiviat de terreau | Jus de pomme fermenté | 866 | 19 | 39 | 0,9 | 1,7 | Ce travail |
| | Résidus laitiers | 897 | 18 | 28 | 1,2 | 1,7 | Ce travail |
| Effluents de ferme | Effluents de ferme | 8 320 | 27[s] | 45[t] ; 261[s] | 8 (1,8)[s] | - | Min et al. 2005 |
| Anolyte d'une pile antérieure | Effluents d'une industrie de céréales [t] | 595 | 95 | 81 | 27,1 | - | Oh & Logan, 2005 |
| Effluents de l'emballage de la viande | Effluents d'emballage de viande[s] | 5 540<br>Dil 1:4<br>(1 420) | -<br>87 | 139<br>80 | - | - | Heilmann & Logan, 2006 |
| Effluents urbaines | Hydrolysat de maïs [s] | 1 000 | 76 | 371 | 20 – 30 | - | Zuo et al. 2006 |

a. Rapport biocatalyseur / combustible = 1/9; t. PACM à deux compartiments; s. PACM d'un seul compartiment

La plupart des études dédiées à l'exploitation de combustibles complexes au sein de charges organiques élevées utilisent des dilutions de combustibles. Ainsi, Heilmann & Logan (2006) diluent des effluents d'emballage de viande dans un rapport 1:4, Oh & Logan (2005) diluent des effluents d'une industrie alimentaire de la transformation de céréales d'un facteur 10 pour obtenir 595 mg/L de DCO, et Zuo et al. (2006) diluent un hydrolysat de maïs de 82 200 mg/L de DCO initial à 1 000 mg/L. Bien que les raisons de ces dilutions ne soient pas explicitées, les auteurs ont certainement trouvé là des conditions favorables ; on peut supposer qu'ils ont ainsi réduit le temps de test, évité le colmatage de la membrane par des particules en suspension et/ou le développement de microorganismes planctoniques et certainement favorisé l'établissement des biofilms électroactifs.

Les valeurs de DCO testées ici avec les piles inoculées avec des boues sont plutôt élevées, si nous fixons le maximum en DCO eu égard aux habitudes décrites dans la bibliographie à une valeur limite de 1000 mg/L. Nous pouvons observer que l'abattement de la DCO augmente avec la concentration du combustible, alors que la densité de puissance maximale de même que le rendement faradique diminuent avec la concentration.

Dans le cas des piles inoculées avec des lixiviats de terreau, les valeurs initiales de DCO sont plutôt faibles, inférieures à 1000 mg/L (Tableau V.3). L'abattement de DCO et le rendement faradique sont similaires pour les deux combustibles. Les abattements de DCO sont plus faibles que pour la pile inoculée avec les boues et les rendements faradiques, qui restent très faibles, un peu plus élevés. Ces différences entre piles inoculées avec les boues et piles inoculées avec les lixiviats de terreau paraissent logiques car d'une part les boues contiennent des micro-organismes spécifiques des processus de dégradation qui conduisent donc à des abattements en DCO plus importants ; d'autre part la plus forte concentration en DCO dans les premiers cas détourne une part plus important du combustible vers des processus planctoniques.

Les rendements faradiques des piles de 0,004 à 1,3% sont inférieurs à ceux rapportés dans d'autres études (de 8 à 30%). Ces valeurs confirment que les concentrations de substrat élevées utilisées ici défavorisent les processus électricigènes en favorisant les voies fermentatives (Freguia et al. 2007, Rabaey et al. 2007, Schröder et al. 2007). Une comparaison directe peut être faite avec les donnés de Oh & Logan (2006) qui utilisent une pile à deux compartiments inoculée avec des boues. Ils obtiennent une réduction de DCO de

95% avec un rendement faradique de 27%, alors que nous avons une réduction de 66% avec un rendement de 0,08%. La différence majeure entre les deux études, excepté le type de combustible utilisé, est la concentration, Oh & Logan ont une DCO de 595 mg/L alors que nous travaillons avec une concentration environ 10 fois supérieure de 5 036 mg/L DCO (boues anaérobies alimentés avec les déchets de laiterie).

### V.5.2 Conversion idéale d'énergie chimique en énergie électrique

Les donnes obtenues avec les courbes de puissance ont été exploitées pour calculer la conversion maximale de DCO qui pourrait être due à la production électrique. Le courant maximal de la pile est calculé par

$$I_{\max} = J_{\max} \cdot A_g \qquad \text{Eq. V.1}$$

où $J_{max}$ est la densité de courant maximale déterminée par le tracé de courbes de puissance (Tableau V.2) et $A_g$ est l'aire géométrique de l'électrode (10 cm²). Ensuite la quantité d'électricité maximale ($Q_{max}$) qui pourrait être produite est calculée en considérant la période d'opération de la pile avec la relation

$$Q_{max}\ (\text{Coulomb}) = I_{max}(A) \cdot t(s) \qquad \text{Eq. V.2}$$

où t est le temps d'opération de la pile. Il est ainsi possible de déterminer la variation en DCO théoriquement possible (△DCO, g/L) pour une pile fonctionnant à sa performance maximale en utilisant l'équation:

$$Q_{théorique} = \frac{F \cdot n \cdot \Delta DCO \cdot V}{M} \qquad \text{Eq. V.3}$$

où F est la constante de Faraday (96 485 Coulomb/mol), n est le nombre d'électrons transférés par mol (4 mol-électron/mol DCO), V le volume d'électrolyte (0,5 L), M la masse moléculaire de l'oxygène (32 g/mol).

La conversion maximale ainsi calculée est faible pour toutes les piles. Le Tableau V.4 montre l'abattement en DCO estimé à partir de la densité de courant maximale obtenue par les courbes de polarisation, et l'abattement en DCO observé expérimentalement.

Tableau V.4 Conversion idéale de l'énergie chimique en énergie électrique.

| Biocatalyseur | Combustible | Densité de courant maximale ($mA/m^2$) | Abattement DCO (mg/L) Estimation | Abattement DCO (mg/L) Expérimental |
|---|---|---|---|---|
| Boues anaérobies | Jus de pommes fermenté | 234 | 37 | 500 |
| | Lies de vin | 14 | 1,4 | 2 500 |
| | Déchets de laiterie | 407 | 41 | 5 200 |
| Lixiviats de terreau | Jus de pommes fermenté | 253 | 6 | 164 |
| | Déchets de laiterie | 404 | 9,8 | 139 |

D'après ces résultats, il est clair que la limitation majeure des PACMs reste le rendement faradique si l'on vise la production d'électricité. Même si la pile avait opéré à ses capacités maximales, l'efficacité de conversion de la matière en énergie serait restée faible.

## V.6 Evaluation de la PACM inoculée avec des lixiviats de terreau alimentés en déchets de laiterie en conditions opératoires optimales

Ce test s'est attaché à mettre en œuvre les conditions opératoires déterminées dans les chapitres précédents afin de faire évoluer les performances de la pile. Une pile à deux compartiments de 500 mL chacun, reliés par une membrane échangeuse de protons a été utilisée. L'anode en feutre de graphite (2 cm x 5 cm x 1 cm) est prétraitée par l'adsorption de résidus laitiers. Elle est connectée à la cathode, une grille de platine (2 cm x 5 cm), au-travers d'une résistance de 1000 ohms. L'anolyte est composé de lixiviats de terreau auquel est ajouté 1 mL de résidus laitiers. Des ajouts successifs de combustible ont ensuite été réalisés, et la température opératoire a été augmentée de 30°C à 40°C grâce à un bain marie. L'anolyte était agité par un barreau magnétique.

La pile est restée en circuit ouvert pendant 2 jours. Une tension de circuit ouvert stable de 0,78 V est atteinte en 28h. Ensuite, le circuit électrique est fermé par une résistance de 1000 ohms. La densité de puissance commence à augmenter immédiatement, et se stabilise le quatrième jour à environ 20 mW/m² ; l'ajout de 1 mL de résidus de laiterie amène une faible augmentation de la densité de puissance (Fig V.7A).

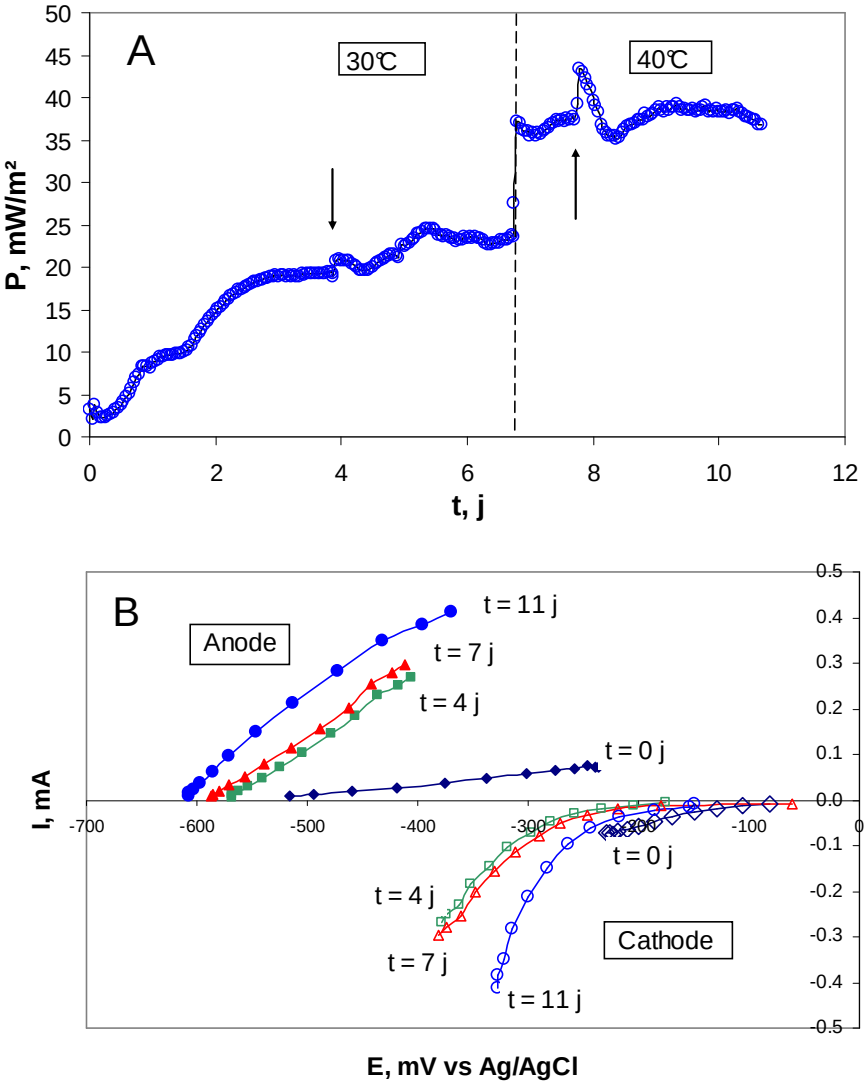



*Fig V.7 Performance de la pile inoculée avec du lixiviat de terreau et alimentée avec des résidus de laiterie en conditions améliorées. A) densité de puissance, les flèches indiquent l'ajout de combustible, B) courbes intensité-potentiel de l'anode et de la cathode. Ea calculé Ea = Ec – Upile ; Ec mesuré vs. Ag/AgCl.*

La Fig V.7B montre que la performance de l'anode n'a pas été affectée par l'ajout de substrat dans une période de 3 jours d'opération ; en effet, la courbe de polarisation « à 4 jours » tracée avant l'ajout de combustible est pratiquement identique à la courbe « à 7 jours » déterminée juste avant d'augmenter la température.

Au 7$^{ème}$ jour la température d'opération a été augmentée de 30°C à 40°C, ce qui provoque une augmentation de la densité de puissance immédiate de 23 à 37 mW/m², donc possiblement une réponse abiotique. Un nouvel ajout de combustible dans le courant du jour 7 (jour 7,7) n'a pas eu d'effet notable sur la densité de puissance (Fig V.7A), néanmoins les courbes de polarisation montrent une amélioration de la performance de l'anode car le potentiel à courant nul a légèrement diminué.

L'augmentation de la température a une influence importante sur les performances de l'anode, alors que ni l'ajout de combustible ni la maturation du biofilm n'ont d'effet notable. Durant les premiers jours d'opération le développement du biofilm est mis en évidence par l'évolution des courbes de polarisation (Fig V.7B, anode t = 0j et 4j), mais une fois le biofilm formé il n'est plus observé d'amélioration de l'anode dans le temps (Fig V.7B, anode t = 4j et 7j). Les potentiels à courant nul de la cathode sont déplacés vers des valeurs négatives probablement du fait de la dégradation des électrodes de référence Ag/AgCl.

La comparaison des courbes de puissance (Fig V.8A) et de l'évolution de la puissance en fonction du temps (Fig V.7A) indiquent que la pile débitant dans une résistance de 1000 ohm opérait dans des conditions proches de celle de la puissance maximale.

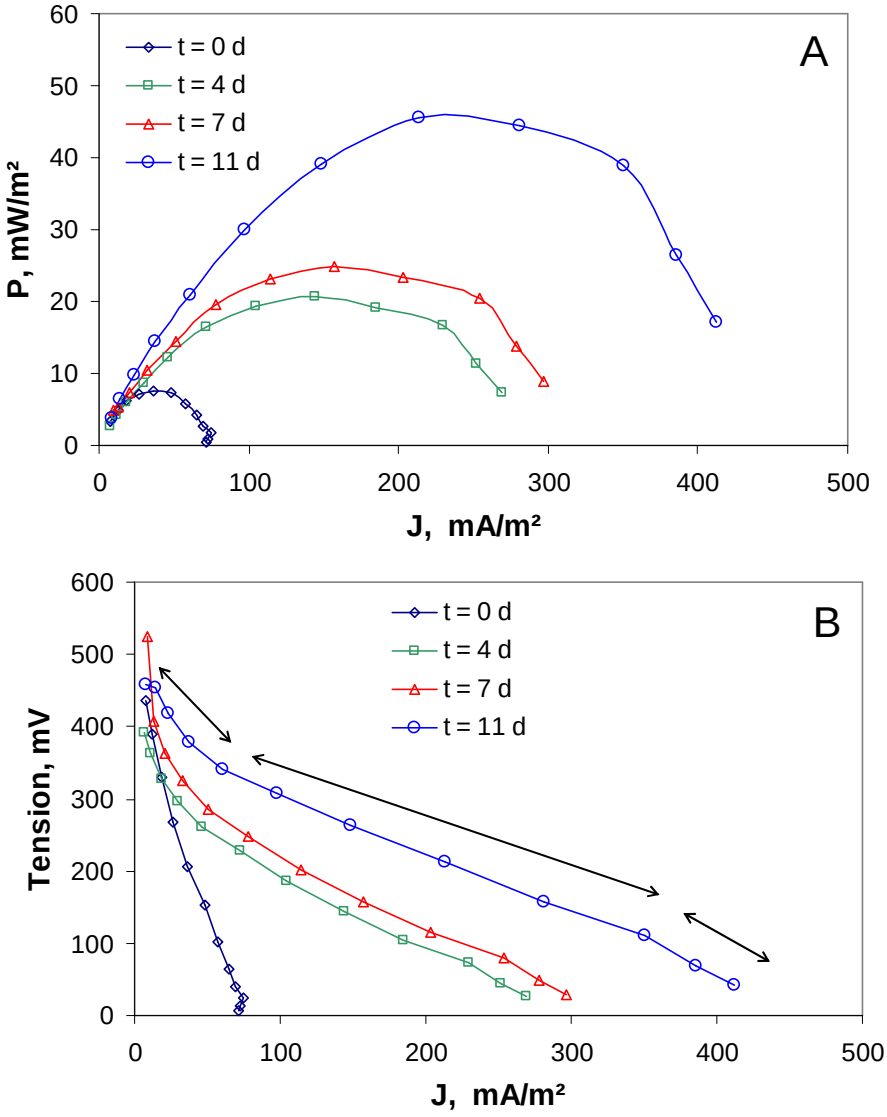



*Fig V.8 Performance de la pile inoculée avec du lixiviat de terreau et alimentée avec des résidus de laiterie opérée en conditions améliorées. A) courbes de puissance; B) courbes de polarisation (Tension-Intensité).*

A 30°C la pile se stabilise à 23 mW/m² en correspondance avec la puissance maximale 24,8 mW/m² déterminée par la courbe de puissance. Cette correspondance est également observée à 40°C. Les courbes Tension-Intensité présentent les trois régions mentionnées dans la section V.3.2. Nous pouvons remarquer que ces trois régions se développent lorsque la densité de courant est assez élevée, de l'ordre de 300 mA/m² (Fig V.6B ; Fig V.8B). Les tensions en circuit ouvert sont plutôt basses, de l'ordre de 0,4 à 0,5 V, alors qu'en théorie une pile microbienne peut développer jusqu'à 0,8 V, comme il a été observé dans la pile inoculée avec des boues et alimenté avec de l'acétate (Fig V.1).

Cette faible tension nous a fait supposer que la performance de la pile ne serait pas optimale. D'autre part, la densité de courant maximale (courant limite) a atteint un peu plus de 400 mA/m². Cette valeur est similaire à celle obtenue avec la pile inoculée avec des boues anaérobies et alimentée avec des résidus laitiers, mais opérée à température ambiante (407 mA/m², Tableau V.2). Dans la mesure où les courants limites sont par définition contrôlés par les phénomènes de transport il parait logique qu'ils soient assez peu sensibles à la température.

Le courant limite de la pile formée avec le système lixiviats de terreau-résidus laitiers avant la tentative d'amélioration des conditions est plus élevé (636 mA/m², Fig 5 de l'article), ce qui pourrait indiquer des limitations dues au montage expérimental. Ces observations confirment que la pile n'était pas dans des conditions optimales, malgré les efforts mis en place. Apparemment, l'optimisation du système est plus complexe que prévu, il n'est pas suffisant de rassembler chaque valeur optimale des paramètres, mais certains paramètres, comme par exemple le comportement de la membrane échangeuse d'ions et peut-être sa pollution par le milieu anodique, semblent encore nous échapper.

## V.7 Conclusions

Les comparaisons de l'efficacité des inocula composés de cultures mixtes ou de consortia sont rares dans la bibliographie. Nous avons comparé ici les boues anaérobies et les lixiviats de terreau en utilisant de l'acétate comme combustible modèle. Les premiers résultats ont indiqué que les boues assuraient de meilleures performances, cependant les résultats ultérieurs démontrent que l'évaluation des performances doit être faite plutôt sur le binôme biocatalyseur-combustible.

L'évaluation des piles inoculés soit avec des boues anaérobies soit avec des lixiviats de terreau et alimentées par les résidus agro-alimentaires a également mis en évidence que le processus d'optimisation, qui portait sur les paramètres concentration du substrat, agitation, rapport biocatalyseur/combustible, est fortement dépendant du binôme biocatalyseur-combustible.

La campagne expérimentale mettant en œuvre les conditions opératoires qui devrait permettre d'améliorer les performances de la pile a révélé que l'optimisation du système en pile est plus complexe. La pile dans ces conditions « améliorées » n'a pas amené de meilleures performances que les expérimentations précédentes. Nous avons confirmé que la tension en circuit ouvert est un paramètre de prédiction utile. Les courbes de puissance et de polarisation ont confirmé les faibles performances de cette pile. C'est le paramètre température qui a démontré avoir le plus d'influence sur la production électrique.

Enfin, les mesures de la DCO contenue dans l'anolyte ont montré que la limitation essentielle des PACMs est le rendement faradique. Même si les piles opèrent à leur capacité maximale, l'efficacité de la conversion de l'énergie chimique en énergie électrique reste faible. Par contre, les abattements en DCO sont très significatifs. On peut par conséquent se demander dans quelle mesure la présence des électrodes a pu ou non modifier les processus microbiens et favoriser ou non l'abattement de DCO. La formation du biofilm sur l'électrode s'accompagne probablement du décrochage de micro-organismes du biofilm vers la solution. Il serait intéressant de déterminer si ces phénomènes ont un effet significatif sur les processus microbiens de consommation de la matière carbonée. C'est une piste qui n'a pas été exploitée dans le présent travail, axé sur la production d'énergie électrique, mais qui pourrait être poursuivie par la suite.

## V.8 Références

Cheng S, Liu H, Logan Bruce (2006) Increased performance of single-chamber microbial fuel cells using an improved cathode structure. *Electrochem. Commun*. 8:489-494.

Choi MJ, Chae KJ, Ajayi FF, Park WS, Kim IS (2007) Electricity generation from acetate, propionate, butyrate and glucose using two-chambered microbial fuel cells. 11th IWA World Congress on Anaerobic Digestion. 23-27 September. Brisbane, Australia.

Freguia S. Rabaey K. Yuan Z. Keller J. (2007) Electron and carbon balances in microbial fuel cells reveal temporary bacterial storage behaviour during electricity generation. *Environ. Sci. Technol*. 41(8):2915-2921.

Heilmann J, Logan B (2006) Production of electricity from proteins using a microbial fuel cell. *Water Environ. Res*. 78(5):531-537.

Larminie J, Dicks A (2003) "Fuel Cell Systems Explained" 2nd ed. Wiley Inc. England. 406p.

Lefebvre O, Al-Mamun A, Ng HG (2007) A compact and cost-effective microbial fuel cell for treatment of domestic and acetate wastewater. 11th IWA World Congress on Anaerobic Digestion. 23-27 September. Brisbane, Australia.

Liu H, Ramnarayanan R, Logan BE (2004) Production of electricity during wastewater treatment using a single chamber microbial fuel cell. *Environ. Sci. Technol*. 38(7):2281-2285.

Liu H. Cheng S. Logan BE (2005) Production of electricity from acetate or butyrate using a single-chamber microbial fuel cell. *Environ. Sci. Technol*. 39(2): 658-662.

Min B, Cheng S, Logan BE (2005) Electricity generation using membrane and salt bridge microbial fuel cells. *Water Research.* 39:1675-1686.

Oh SE, Logan B (2005) Hydrogen and electricity production from a food processing wastewater using fermentation and microbial fuel cell technologies. *Water Res*. 39:4673-4682.

Oh SE, Logan B (2006) Proton exchange membrane and electrode surface areas as factors that affect power generation in microbial fuel cell. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 70:162-169.

Rabaey K, Clauwaert P, Aelterman P, Verstraete W (2005) Tubular microbial fuel cells for efficient electricity generation. *Environ. Sci. Technol*. 39(20):8077-8082.

Rabaey K, Rodriguez J, Blackall LL, Keller J, Gross P, Batstone D, Verstraete W, Nealson KH (2007) Microbial ecology meets electrochemistry: electricity-driven and driving communities. *The ISME Journal*. 1: 9-18.

Rabaey K, Verstraete W (2005) Microbial fuel cells: novel biotechnology for energy generation. *Trends. Biotechnol*. 23(6):291-298.

Schröder U (2007) Anodic electron transfer mechanisms in microbial fuel cells and their energy efficiency. *Phys. Chem. Chem. Phys*. 9:2619-1629.

Torres IC, Marcus AK, Rittmann BE (2008) Proton transport inside the biofilm limits electrical current generation by anode-respiring bacteria. *Biotechnol. Bioeng*. doi: 10.1002/Bit.21821

Zuo Y, Maness P, Logan B (2006) Electricity production from steam-exploded corn stover biomass. *Energy Fuels*. 20:1716-1721.

# Conclusion générale

Ce travail de thèse s'insère dans la recherche de nouvelles filières de production d'énergie propre et renouvelable et, en parallèle, dans le développement de nouvelles technologies de biodépollution environnementale.

Les travaux menés durant la thèse ont bénéficié de la découverte de microorganismes électroactifs dans le terreau de jardin d'une part, et de l'observation que le lait pouvait être un combustible efficace pour les PACMs marines, d'autre part. Ces contributions étaient issues de deux thèses soutenues au sein du Laboratoire de Génie Chimique de Toulouse en octobre et décembre 2007. Un certain nombre des essais qui ont suivi ont mis en évidence les limitations des bioanodes formées dans le terreau qui peuvent difficilement être utilisées *ex-situ.* Par contre l'utilisation de lait s'est vite avéré un cas particulier des vastes possibilités d'utilisation de résidus alimentaires comme combustible des PACMs. En associant les deux observations et en définissant de nouvelles procédures nous sommes parvenus à exploiter la microflore indigène du terreau pour produire de l'électricité à partir de résidus issus des industries agricole et alimentaire.

Le premier objectif de ce travail a été défini comme l'évaluation des milieux qui peuvent constituer des sources de biocatalyseur et/ou de combustible. Dans un deuxième temps, le travail a focalisé la recherche de conditions opératoires favorisant tant la génération d'électricité que la biodépollution. Ces deux premiers objectifs ont été menés en conditions électrochimiques bien contrôlées, en cellule électrochimique, sous potentiel imposé. A la fin de ces études, le système biocatalyseur-combustible qui donnait les meilleures performances et les conditions opératoires le plus favorables pour la production d'énergie ont été mis en œuvre en PACM.

La préparation des milieux utilisés comme source de biocatalyseur nous a conduits à définir une nouvelle procédure qui permet d'exploiter les microorganismes électroactifs issus du terreau. Les lixiviats de terreau se sont en effet avérés manipulables sans aucune exigence de conditions anaérobies, alors que les bioanodes formées directement dans le terreau ne supportaient pas la mise à l'air. La chronoampérométrie à potentiel constant a permis de tracer des courbes courants-temps caractéristiques des cinétiques électro-microbiennes et de les utiliser pour sélectionner les milieux. La mise en évidence que les résidus laitiers peuvent être à la fois un combustible et une source de biocatalyseur et qu'ils permettent une génération soutenue d'électricité grâce à leur évolution au cours du temps, constitue un résultat notable de cette partie.

La suite de l'étude a eu comme objectif l'optimisation de la génération de courant et de la biodépollution directement en configuration de PACM. Plusieurs paramètres ont été investigués tels que la procédure de démarrage, la concentration de combustible, la température opératoire. Il a été constaté que l'étape d'acclimatation du biocatalyseur aux substrats n'est pas nécessaire pour le couple lixiviats de terreau - résidus laitiers, ce qui résulte en une réduction heureuse du temps d'opération. Toujours avec le même objectif

d'optimisation, l'adsorption de résidus organiques sur l'anode paraît une méthode simple et rapide d'améliorer les performances. Cette procédure de formation du biofilm électroactif doit toutefois être considérée avec précaution, car certains composants des résidus pourraient s'adsorber au détriment de la formation du biofilm.

L'étude de l'influence de la concentration du combustible sur l'efficacité du biofilm a amené des résultats inattendus. Des concentrations élevées de résidus laitiers ont ralenti la cinétique électro-microbienne des lixiviats de terreau, par contre l'efficacité des boues anaérobies n'a pas été affectée par la concentration du combustible. Pour mieux comprendre les profils d'évolution du courant obtenus avec les résidus laitiers, l'étude a été poursuivie en utilisant le lactose et la caséine comme constituants modèle. Il a ainsi été constaté que la protéine a une influence prépondérante sur le démarrage de la production de courant, alors que c'est le lactose qui contrôle ensuite la cinétique électro-microbienne. Ces observations mettent en lumière l'importance de la nature du système biocatalyseur-combustible dans le fonctionnement des PACMs. Clairement la sélection du biocatalyseur devra se faire en fonction des caractéristiques des effluents, ou bien il est envisageable que les effluents suivent un prétraitement (par une unité de dépollution) qui les adapte au biocatalyseur disponible.

L'accélération des réactions par l'augmentation de la température était un phénomène prévisible et déjà constaté dans les PACMs. L'étude de la température a donc été couplée à des tentatives d'optimisation portant sur d'autres paramètres. Ainsi une anode prétraitée par l'adsorption de déchets de laiterie plongée dans un mélange de lixiviats de terreau contenant également une faible proportion de déchets de laiterie (100µL pour 150 mL d'électrolyte) a atteint une densité de courant de 1 655 mA/m² à potentiel imposé de +0,1V/ECS, valeur parmi les plus élevées obtenues avec des résidus réels.

Les travaux destinés à caractériser la capacité de biodépollution des PACMs ont été le prétexte à la comparaison de deux sources de biocatalyseurs : les lixiviats de terreau et des boues anaérobies. Les boues sont des biocatalyseurs fréquemment utilisés dans des bioréacteurs de traitement des effluents et largement étudiés dans les recherches sur les PACMs. Les lixiviats de terreau se sont révélés plus efficaces pour l'abattement de la DCO, malgré le faible rendement faradique associé. Ces résultats encouragent à continuer à exploiter les microorganismes issus du terreau pour concevoir des PACM de traitement d'effluents.

Dans la dernière partie de la thèse, les conditions opératoires et les milieux identifiés comme optimaux ont été appliqués en configuration PACM. Tout d'abord, l'évaluation de cinq combinaisons « biocatalyseur – combustible » (trois combustibles, deux biocatalyseurs) suggère que la concentration du combustible est un facteur essentiel pour le contrôle des équilibres entre les réactions électricigènes et les processus parasites fermentatifs et méthanogènes qui s'établissent inévitablement dans l'anolyte des piles. L'optimum de tels équilibres a été recherché en étudiant l'influence de la proportion « biocatalyseur/combustible » sur les performances de la PACM. Une fois de plus, les résultats ont varié selon le système d'étude, la diminution du rapport « biocatalyseur/combustible » n'a pas affecté le système « boues – jus de pommes fermenté », alors que la performance de la PACM « boues – résidus laitiers » a été réduite. A la fin de cette partie de la thèse, les conditions opératoires optimales déterminées antérieurement ont été mises en place dans une PACM. Le résultat obtenu n'a pas été meilleur que celui des piles en conditions non améliorées. Il faut en conclure que l'association de conditions optimales

pour chaque paramètre ne conduit pas nécessairement à un système optimal, ce qui confirme la complexité des piles à combustible microbiennes.

Dans son ensemble le travail de thèse permet de conclure que la biodiversité des microorganismes électroactifs est un sujet de recherche qui doit se poursuivre tant avec des milieux naturels comme source de biocatalyseurs qu'en ciblant des composés organiques polluants comme combustibles possibles. En modifiant certaines conditions, comme la concentration du substrat, la température…des microorganismes électroactifs pourraient se révéler qui ne seraient pas détectés dans des conditions standard.

Au niveau du procédé, il semble clair que des actions simples comme le prétraitement des électrodes et l'augmentation de la température peuvent améliorer considérablement la performance des anodes en conditions de potentiel imposé, mais il faut prendre avec précaution l'optimisation des paramètres individuels, car l'association de conditions optimisées n'assure pas nécessairement l'amélioration des performances d'une PACM.
Cette approche innovante de l'étude des systèmes « biocatalyseur – substrat » a permis de contribuer à l'avancement des connaissances sur les piles à combustible microbiennes.

Sur la base des travaux réalisés quelques perspectives peuvent être proposées. Revenons d'abord sur l'un des résultats importants de cette thèse : les microorganismes issus du terreau permettent de concevoir des PACMs de traitement d'effluents parfois plus efficaces que celles conçues dans des conditions similaires à partir de boues de stations d'épuration. Cette conclusion est à ce jour totalement originale et ouvre une piste innovante pour l'amélioration des PACMs, surtout pour les PACMs destinées au traitement d'effluents et résidus. La microflore des sols est connue pour être très riche, mais elle reste peu exploitée dans le cadre des PACMs. La difficulté d'utiliser *ex situ* les bioanodes formées dans les terreaux était sans aucun doute un verrou majeur pour l'exploitation du potentiel des microflores des sols. La procédure de lixiviation mise au point ici pourrait offrir une clé précieuse. Un screening des milieux naturels solides est maintenant envisageable ; les résultats préliminaires présentés ici sont très prometteurs.

Les travaux menés dans cette thèse ont souvent souffert des faibles performances ou de performances non reproductibles des cathodes utilisées. De très nombreux travaux présentés dans la bibliographie utilisent des cathodes à air, qui ont la forme de tissus de carbone enrichis de particules de platine, mais dont l'efficacité n'est pas satisfaisante. Les cathodes disponibles sur le marché pour les piles à combustible traditionnelles ont été conçues pour fonctionner à des pH très acides ou alcalins et elles perdent la plus grande partie de leur efficacité aux pH neutres auxquels les PACMs fonctionnent. Il parait donc essentiel de poursuivre des recherches sur la conception de cathodes biotiques ou abiotiques qui assureront de meilleures performances pour la réduction de l'oxygène à des pH proche de la neutralité.

Au niveau de la méthodologie, l'analyse des voltammétries cycliques devrait être approfondie. Les nombreuses voltammétries présentés ici montrent des caractéristiques différentes et il parait essentiel de focaliser un système donné pour entreprendre un travail analytique détaillé. Le couplage des analyses électrochimiques avec l'analyse chimique des milieux devrait être tenté afin d'identifier les molécules qui génèrent les valeurs de courant parfois si élevées. En effet, les voltammogrammes donnent parfois des densités de courant anormalement élevées par rapport aux valeurs enregistrées à potentiel imposé, ce qui fait supposer la présence de composés capables de réactions électrochimiques réversibles. Les

voltammétries révèleraient alors probablement la présence de médiateurs électrochimiques produits par les microorganismes. L'identification de ces composés pourrait ouvrir une voie intéressante d'amélioration des PACMs. Pour les substrats complexes, de type laiterie, l'analyse chimique du milieu s'avère aussi nécessaire pour identifier l'influence des différents composés sur les performances d'une PACM. Suivant les résultats, la PACM pourrait s'insérer dans une unité de traitement assurant le prétraitement du substrat avant son utilisation en pile.

Evidemment, de nombreux autres paramètres tels que l'efficacité des membranes échangeuses d'ions qui servent de séparateur, la géométrie des piles, la disposition des électrodes, c'est-à-dire le design des PACMs, doivent aussi être optimisés. C'est là une approche sans doute plus classique de génie électrochimique, qui ne pourra être valablement entreprise qu'après avoir déterminé des cinétiques électro-microbiennes suffisamment sûres pour établir les calculs.

# Références

## A

Aceves-Lara CA, Latrille E, Buffiere P, Bernet N, Steyer JP (2008) Experimental determination by principal component análisis of a reaction pathway of biohydrogen production by anaerobic fermentation. *Chem. Eng. Process*. 47: 1968-1975.

Aulenta F, Canosa A, Reale P, Rossetti S, Panero S, Majone M (2008) Microbial reductive dechlorination of trichloroethene to ethene with electrodes serving as electron donors without the external addition of redox mediators. *Biotechnol. Bioeng.* doi 10.1002/bit.2223

## B

Bergel A, Féron D, Mollica A (2005) Catalysis of oxygen reduction in PEM fuel cell by seawater biofilm. *Electrochem. Commun*. 7:900-904.

Beyenal H, Lewandowski Z (2005) Modelling mass transport and microbial activity in stratified biofilms. *Chem. Engin. Sc.*. 60:4337-4348.

Biffinger J, Ringeisen B (2008) Engineering microbial fuel cells: Recent patents and new directions. *Recent Pantents on Biotechnology*. 2:150-155.

Bond DR, Lovely DR (2003) Electricity production by *Geobacter sulfurreducens* attached to electrodes. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(3):1548-1555

Bond DR, Lovley DR (2005) Evidence for involvement of an electron shuttle in electricity generation by *Geothrix fermentans. Appl. Environ. Microbiol*. 71( 4):2186-2189.

## C

Catal T, Li K, Bermek H, Liu H (2008) Electricity production from twelve monosaccharides using microbial fuel cells. *J. Power Sources*. 175:196-200.

Catal T, Fan Y, Li K, Bermek H, Liu H (2008) Effects of furan derivatives and phenolic compounds on electricity generation in microbial fuel cells. *J. Power Sources.* 180:162-166.

Chang IS, Hyunsoo M, Orianna B, Jae KJ, Ho IP, Kenneth HN, Byung HK (2006). Electrochemically Active Bacteria (EAB) and Mediator-Less Microbial Fuel Cells. *Journal of Microbiology and Biotechnology*.16(2):163-177.

Characklis WG, Marshall KC (1990) “Biofilms” John Wiley & Sons Inc. Toronto.

Chauduri SK, Lovely DR (2003) Electricity generation by direct oxidation of glucose in mediatorless microbial fuel cells. *Nature Biotechnology*. 21(10):1229-1232.

Cheng S, Liu H, Logan B (2006) Power densities using different cathode catalyst (Pt and CoTMPP) and polymer binders (Nafion and PTFE) in single chamber microbial fuel cells. *Environ. Sci. Technol*. 40(1): 364-369.

Cheng S, Liu H, Logan Bruce (2006) Increased performance of single-chamber microbial fuel cells using an improved cathode structure. *Electrochem. Commun*. 8: 489-494.

Cheng S, Logan BE (2007) Ammonia tratment of carbon cloth anodes to enhance power generation of microbial fuel cells. *Electrochem. Commun*. 9:492-496.

Choi MJ, Chae KJ, Ajayi FF, Park WS, Kim IS (2007) Electricity generation from acetate, propionate, butyrate and glucose using two-chambered microbial fuel cells. 11th IWA World Congress on Anaerobic Digestion. 23-27 September. Brisbane, Australia.

Choi Y, Jung E, Park H, Paik S, Jung S, Kim S (2004) Construction of microbial fuel cells using thermophilic microorganism, *Bacillus licheniformis and Bacillus thermoglucosidasius. Bull. Korean Chem. Soc*. 25(6):813 - 818.

Cooney MJ, Roschi E, Marison IW, Comninellis Ch, Stockar U (1996) Physiological studies with the sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio desulfuricans*: evaluation for use in a biofuel cell. *Enzyme and Microbial Technology*. 18:358-365.

# D E F

Delaney GM, Benetto HP, Mason JR, Roller SD, Stirling JL, Thurston CF (1984) Electron-transfer coupling in microbial fuel cells – 2. Performance of fuel cells containing selected microorganisms-mediator-substrate-combinations. J. Chem. Technol. Biotechnol. 34:13.

Erable B, Etcheverry L, Bergel A (2009) Increased power from a two-chamber microbial fuel cell with a low-pH air-cathode compartment. *Electrochem. Commun*. 11: 619-622.

Freguia S. Rabaey K. Yuan Z. Keller J. (2007) Electron and carbon balances in microbial fuel cells reveal temporary bacterial storage behaviour during electricity generation. *Environ. Sci. Technol*. 41(8):2915-2921.

# G

Gil G, Chang I, Kim B, Kim M, Jang J, Park H, Kim H (2003) Operational parameters affecting the performance of a mediator-less microbial fuel cell. *Biosens. Bioelectron*. 18:327-334.

Gil G, Chang I, Kim B, Kim M, Jang J, Park H, Kim H (2003) Operational parameters affecting the performance of a mediator-less microbial fuel cell. *Biosens. Bioelectron.* 18:327-334.

Gorby Y, et al. (2006) Electrically conductive bacterial nanowires produced by *Shewanella oneidensis* strain MR-1 and other microorganisms. PNAS. 103(30):11358-11363.

Greenman J, Galvez A, Guisti L, Ieropoulos I (2009) Electricity from landfill leachate using microbial fuel cells: Comparison with a biological aerated filter. *Enzyme Microb. Technol.* 44:112-119.

Grzebyk M, Pozniak G (2005) Microbial fuel cells (MFCs) with interpolymer cation exchange membranes. *Separation purification technology*. 41:321-328.

# H

Heilmann J, Logan B (2006) Production of electricity from proteins using a microbial fuel cell. *Water Environ. Res*. 78(5):531-537.

Holmes DE, Bond DR, Lovely DR (2004) Electron transfer by *Desulfobulbus propionicus* to Fe (III) and graphite electrodes. *Appl. Environ. Microbiol*. 70(2):1234-1234.

Hoogers G (2003) “Fuel Cell Technology Handbook”. CRC Press. Boca Raton.

# J

Jong BC, Kim BH, Chang IS, Ying L, Pauline W, Choo YF, Kang GS (2006) Enrichment, performance, and microbial diversity of a thermophilic mediatorless microbial fuel cell. *Environ. Sci. Technol*. 40:6449 - 6454.

# K

Kim HJ, Park HS, Hyun MS, Chang IS, Kim M, Kim BH (2002) A mediator-less microbial fuel cell using a metal reducing bacterium *Shewanella putrefaciens*. *Enzyme and Microbial Technology*. 30:145-152.

Kim JR, Jung SH, Regan B, Logan B (2007) Electricity generation and microbial community analysis of alcohol powered microbial fuel cells. Bioresource Technology. 98:2568-2577.

Kim JR, Min B, Logan BE (2005) Evaluation of procedures to acclimate a microbial fuel cell for electricity production. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 68:23-30.

Kim N, Choi Y, Jung S, Kim S (2000) Effect of initial carbon sources on the performance of microbial fuel cells containing *Proteus vulgaris. Biotechnol. Bioeng*. 70(1):109-114.

Korneel R, Geert L, Steven S, Willy V (2003) A microbial fuel cell capable of converting glucose to electricity at high rate and efficiency. *Biotechnol. Lett*. 25:1531-1535.

# L

Lai ME (2000) Catalyse enzymatique de la réduction électrochimique de l'oxygène: application à la corrosion des aciers inoxydables en milieu marin. Thèse doctorial. Université Paul Sabatier. Toulouse III. Toulouse, France. 315pp.

Larminie J, Dicks A (2003) "Fuel Cell Systems Explained" 2nd ed. Wiley Inc. England. 406p.

Lee J, Phung N, Chang I, Kim B, Sung H (2003) Use of acetate for enrichment of electrochemically active microorganisms and their 16S rDNA analyses. *FEMS Microbiology Letters*. 223:185-191.

Lefebvre O, Al-Mamun A, Ng HG (2007) A compact and cost-effective microbial fuel cell for treatment of domestic and acetate wastewater. 11th IWA World Congress on Anaerobic Digestion. 23-27 September. Brisbane, Australia.

Li Z, Zhang X, Lei L (2008) Electricity production during the treatment of real electroplating wastewater containing Cr+6 using microbial fuel cell. *Process Biochemistry*. 43:1352-1358.

Liu H, Logan BE (2004) Electricity generation using an air-cathode single chamber microbial fuel cell in the presence and absence of a proton exchange membrane. *Environ. Sci. Technol*. 38(14):4040-4046.

Liu H, Ramnarayanan R, Logan BE (2004) Production of electricity during wastewater treatment using a single chamber microbial fuel cell. *Environ. Sci. Technol*. 38(7):2281-2285.

Liu H. Cheng S. Logan BE (2005) Production of electricity from acetate or butyrate using a single-chamber microbial fuel cell. *Environ. Sci. Technol*. 39(2): 658-662.

Liu JL, Lowy DA, Baumann RG, Tender LM (2007) Influence of anode pretreatment on its microbial colonization. *Journal of Applied Microbiology*. 102:177-183.

Logan B (2005) Simultaneous wastewater treatment and biological electricity generation. *Water Science & Technology*. 52(1-2):31-37.

Logan B, Hemelers B, Rozendal R, Schröder U, Keller J, Freguia S, Aelterman P, Verstraete W, Rabaey K (2006) Microbial fuel cells: Methodology and technology. *Environ. Sci. Technol*. 40:5181-5192.

Logan B, Regan J (2006) Electricity-producing bacterial communities in microbial fuel cells. *Trends in Microbiology*. 14(12):512-518.

Lovley DR (2008) The microbe electric: conversion of organic matter to electricity. *Current OpinionBiotechnol*. 19:564-571.

# M

Mathis BJ, Marshall CW, Milliken CE, Makkar RS, Creager SE, May HD (2008) Electricity generation by thermophilic microorganisms from marine sediment. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 78:147-155.

Melhuish C, Ieropoulos I, Greenman J, Horsfield I (2006) Energetically autonomous robots: Food for thought. *Auton Robot*. 21(3):187-198.

Min B, Cheng S, Logan BE (2005) Electricity generation using membrane and salt bridge microbial fuel cells. *Water Research.* 39:1675-1686.

Min B, Logan BE (2004) Continuous electricity generation from domestic wastewater and organic substrates in a flat plate microbial fuel cell. *Environ. Sci. Technol*. 38(21):5809-5814.

Min B, Roman O, Angelidaki I (2007) Effect of temperature and anodic medium on power generation in microbial fuel cells (MFCs). 11th IWA World Congress on Anaerobic Digestion. Brisbane, Australia.

# N

Niessen J, Harnisch F, Rosenabaum M, Schröder U, Scholz F (2006) Heat treated soil as convenient and versatile source of bacterial communities for microbial electricity generation. Electrochem. Commun. 8:869-873.

Niessen J, Schröder U, Harnisch F, Scholz F (2005) Gaining electricity from in situ oxidation of hydrogen produced by fermentative cellulose degradation. *Letters in Applied Microbiology*. 41:286-290.

Niessen J, Schröder U, Rosenbaum M, Scholz F (2004) Fluorinated polyanilines as superior materials for electrocatalytic anodes in bacterial fuel cells. *Electrochem. Commun*. 6:571-575.

# O

Oh SE, Logan B (2005) Hydrogen and electricity production from a food processing wastewater using fermentation and microbial fuel cell technologies. *Water Res*. 39:4673-4682.

Oh SE, Logan B (2006) Proton exchange membrane and electrode surface areas as factors that affect power generation in microbial fuel cell. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 70:162-169.

# P

Park DH, Laivenieks M, Guettler MV, Jain MK, Zeikus JG (1999) Microbial utilization of electrically reduced neutral red as the sole electron donor for growth and metabolite production. *Appl. Environ. Microbiol*. 65(7):2919-2917.

Park DH, Zeikus JG (2002) Impact of electrode composition on electricity generation in a single-compartment fuel cell using *Shewanella putrefaciens*. *Appl. Environ. Microbiol*. 59:58-61.

Parot S (2007) Biofilms électroactifs : Formation, caractérisation et mécanismes. Thèse doctoral. Institut National Polytechnique de Toulouse. Toulouse, Fra. 247p.
Parot S, Delia ML, Bergel A (2008a) Forming electrochemically active biofilms from garden compost under chronoamperometry. *Bioresour. Technol*. 99:4809-4816.

Parot S, Delia ML, Bergel A (2008b) Acetate to enhance electrochemical activity of biofilms from garden compost. *Electrochim. Acta.* 53:2737-2742.

Pelmont J (1993) Bactéries et Environnement. Adaptations physiologiques. Presses Collection Grenoble Sciences. Universitaires de Grenoble.

Pham TH, Rabaey K, Aelterman P, Clauwaert P, De Schamphelaire, Boon N, Verstrete W(2006) Microbial fuel cells in relation to conventional anaerobic digestion technology. *Eng. Life Sci*. 6(3):285-292.

Price BP, Sowers T (2004) Temperature dependence of metabolic rates for microbial growth, maintenance, and survival. *PNAS*. 101(13):4631-4636.

# R

Rabaey K, Boon N, Siciliano SD, Verhaege M, Verstraete W (2004) Biofuel cells select for microbial consortia that self-mediate electron transfer. *Appl. Environ. Microbiol*. 70(9):5373-5382.

Rabaey K, Clauwaert P, Aelterman P, Verstraete W (2005) Tubular microbial fuel cells for efficient electricity generation. *Environ. Sci. Technol*. 39(20):8077-8082.

Rabaey K, Rodriguez J, Blackall LL, Keller J, Gross P, Batstone D, Verstraete W, Nealson KH (2007) Microbial ecology meets electrochemistry: electricity-driven and driving communities. *The ISME Journal*. 1: 9-18.

Rabaey K, Van de Somperl K, Magnien L, Boon N, Aelterman P, Caluwaert P, De Schamphelaire L, Pham H, Vermeulen J, Verhaege M, Lens P, Verstraete W (2006) Microbial fuel cells for sulfide removal. *Environ. Sci. Technol*. 40(17):5218-5224.

Rabaey K, Verstraete W (2005) Microbial fuel cells: novel biotechnology for energy generation. *Trends. Biotechnol*. 23(6):291-298.

Reimers CE, Tender LM, Fertig S, Wang Wei (2001) Harvesting energy from the marine sediment-water interface. *Environ. Sci. Technol*. 35(1) :192-195.

Ren Z, Steinberg LM, Regan JM (2008) Electricity production and microbial biofilm characterization in cellulose-fed microbial fuel cells. *Water Science & Technology*. 58(3):617-622.

Rezaei F, Richard TL, Brennan RA, Logan BE (2007) Substrate-Enhanced microbial fuel cells for improved remote power generation from sediment-based systems. *Environ. Sci. Technol*. 41:4053-4058.

Ringeisen BR, Ray R, Little B (2007) A miniature microbial fuel cell operating with an anaerobic chamber. *Journal of power sources*.165:591-597.

Rismani-Yazid H, Christy AD, Dehority BA, Morrison M, Yu Z, Tuovinen OH (2007) Electricity generation from cellulose by rumen microorganisms in microbial fuel cells. *Biotechnol. Bioeng*. 97(6):1398-1407.

Rismani-Yazid H, Christy AD, Dehority BA, Morrison M, Yu Z, Tuovinen OH (2007) Electricity generation from cellulose by rumen microorganisms in microbial fuel cells. *Biotechnol. Bioeng*. 97(6):1398-1407.

Rohads A, Beyenal H, Lewandowsky Z (2005) Microbial fuel cell using anaerobic respiration as an anodic reaction and biomineralized manganese as a cathodic reactant. *Environ. Sci. Technol*. 39(12):4666-4671.

Rosenbaum M, Zhao F, Quaas M, Wulff H, Schroder U, Scholz F (2007) Evaluation of catalytic properties of tungsten carbide for the anode of microbial fuel cells. *Applied Catalysis*. 74:262-270.

Rozendal R, Hamelers H, Buisman C (2006) Effects of membrane cation transport on pH and microbial fuel cell performance. *Environ. Sci. Technol*. 40(17):5206-5211.

# S

Sapan CV, Lundblad RL, Price NC (1999) Colorimetric protein assay techniques. *Biotechnol. Appl. Biochem*. 29:99-108.

Saval S, Noyola A (1992) Aportaciones de la Biotecnologia al Tratamiento Anaerobio de Aguas Residuales. *Revista de la SMBB, A.C.* 2(5/6):155-172.

Schröder U (2007) Anodic electron transfer mechanisms in microbial fuel cells and their energy efficiency. *Phys. Chem. Chem. Phys*. 9:2619-1629.

Schröder U, Niessen J, Scholz F (2003) A generation of microbial fuel cells with current outputs boosted by more than one order of magnitude. *Angew. Chem*. 115:2986-2989.

Scott K, Murano C (2007) Microbial fuel cells utilising carbohydrates. *J. Chem. Technol. Biotechnol*. 82:92-100.

Scott K, Murano C, Rimbu GA (2007) A tubular microbial fuel cell. *J. Appl. Electrochem*. 37:1063-1068.

Sell D (1990) Bioelectrochemical fuel cells. Dans: “Biotechnology”. Rehm HJ, Reed G, Püler A, Stadler P eds. 2ème ed. Wiley – VCH. NY.

Srikanth S, Marsili E, Flickinger MC, Bond DR (2008) Electrochemical characterization of *Geobacter sulfurreducens* cells immobilized on graphite paper electrodes. *Biotechnol. Bioeng.* 99(5):1065-1073.

# T

Tanaka K, Vega C, Tamamushi R (1983) 612 bis-Thionine and ferric chelate compounds as coupled mediators in microbial fuel cells. *J. Electroanal. Chem*. Section Bioelectrochemistry and Bioenergetics. 156(11):289-297.

Thygesen A, Poulsen F, Min B, Angelidaki I, Thomsen AB (2008) The effect of different substrates and humic acid on power generation in microbial fuel cell operation. *Bioresour. Technol*. 100:1186-1191.

Torres IC, Marcus AK, Rittmann BE (2007) Kinetics of consumption of fermentation products by anode-respiring bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. doi: 10.1007./s00253-007-1198-z .

Torres IC, Marcus AK, Rittmann BE (2008) Proton transport inside the biofilm limits electrical current generation by anode-respiring bacteria. *Biotechnol. Bioeng*. doi: 10.1002/Bit.21821.

# W

Wang X, Feng YJ, Lee H (2007) Electricity production from beer brewery wastewater using single chamber microbial fuel cell. 11th IWA World Congress on Anaerobic Digestion. 23-27 September. Brisbane, Australie.

Wingard LB, Shaw ChH, Castner JF (1982) Bioelectrochemical fuel cells. *Enzyme and Microbial Technology*. 4:137-146.

# Z

Zuo Y, Maness P, Logan B (2006) Electricity production from steam-exploded corn stover biomass. *Energy Fuels*. 20:1716-1721.

**Résumé**

Les piles à combustible microbiennes (PACM) permettent la production directe d'électricité par l'oxydation de matière organique ; à l'anode les combustibles organiques sont oxydés grâce à des microorganismes adhérés qui jouent le rôle d'électro-catalyseurs. Utiliser comme combustible la matière organique issue d'effluents ou de déchets des industries agro-alimentaires présente un double bénéfice : la réduction de l'impact environnemental et la génération d'énergie. Le travail réalisé dans le cadre de la thèse comporte trois volets : tout d'abord l'évaluation des combustibles et des sources d'inoculum en termes de capacités électro-catalytiques, ensuite la recherche de conditions opératoires favorisant la génération de courant simultanément à la biodépollution. Ces deux objectifs ont été abordés en conditions électrochimiques bien contrôlées (montages à trois électrodes, contrôle potentiostatique). Le troisième volet a porté sur la validation de ces conditions en configuration de PACM.
Trois résidus issus d'industries agro-alimentaires ont été testés comme combustible : des jus de pomme fermentés, des lies du vin et des déchets de laiterie, et deux environnements comme source de micro-organismes électro-actifs : des boues anaérobies et des lixiviats de terreau de jardin. Les études en cellule électrochimique ont révélé les lixiviats de terreau comme la meilleure source de biocatalyseur et les résidus de laiterie comme le meilleur combustible. En conséquence l'amélioration du procédé a été effectuée principalement sur le couple lixiviats de terreau – résidus laitiers.
Une acclimatation préliminaire de la microflore des lixiviats de terreau aux déchets de laiterie s'est révélée inutile. Des concentrations élevées des déchets de laiterie ont eu un effet négatif sur la génération de courant, bien qu'une réduction de 90% en demande chimique en oxygène (DCO) ait été atteinte. Le prétraitement de la surface de l'anode par l'adsorption du substrat a permis une augmentation du courant d'un facteur 10 par rapport à une anode non prétraitée. Les tests de températures comprises entre 10°C et 60°C suggèrent l'existence d'une large diversité de microorganismes électro-actifs. Une densité de courant de 1655 mA/m² a été atteinte à 40°C à un potentiel imposé de +0,1V/ECS sur une anode en feutre de graphite prétraitée.
Différentes combinaisons « source de biocatalyseur – combustible » ont été évaluées en utilisant une PACM composée de deux compartiments séparés par une membrane échangeuse de protons et équipée d'une anode en feutre de graphite. Les meilleures performances ont été obtenues avec le lixiviat de terreau comme source de micro-organismes électro-actifs et les déchets laitiers comme combustible (92 $mW/m^2$, 636 $mA/m^2$). Ces résultats confirment les résultats obtenus en cellule électrochimique et se situent parmi les meilleurs dans le cadre du développement émergent des PACM pour l'exploitation de déchets bruts.

ଔଔଔଔଔ

**Abstract**

In the microbial fuel cells (MFC) electricity is produced by the oxidation of organic matter. At the anode the fuel is oxidized by the microorganisms attached to it, they act as catalyst. The use of food and agricultural industry wastes carry out to a double benefit: waste treatment and energy generation. In the present work three aspects are presented: Initially fuels and inoculum sources are evaluated in terms of their electro catalytic activity, thereafter operational parameters are studied to enhance electricity production and waste treatment. These studies are achieved in three electrodes electrochemical cells under potentiostatic control. In the last part, the materials and operational conditions selected are tested in MFC.
Three wastes were tested as fuel to MFC: fermented apple juice, wine lees and dairy wastes, with two electroactive inocula: anaerobic sludge and garden compost leachate. The results in electrochemical cells indicated compost leachate and dairy wastes as the best inoculum and fuel respectively. Consequently, most of subsequent experiments were achieved with these materials.
Preliminary acclimation procedure of compost leachate microbial flora to dairy wastes fuel proved not to be useful. High concentration of dairy wastes was detrimental to current generation; however the COD removal was 90%. Pre-treatment of electrode by pre-adsorbing dairy waste led to a 10-fold increase in the current density. Results from temperature test (10°C to 60°C) suggest a large diversity of electrochemically active microorganisms coming from compost. A current density of 1655 mA/m² was reached at 40°C with a pre-treated graphite felt anode under polarization at +0,1V vs. ECS.
Different mixtures composed by "biocatalyst-combustible" were evaluated in a two chamber membrane microbial fuel cell, with graphite felt anode. The best performance was obtained with compost leachate as biocatalyst and dairy wastes as fuel (92 mW/m² at 636 mA/m² by polarization curve). These results confirmed those obtained in electrochemical cells and they are in the high range of performances reached with this new technology using raw materials.