

UNIVERSITE KASDI MERBAH OUARGLA

Faculté des sciences de la nature et de la vie



Département des sciences biologiques

Mémoire

MASTER ACADEMIQUE

Domaine : Sciences de la nature et de la vie

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Microbiologie Appliqué

Présenté par : -BOUZAFFA Haoua

-DJAA Amina

Thème

**Recherche des bactéries électroactives autochtones et
réalisation d'une pile à combustible microbienne**

Soutenu publiquement

Le : 23/06/2024

Devant le jury :

Mme.BELDI Nadia	MCB	Président	UKM Ouargla
Mme. BOUDERHEM Amel	MCB	Encadreur	UKM Ouargla
Mme. NOUASRIA Zohra	MCA	Examineur	UKM Ouargla
Mr.BOULESBAA Mohammed	professeur	Invité	UKM Ouargla

Année Universitaire : 2023/2024



Dédicace

Grâce et à l'aide de mon Dieu le tout puissant, ce mémoire a été achevé, résultat de plusieurs années de travail et d'efforts acharnés.

Je dédie d'abord ce succès aux personnes les plus chères à mon cœur : ma mère, mon père, mes frères Adem et Youcef, mes sœurs Isra et Djoumana et tout ma famille, j'espère qu'ils seront toujours en bonne santé

Sans oublier mes amies très proches Amina et Aqila, et tous mes professeurs qui m'ont enseigné de l'école primaire à l'université.

Bouzaffa Haoua



Dédicace

Tout d'abord, avec l'aide et production
D'ALLAH, j'ai atteint là où je suis et j'ai
Pu atteindre mon objectif

Je dédie ce travail à :

A mes très **chères parents** qui ne
M'ont pas épargné prières et soutien tout
Au long mon parcours académique
aucun langage ne saurait exprimer mon sentiment
Chacun en son nom, symbole de tendresse et de fidélité et
Pour m'avoir remonté le moral et être resté à mes côtés.

à ma tante et son mari, qui m'ont été d'une grande aide.

A mon fiancé qui n'ont pas cessé de
Me conseiller, encourager et pour l'amour
Qu'ils m'ont toujours donné

sans oublier mes amies et mes collègues surtout Aqila et mon binôme
Haoua qui j'ai passé l'une des meilleures années durant mon cursus
Universitaire, et pour sa patience et sa compréhension tout au long de
Ce mémoire. et le professeur superviseur qui a parfaitement fait son
Travail.

Djaâ Amina

Remerciements

En tout premier lieu, nous remercions DIEU, le tout Puissant, qui nous a éclairé le bon chemin et nous a aidées à réaliser ce travail dans les meilleures conditions.

Nous tenons à remercier nos encadrant Dr. Mme BOUDERHEM Amel pour nous avoir donné pour leur grand soutien scientifique et moral, et pour les encouragements qu'elle nous a apportés

Nous voudrions également remercier les membres du jury qui nous ont fait L'honneur d'évaluer notre travail : Mme BELDIN et Mme NOUASRIA.Z

Nous voudrions aussi exprimer notre vive reconnaissance envers Mr. BOULESBAA Mouhammed Professeur en électronique et Mr. HENNI Abdellah et tous les enseignants du département de Microbiologie ainsi que tous ceux qui ont participé à notre formation.

Finalement, à tous ceux et celles qui, de près ou de loin, ont contribué à la réussite de ce travail, nous disons Merci.

Tables de matière

Remerciements	I
Tables de matière	II
Liste des figures	III
Liste des photos	IV
Liste des tableaux	V
Liste des abréviations	VI
Synthèse bibliographique	
Partie I : chapitre 1 : la pile à combustible chimique	
I.1. Définition de pile à combustible :	4
I .1.1.Composants des piles à combustible :	4
I. 1.1.1.Zone de triple contact :	4
I.1.1.2.Ensemble électrode/catalyseur :	5
I.1.1.3.Électrolyte :	6
I. 1.1.4.Couche de diffusion des gaz :	6
I.1.1.5.Système réel :	6
I. 1.2.Fonctionnement générale despile à combustible :	7
I.1.3.Types de à combustible	8
Partie I	
chapitre 2 : La pile à combustible microbiennes	
I.2.1. Types et définition de pile à combustible microbiennes	
I .2.1.1.Les biopiles enzymatiques	10
I.2.1.2.Les piles microbiennes	10
I.2.2.La structure d'une pile microbienne	10
I.2.3.Composants d'une pile à combustible microbienne	11
I .2.3.1.Les électrodes	11
I.2.3.1.1.Anode :	11
I. 2.3.1.2.Cathode :	12

I.2.3.2.Résistance externe :	12
I.2.3.3. La membrane échangeuse d'ions :	12
I.2.3.3.1.Les membranes échangeuses de cations MECs :	12
I.2.3.3.2 Les membranes échangeuses d'anions MEAs :	13
I.2.4.Les microorganismes électroactifs :	13
I.2.5.Les biofilms électroactifs :	14
I.2.6.Respiration des microorganismes électroactifs :	14
I.2.7.Source des microorganismes pour la formation du biofilms :	15
I.2.7.1. Culture complexe :	16
I.2.7.2.Souche pure :	16
I.2.8.Principe de fonctionnement d'une pile à combustible microbiennes :	17
I.2.9.La classification de pile microbienne :	18
I.2.9.1.Transfert indirect :	19
I.2.9.2.Le transfert direct :	20
I.10.Substrats utilisés pour les MFC	21
I.10.1.Acétate :	22
I.10.2.Glucose :	22
I.2.11. Applications des piles à combustibles microbiennes .:	23
I.2.11.1.Traitement des eaux usées	24
I.2.11.2. Dessalement des eaux de mer	24
I.2.11.3.Production d'énergie :	25
I.2.11.4.Production d'hydrogène :	25
I.2.11.5.Bioremediation	
<i>Partie II</i>	
<i>Chapitre 1 : méthodologie</i>	
II.1.Echantillonnage	28
II.2.Analyses physico-chimiques	28
II.2.1.Mesure de conductivité :	28

II.2.2.Mesure de pH :	28
II.3.Réalisation des réacteurs biopiles :	29
II.4.Analyses Microbiologique :	30
II.4.1.Isolement des bactéries aérobies et réalisation des réacteurs biopiles :	30
II.4.2.Isolement des bactéries anaérobies et réalisation des réacteursbiopile :	32
II.5.Isolement des bactéries électroactives :	34
II.6.Sélections des souches	34
II.7.Pré identification de souche sélectionnée	35
II.7.1.Caractérisation morphologique	35
II.7.1.1.Caractérisation macroscopique	35
II.7.1.2.Caractérisation microscopique :	35
II.7.2.Caractérisation biochimique	35
II.7.2.1.Recherche de la catalase :	35
II.7.2.2.Recherche de l'oxydase	36
II.7.2.3.Galeries API20E	36
II .8.Conservation des souches :	36
II .9.Optimisation de biopile	36
Partie II	
Chapitre 2 : résultats et discussions	
III. 1.Caractérisation des échantillons	37
III.2.Réalisation des réacteurs biopiles :	37
III.3.Analyses Microbiologique :	38
III.3.1.Isolement des bactéries aérobies et réalisation des réacteurs biopile :	38
III.3.2.Isolement des bactéries anaérobies et réalisation des réacteurs biopile	40
III.3.3.Isolement et purification des bactéries électroactives :	41
III.4.Sélections des souches :	42
III.5.pré identification de souche :	43
III.5.1.L'aspect macroscopique :.	43

III.5.2.L'aspect microscopique :.	43
III.5.3.Caractérisation biochimique	43
III.6.Evaluation de l'effet de surface des électrodes et la biomasse sur le potentiel de pile :	44
Conclusion general et perspectives :	45
Les références bibliographiques :	47
Les annexes :	53

Listes des figures

Figure 1 : Zone de triple contact	4
Figure 2 : conductivité typique d'une membrane en Nafion en fonction de taux d'humidité	6
Figure3 : système réel	7
Figure 4 : Schéma expliquant le principe de la pile à combustible à hydrogène	8
Figure 5 : Schémas de piles à combustible A et B	11
Figure 6 : principe de fonctionnement d'une pile microbienne	18
Figure 7 : Représentation schématique du mécanisme de transfert d'électrons indirect entre une bactérie et une électrode via des médiateurs exogènes et endogènes	20
Figure 8 : représentation des mécanismes de transfert d'électrons directe via les cytochromes chez <i>Geobacter sulfurreducens</i> vers l'anode	21
Figure 9 : Cellule microbienne de dessalement à trois compartiments	24
Figure 10 : biopiles réalisées par les bactéries aérobies	31
Figure 11 : biopiles réalisées par les bactéries anaérobies	33
Figure 12 : Evolution de la biomasse bactérienne en fonction de temps dans les différents biopiles	44
Figure 13 : Evolution de voltage en fonction de temps dans les différents biopiles	45

Liste des photos

Photo 1: SB: SEBKHA DE AIN BEIDA SA : sol (Université)	28
Photo 2: Pile totalement microbienne de SB et pile semi microbienne de SB	30
Photo 3 : Pile totalement microbienne de SA et Pile semi microbienne de SA	30
Photo 4 : biopiles des six souches isolée	34
Photo 5 : six souches électroactives	41

Liste des tableaux

Tableau 1 : PH et conductivité électrique des échantillons étudiés à 30°C.	37
Tableau 2 : voltage des biopiles aérobies	38
Tableau 3 : mesure le voltage des deux biopiles anaérobies	40
Tableau 4 : Evolution du voltage des six souches	42
Tableau 5 : Résultats des tests biochimiques	43

Liste des Abréviations

PAC : piles à combustible

PCM : piles à Combustible Microbiennes

MECs : membranes échangeuses des cations

MEAs : membranes échangeuses d'anions

EA : Electro actif

MFC : Microbial fuel cells

V : volt

EAB : Les bactéries électroactives

BN : bouillon nutritif

PH : potentiel d'hydrogène

PTFE : polytétrafluoroéthylène

Introduction

Introduction

Les combustibles fossiles qui se composent de charbon, de gaz naturel et de pétrole ont été découverts il y a des décennies à partir de plants morts et d'animaux qui avaient été comprimés et chauffés sur des millions d'années par des couches de morts de sédiments et de roches (Ortiz-Martinez et al, 2015 ;Sharma et al, 2010 ;Obileke et al, 2021),ces combustibles fossiles peuvent produire une puissance à haute efficacité pour soutenir le moteur des véhicules, des appareils électroniques et la vie quotidienne des individus (Hardman et al, 2016 ;Santoro et al, 2017 ;Obileke et al,2021). cependant, leur nature finie, ce qui en fait des sources d'énergie non durables. ainsi, il existe un besoin de combustibles renouvelables et durables pour remplacer les combustibles fossiles et développer une civilisation industrielle moderne (Pandey et al ,2016 ; Sonawane et al ,2017 ; Obileke et al, 20212015 ; Deval et al, 2013 ; Obileke et al, 2021).

En 1911 Michael Cresse qui est un professeur en botanique découvert que des microorganismes tels que les levures ou *Escherichia coli* peuvent produire un courant électrique. Vingt ans plus tard l'observation a été confirmée grâce à Cohen qui a développé des batteries à combustible microbiennes et a pu obtenir des tensions jusqu'à 35V. parmi les sources d'énergie renouvelables aux quelles les scientifiques se sont intéressés récemment, la génération d'électricité par des microorganismes due à l'oxydation de toutes sortes de matières organiques par des biofilms électroactive. cette nouvelle technologie a pour objectif le développement de réacteurs biologiques générant de l'électricité. ces réacteurs sont souvent appelés « Piles à Combustible Microbiennes » (PCM) (Halimi et al ,2018).

La pile à combustible microbienne représente une approche écologique pour produire de l'électricité tout en purifiant simultanément les eaux usées, permettant l'élimination de la demande chimique en oxygène et les densités d'énergie électrique (Obileke et al,2021;Benghernit et al, 2022)

Introduction

Les microorganismes électro actifs affectent de manière marquée de nombreux environnements dans lesquels ils établissent des contacts électriques à la surface externe avec d'autres cellules et minéraux ou réduisent les molécules extracellulaires solubles à activité redox telles que les flavines et les substances humiques. un nombre croissant de recherches soulignent leur grande diversité phylogénétique et montre que ces microorganismes jouent un rôle clé dans plusieurs cycles biogéochimiques, ainsi que dans le microbiom intestinal, les digesteurs anaérobies de déchets et la corrosion des métaux (Lovley et Holmes, 2022).

Ce travail a pour but de rechercher des bactéries electroactive autochtones et d'élaborer d'une biopile bactérienne. la réalisation de ce modeste mémoire est structurée en deux parties : la premier partie présente une synthèse bibliographique, la second décrit la méthodologie puis résultats et discussion qui sera suivi d'une conclusion

Synthèse bibliographique

L'enjeu principal de notre époque est de trouver des sources d'énergies renouvelables qui Répondent aux besoins de la société : l'abondance, la facilité et la rapidité d'utilisation, le coût de production qui se doit d'être peu élevé, aujourd'hui, les piles à combustible suscitent l'engouement des chercheurs car elles présentent de nombreux avantages : produire une quantité non négligeable d'électricité, d'eau et de la chaleur, les réactifs de la pile sont le dioxygène présent naturellement dans l'atmosphère et le dihydrogène qui lui par contre à besoin d'être produit. sa production est donc un enjeu majeur pour la mise en place de la pile à combustible(Timoté et al, 2018). l'histoire des piles à combustible est ponctuée par une succession de périodes de recherches intenses et d'abandon relatif.

en 1802, Sir Henry David énonce le principe de l'électrolyse inverse et met en évidence la possibilité de produire de l'électricité et de la chaleur à partir de la réaction chimique entre le dioxygène et le dihydrogène. le principe de la pile à combustible est publié par un chercheur suisse, Christian-Friedrich Schönbein, dans le philosophical magazine en janvier1839. peu de temps après, l'anglais Sir William-Robert Grove réalise la première pile à combustible produisant de l'électricité, de la chaleur et de l'eau en utilisant des électrodes de platine poreux et de l'acide sulfurique comme électrolyte

Un premier développement se produit au début des années1960, mais il est suivi d'une période de ralentissement de la recherche depuis les années1970, les problèmes liés à la consommation mondiale d'énergie sont de plus en plus aigus. les sources d'énergie fossile s'épuisent alors que la demande augmente de nombreuses recherches sont entreprises pour mieux exploiter les énergies renouvelables et pour mieux maîtriser la consommation. la pile à combustible bénéficie d'un regain d'intérêt, un regain pour cette technique est apparu au début des années1990 et se poursuit aujourd'hui les premières applications ont concerné les domaines militaire et spatial. la pile à combustible a été adoptée par l'armée américaine pour équiper des sous-marins, puis par la NASA pour des engins spatiaux dans les années1960 avec les programmes Gemini et Apollo (Mayé, 2010).

La pile à combustible (PAC) constitue un maillon essentiel de l'économie basée sur L'hydrogène. mais, en dépit des progrès réalisés depuis 10 ans, ce maillon est encore loin d'être stabilisé sur le plan technologique et souffre encore d'un coût de production trop élevé.(Mabrouk, 2012).

I.1.Définition de pile à combustible

La pile à combustible est un dispositif électrochimique qui a pour but de convertir l'énergie chimique d'une réaction directement en énergie électrique (Bedu et al ,2014) grâce à l'oxydation sur une électrode d'un combustible (par exemple l'hydrogène), couplée à la réduction sur une deuxième électrode d'un oxydant tel que l'oxygène de l'air (Mabrouk, 2012) les réactifs sont stockés dans des réservoirs extérieurs à la pile elle-même (Bedu et al ,2014)

I.1.1.Composants des PAC

La pile est composée d'un électrolyte, entouré de deux électrodes poreuses, une électrode est constituée de catalyseurs, de plaques de diffusion (ou plaques bipolaires) (Bedu et al, 2014)

I.1.1.1.Zone de triple contact

C'est dans cette zone (l'ensemble électrode/catalyseur et l'électrolyte) qu'a lieu la réaction : le transport du gaz, adsorption par les plaques bipolaires, dissocié, ionisé (perd un électron), protons H^+ passent dans l'électrolyte migrent vers la Cathode.

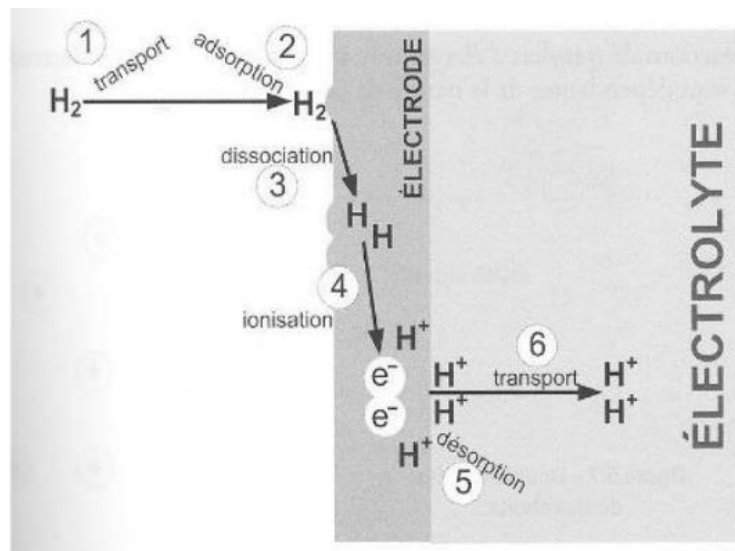


Figure 1 : Zone de triple contact (Bedu et al, 2014).

I.1.1.2. Ensemble électrode/catalyseur

Les électrodes sont formées de carbone platiné sous forme de fines Particules (2 à 3nm) un liant à base de (PTFE) hydrophobe pour éviter que le carbone poreux ne soit gorgé d'eau.

la présence d'un catalyseur n'est nécessaire que dans le cas des PAC à faible températures (PMFC par exemple, les catalyseurs utilisés sont le platine à la cathode et un mélange platine/ruthénium à l'anode sont incorporées dans le maillage de carbone).

Les PAC à haute température n'en nécessitent pas (Bedu et al, 2014) ;car la vitesse de réaction augmente beaucoup avec la température(Mayé, 2010)

Ces catalyseurs sont à base de métaux précieux (argent, platine, palladium) (Mabrouk, 2012)

-sont des métaux rares et donc extrêmement chers, des électrodes n'incorporent plus que 1mg de platine par cm².

-sensibilité à certains polluants comme le monoxyde de carbone (CO) cette molécule va se fixer plus facilement que le dihydrogène et va ainsi réduire la surface active, donc réduire l'efficacité de la pile-pour le fonctionnement optimal de la pile, l'ensemble électrode/catalyseur est pressé contre la membrane échangeuse de protons puis est recouverte par la couche de diffusion des gaz(Bedu et al, 2014).

De façon générale, l'électrolyte doit permettre le transport des ions tout en empêchant le passage des gaz et des électrons , la performance d'une membrane dépend essentiellement de sa conductivité ionique, son épaisseur et de son taux d'humidité , le taux d'humidité de la membrane doit donc être régulé(Bedu et al, 2014).

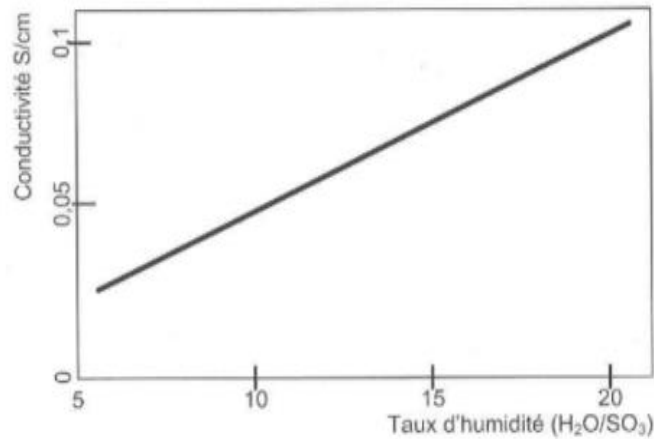


Figure 2 : conductivité typique d'une membrane en Nafion en fonction de taux d'humidité (Bedu et al, 2014)

I.1.1.3. Couche de diffusion des gaz

Elle permet le passage des gaz vers l'électrolyte et l'ensemble électrode/catalyseur généralement constituée de carbone et de PTFE hydrophobe assure une bonne élimination de l'eau produite par la réaction, elle doit enfin être conductrice (Bedu et al, 2014)

I.1.1.4. Système réel

Pour un système réel impose l'utilisation de plusieurs cellules. Ainsi pour augmenter la tension disponible et assemblées pour former un module appelé stack l'élément séparant chaque cellule est appelé plaque bipolaire car il relie le pôle positif d'une cellule au pôle négatif d'une autre Son objectif est de collecter le courant donc avoir une conductivité électrique élevée et fournir aux cellules les réactifs dont elles ont besoin d'un côté de la plaque, c'est le dihydrogène qui circule et de l'autre, c'est le dioxygène (Bedu et al, 2014)

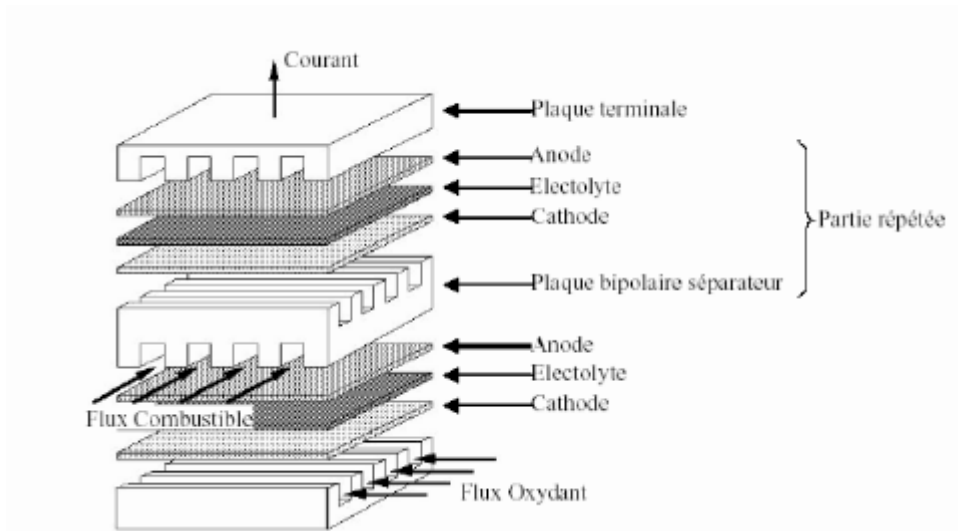


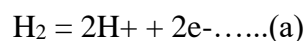
Figure 3 : système réel (Bedu et *al* ,2014)

I.1.2.Fonctionnement générale de PAC

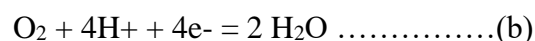
Les électrodes séparées par un électrolyte qui permet d'assurer une étanchéité entre les deux électrodes et d'assurer le passage des ions en bloquant le passage des électrons (Halimi et al ,2018) les électrodes poreuses permettent le passage des gaz qui constituent les réactifs(en général du dihydrogène et du dioxygène) les ions qui traversent l'électrolyte dépendent du type de pile à combustible (H^+ , HO^- , O^{2-} ... (Mayé, 2010).

Comme un exemple, le principe de fonctionnement d'une pile à combustible d'hydrogène est : la pile est alimentée par deux gaz : O_2 et H_2 qui vont permettre la réaction d'oxydoréduction selon les deux demi- réactions :

L'oxydation de l'hydrogène à l'anode :



La réduction de l'oxygène à la cathode :



On obtient alors comme réaction finale :



L'anode représente le lieu de l'oxydation de l'hydrogène issu d'un réservoir, cette réaction produisant deux protons et deux électrons (l'équation a) ces derniers vont circuler de l'anode vers la cathode via le circuit électrique avec une production d'électricité en parallèle les protons sont transférés de l'anode vers la cathode à travers la membrane échangeuses d'ions pour la réduction de l'oxygène avec la consommation des électrons pour former l'eau (l'équation b) (Halimi et al ,2018).

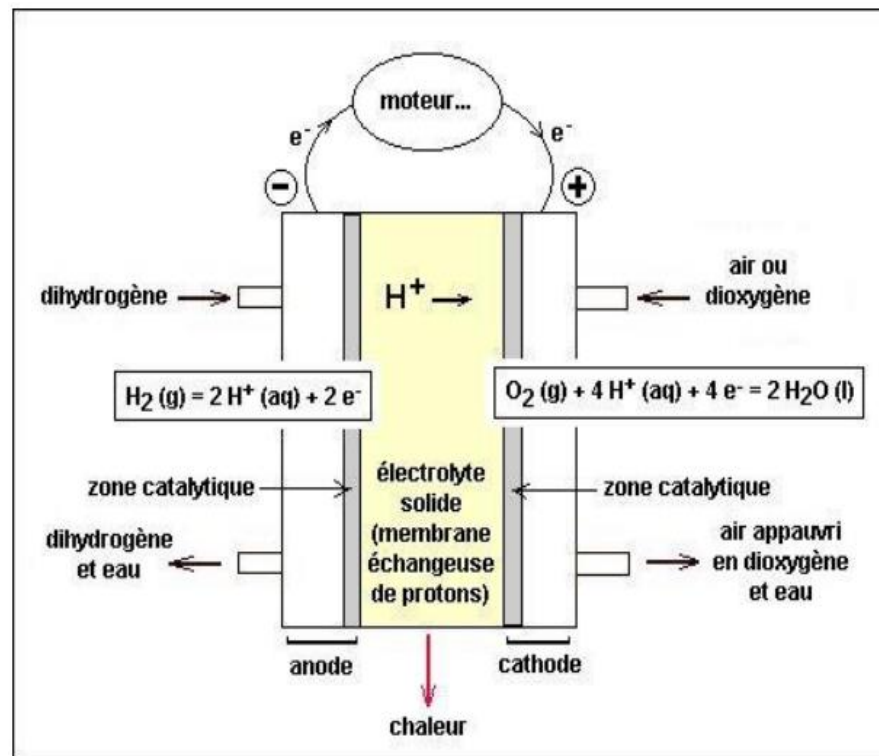


Figure 4 : Schéma expliquant le principe de la pile à combustible à hydrogène

(Bedu et al, 2014)

I.1.3.Types de piles à combustible

Les piles à combustible peuvent être classées selon plusieurs critères :

- l'état liquide ou solide de l'électrolyte
- le pH de l'électrolyte qui permet de distinguer les piles acides et les piles alcalines, pour lesquelles les ions mobiles sont respectivement des cations et des anions
- la température de fonctionnement

– la nature du combustible : Dihydrogène, NaBH₄ en solution, Méthanol, Acide formique (Acide méthanoïque)

(Mabrouk, 2012)(Fuel Cell Handbook (seventh edition), Department of Energy Office of Fossil Energy, (2004) 26507-0880.

- On distingue deux catégories de piles : les piles à hautes températures, fonctionnant à des températures supérieures à 600 °C et celles qui fonctionnent à des températures inférieures à 200 °C

AFC Pile à combustible alcaline : 65-90 °C

DBFC Pile à combustible à Hydrure de bore direct : 20 à 80 °C

PEMFC Pile à combustible à membrane échangeuse de protons : 60-100 °C

DMFC Pile à combustible à méthanol direct 90-120 °C

PAFC Pile à combustible à acide phosphorique 200 °C

MCFC Pile à combustible à carbonates fondus 650 °C

SOFC Pile à combustible à oxyde solide 800-1050 °C

FAFC Pile à combustible à acide formique 90-120 °C

(Mabrouk, 2012)(Fuel Cell Handbook (seventh edition), Department of Energy Office of Fossil Energy, (2004) 26507-0880.

I.2.1. Types et définition de pile à combustible microbiennes

PCM est un dispositif électrochimique qui permet de transformer directement en énergie électrique, l'énergie chimique contenue dans des composés organiques ou inorganiques par une réaction d'oxydation (généralement la réaction anodique)(Halimi et al ,2018)., le système utilise le pouvoir métabolique des bactéries pour la production d'électricité et l'application de micro-organismes comme biocatalyseurs disponibles et peu coûteux (Khajeh et al. 2020) (Benghernit et al, 2022) le plus souvent des bactéries (anode biologique) qualifiés d'exo-électrogènes. ces bactéries sont organisées en biofilm à la surface de l'anode qui représente un catalyseur électro actif (Adekunle, 2014 ; Benghernit, 2017 ; Dumas, 2007 ; Zhao et al. 2017). (Halimi et al ,2018). on distingue deux grands types de biopiles :

I.2.1.1 Biopiles enzymatiques

Elles emploient des enzymes pour catalyser les réactions, les piles à glucose en font par exemple partie néanmoins leur stabilité dépend grandement de l'immobilisation des enzymes à la surface des électrodes (Zhao et al. 2017).

I.2.1.2. Piles microbiennes

Elles utilisent des micro-organismes comme catalyseurs elles intéressent particulièrement la communauté scientifique grâce à leur potentielle longévité elles ont en effet déjà démontré des durées de vie de l'ordre de plusieurs années (3 ans avec un prototype conçu par une spin-off de la US Naval Research [Bandyopadhyay13]). de plus ces piles permettent de convertir directement la biomasse en électricité, sans nécessiter une pré-transformation par fermentation ou tout autre procédé chimique (Capitaine, 2017)

I.2.2. Structure d'une pile microbienne

Structurellement, une pile à combustible microbienne se compose de deux chambres appelées chambre anodique et cathodique (électrodes) séparées par une membrane échangeuse de protons. le côté anode contient les micro-organismes électrochimiques actifs tandis que la cathode est abiotique. les microbes (bactéries) agissent comme un biocatalyseur qui stimule la dégradation des matières organiques pour produire des électrons qui se déplacent vers la cathode à travers le circuit électrique (Obileke et al.2021)

Les piles à combustible microbienne peuvent être complètement microbiennes lorsque la catalyse des réactions aux deux électrodes se fait grâce à des microorganismes ou semi microbiennes dans le cas où la catalyse à la cathode est réalisée par des catalyseurs minéraux (Halimi et al, 2018)

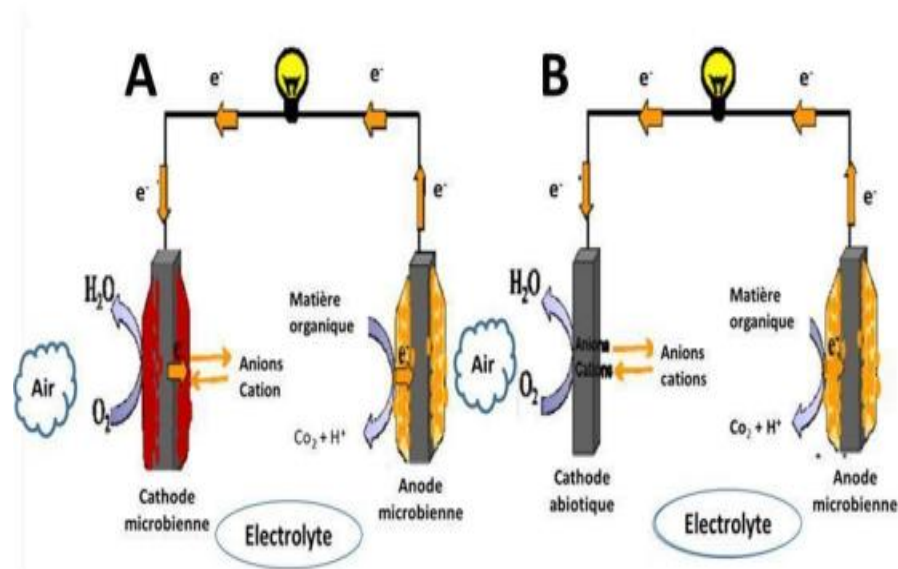


Figure 5 : Schémas de piles à combustible

A : totalement microbienne,

B : semi microbienne (Ketep, 2012, Halimi et al, 2018).

I.2.3.Composants d'une pile à combustible microbienne

I.2.3.1.Electrodes

Les matériaux rencontrés dans les piles microbiennes sont souvent le carbone, le graphite, l'acier inoxydable, le platine et le carbone vitreux réticulé sous différentes conformations : fil, grille, feuille, plaque d'éponge, feutre, barreau, tube, granules ou brosse , l'objectif est d'avoir une aire d'électrode la plus grande que possible (Pocaznoi 2012,KEBAILI ,2021).

I.2.3.1.1.Anode

Les électrodes à l'anode doivent présenter un certain nombre de caractéristiques : la conductivité, la compatibilité biologique et la stabilité chimique dans l'électrolyte. (Addi, 2018) (Meddour et al, 2022), le carbone est un heureux élu ! ce matériau est très abondant, modulable et globalement bon marché utilisé sous différentes conformations (feutres, tissus, feuilles...) comme support pour le biofilm [Logan et al 2006] (KEBAILI ,2021)

I.2.3.1.2.Cathode

Le carbone est le graphite sont les composants les plus utilisés dans les matériaux de la cathode vue leurs prix et leurs performances et ils doivent être enrichis par des catalyseurs. la recouverte des cathodes par une couche de catalyseur comme le platine est nécessaire (Addi, 2018) (Meddour et al,2022), le platine est un très bon réducteur d'O₂ mais son utilisation reste limitée à cause de son prix élevé et sa probable toxicité dans l'eau [Ahmed et al 2012](KEBAILI ,2021), le rôle de catalyseur joué par le platine est limité par la possibilité de son empoisonnement par les composés présents dans les eaux usées et par les valeurs neutres et alcalines du pH. l'oxygène est l'oxydant le plus utilisé à la cathode vue sa présence dans l'air. Sa réduction à la cathode conduit à la production de H₂O qui a un important potentiel d'oxydation (Addi, 2018) (Meddour et al, 2022),

Pour optimiser au maximum les performances d'une Pile à combustible microbienne (PACM) par la cathode, le moyen le plus simple consiste à ce que sa surface soit la plus grande possible, plus grande que la surface de l'anode [Aeltermann et al,2006] jusqu'à cinq fois plus grande (KEBAILI ,2021)

I.2.3.2.Résistance externe

La majorité des chercheurs préfèrent débiter la pile d'une résistance de 1 KOhms comme valeur standard , pour de longues périodes, et beaucoup d'autres utilisent la valeur de la résistance qui génère la puissance maximale(KEBAILI ,2021),la résistance externe permet de contrôler la différence de potentiel entre les deux électrodes et la production de courant par le système ,la valeur de cette résistance externe à une influence sur le phénomène limitant de la production du courant par le système (Lepage, 2012)

I.2.3.3.Membrane échangeuse d'ions

Dans les PCMs, la membrane échangeuse d'ions (MEI) est importante car elle évite tout D'abord aux réactifs des deux compartiments de réagir sans produire de l'électricité et elle maintient aussi l'équilibre des charges par la migration des ions, elle existe sous deux types :

I.2.3.3.1. Membranes échangeuses de cations MECs : contenant des groupes chargés négativement fixés à une matrice de polymère tels que SO_3^- , COO^- . elles sont sélectivement perméables aux cations.

I.2.3.3.2. Membranes échangeuses d'anions MEAs : qui contiennent des groupes chargés positivement tels que RNH_2^+ , R_2NH^+ ou aussi R_3N^+ fixés à une matrice de polymère, elles excluent inversement les cations et sont perméables aux anions (Smida, 2017)

Il existe plusieurs types de séparateurs [Lepage, 2012a] :

La membrane NafionTM est une membrane monopolaire échangeuse de cations dont les caractéristiques sont largement étudiées [Mauritz et Moore 2008]. la Nafion est la membrane la plus utilisée pour les montages PCM (KEBAILI, 2021)

I.2.4. Microorganismes électroactifs :

Dans certaines niches écologiques, les donneurs ou accepteurs d'électrons peuvent être très rares. par exemple, les eaux souterraines ou kryales (en tête de bassin versant) sont peu riches en matières organiques et plus généralement en donneurs d'électrons. à l'inverse les systèmes anaérobies tels les systèmes sédimentaires ou les méthaniseurs sont souvent pauvres en accepteurs d'électrons. dans ces environnements, certains microorganismes ont des techniques pour utiliser des donneurs ou accepteurs d'électrons particuliers tels que les métaux, facilement oxydables ou réductibles. mais ces composés sont très souvent trouvés sous forme d'oxydes solides insolubles (MnO_2 , Fe_2O_3 , $\text{Fe}(\text{OH})_3\dots$) ou susceptibles de précipiter lors d'une réduction ($\text{Fe}^{2+}\dots$). pour atteindre ces potentiels accepteurs ou donneurs d'électrons extracellulaires, certains microorganismes ont développé des systèmes de transfert d'électrons extracellulaire, ces microorganismes sont dits électroactifs car ils peuvent échanger des électrons avec des solides. cette propriété peut être mise en évidence par les signaux électriques mesurés à une électrode placée dans le milieu de culture (Roger et *al*, 2012 ;Berthomieu, 2021).

Depuis les années 2000, la découverte de microorganismes capables de transférer directement des électrons à une anode au sein d'une pile à combustible microbienne a déclenché un regain d'intérêt pour cette technologie. d'abord utilisés pour produire de l'électricité (Arends et Verstraete, 2012 ;Pierra, 2013).

Les bactéries électroactives (EAB) sont des microorganismes naturels vivants dans divers habitats (par exemple l'eau, le sol, les sédiments), y compris des habitats extrêmes, qui peuvent interagir électriquement entre eux et/ou avec leurs environnements extracellulaires, les EAB ont suscité un intérêt accru ces dernières années, car ils peuvent générer un courant électrique dans des piles à combustibles microbiennes (MFC), les MFC repose sur des microorganismes capables d'oxyder la matière organique et de transférer des électrons vers une anode. toute source de matière organique biodégradable peut être utilisée par EAB pour la production d'électricité (Garbini et al, 2023).

I.2.5. Biofilms électroactifs

Les biofilms sont des microorganismes électroactifs enformés dans des polymères conducteurs sécrétés par les EAM et formés par l'accumulation et la réticulation de polysaccharides extracellulaires, de protéines, d'acides nucléiques, de lipides et d'autres composants, les EAB sont présents sous la forme d'agrégats multicellulaires et jouent un rôle crucial dans les systèmes bioélectrochimiques pour diverses applications, notamment les piles à combustible microbiennes pour la production de bioélectricité renouvelable et l'électrosynthèse microbienne de produits chimiques précieux (You et al, 2023).

I.2.6. Respiration des microorganismes électroactifs

Le mode de transfert le plus courant dans la production de courant par les bactéries électroactives reste le transfert direct d'électrons par les cytochromes de type c (CTCs). les CTCs sont des protéines qui contiennent des hèmes, très répandues chez les bactéries et les archées. *Shewanella oneidensis* MR-1 possède 42 CTCs dont 80% localisés sur sa membrane externe (Lower et al., 2005 ; (Pierra, 2013). CymA est un CTC ancré dans la membrane interne et exposé au périplasme qui participe à beaucoup de processus de respiration anaérobie. le complexe MtrABC, quant à lui, joue un rôle clef dans le transfert d'électrons de l'électrode à la cellule. les trois protéines qui composent ce système sont associées et dépendent fonctionnellement l'une de l'autre. MtrC et OmcA sont deux protéines lipidiques qui sont considérées comme les dernières réductases extracellulaires chez *Shewanella* MR-1. Bien qu'OmcA soit capable de transférer des électrons à de nombreux accepteurs solides in vitro, MtrC serait plus impliquée dans les transferts extracellulaires d'électrons de *Shewanella* (Yang et al, 2012 ; Pierra, 2013).

I.2.7.Source des microorganismes pour la formation du biofilms

Une fois le matériau de l'anode sélectionné, l'étape suivante dans la formation d'une bioanode consiste à choisir la source de bactéries électroactives (Chabert et Coll, 2015 ;Ostormujof, 2023). on revisité l'électroactivité des environnements naturels, anthropiques et extrêmes, déterminant qu'une grande variété de bactéries électroactives et présente dans plusieurs écosystèmes. les bactéries électroactives se développent dans les milieux naturels tels que les sédiments aquatiques, de plage et marins (Band et coll, 2002 ; Ostormujof, 2023). Ont été des pionniers dans la récupération de l'énergie des sédiments marins en mettant en œuvre un MFC benthique. de plus (Rousseau et al, 2013) ont travaillé avec des marais salants pour inoculer des MEC pour la production de biohydrogène. les sols et composts enrichie en matière organique sont également une source prolifique de bactéries électroactives (Cercado-Quezada et al, 2011 ;Ostormujof, 2023).

Outre les environnements naturels, les bactéries électroactives peuvent également être trouvées dans plusieurs types d'eaux usées industrielles telles que les déchets des laiteries, des brasseries, des tanneries et des usines de papier et autres (Aghababaie et al, 2015 ;Ostormujof, 2023). les boues activées sont également utilisées comme source de bactéries électroactives pour le traitement des eaux usées dans différentes configurations de BES (Yoshizawa et al, 2014 ; Hoareau et al, 2021 ; Ostormujof, 2023). les bioanode peuvent être formées à l'aide d'un inoculum mono-espèce ou multi-espèces. l'inoculum monospécifique est utile pour une étude approfondie des mécanismes de transfert d'électrons, car leur complexité est réduite à une seule espèce bactérienne. de plus, le contrôle des paramètres de formation de l'anode peut être plus finement ajusté puisque l'espèce bactérienne est unique et connue. cependant, travailler avec un inoculum multi-espèces, qui conduit à la formation d'un EAB multi-espèces, est plus réelles de mise en œuvre d'une bioanode dans un BES(Ostormujof, 2023).

• Inoculum complexe

C'est un consortium multi-espèces. l'utilisation d'une culture mixte se rapproche des conditions réelles de mise en œuvre.

• Inoculum simple

L'inoculation à partir d'une culture pure permet de travailler dans des conditions strictement contrôlées. l'objectif est alors de comprendre les mécanismes de transfert

d'électrons et d'établir des relations entre la croissance microbienne et le courant électrique délivré (Champavert, 2016).

I.2.7.1.Culture complexe

L'activité d'au moins un générateur électrique est la condition nécessaire aux MFC pour produire de l'électricité. cependant une diversité d'électrongènes peut également contribuer à la production actuelle et dans la plupart des cas, peut être plus efficace. l'idée de recourir à des communautés mixtes à ainsi été proposée au cours de la dernière décennie. les cultures pures sont utiles pour clarifier le mécanisme de transfert d'électrons au niveau microbiologique et réduire davantage les souches microbiennes spécifiques dans les cultures mixtes. cependant, les électrodes purs cultivés nécessitent des conditions de fonctionnement relativement strictes et seuls des substrats sélectifs peuvent être utilisés, tandis que divers consortiums sont plus adaptés à l'utilisation de substrats complexes. les MFC offrant les meilleures performances sont toujours obtenus en utilisant des communautés mixtes, telles que les eaux usées ou les boues activées, comme biocatalyseur anodique (Cao, 2019).

I.2.7.2.Souche pure

Les souches ont été isolées à partir de biofilms EA multi-espèces ou ont été sélectionnées par criblage systématique de collections de micro-organismes. elles servent maintenant de souches modèles pour comprendre les phénomènes de transfert électronique à l'interface bactérie/électrode (Smida, 2017).

Plusieurs souches pures sont capables de transférer des électrons à la surface d'une électrode les souches ont été isolées à partir de biofilms EA multi-espèces ou ont été sélectionnées par criblage systématique de collections de micro-organismes. elles servent maintenant de souches modèles pour comprendre les phénomènes de transfert électronique à l'interface bactérie/électrode. dans la littérature on trouve des bactéries tels que *Geobacter sulfurreducens*, *Geobacter metallireducens*, *Rhodospirillum rubrum*, *Desulfuromonas acetoxidans*, *Geothrix fermentans* et *Shewanella putrefaciens*. Ces souches sont de plus en plus utilisées dans des PACMs ou dans des réacteurs électrochimiques, quelques tests positifs ont été également effectués avec les bactéries comme *Aeromonas hydrophila* (Pham et al, 2003), *Escherichia coli* (Zhang et al, 2007) ou *Clostridium butyricum* (Park et al, 2001). les études sur les représentants de la famille Firmicutes (Park et al, 2001) ou Acidobacteria (Bond and Lovley, 2005), les espèces *Acidiphilium cryptum* (Borole et al, 2008), *Geopsychrobacter*

electrodiphilus (Holmes et al, 2004b), *Rhodopseudomonas palustris* (Xing et al, 2008) ainsi que les levures *Saccharomyces cerevisiae* (Walker and Walker, 2006) et *Hansenula anomala* (Prasad et al, 2007) n'ont pas été poursuivis car les densités de courant n'avaient atteint que quelques dizaines ou centaines de mA/m² (Pocaznoi, 2012).

I.2.8.Principe de fonctionnement d'une pile à combustible microbiennes

Les bactéries présents dans l'électrolyte rejoignent l'électrode et se condensent en amas pour former un film adhérent à la surface de l'anode appelé biofilm électro actif (EA) [Bond et Lovley 2003], qui oxydant et catalysent des composés organiques fournis en tant que substrats et utilise l'anode comme accepteur final d'électrons. la conductivité de l'anode est améliorée grâce à la formation du biofilm électroactif et appelée dans ce cas, bio anode ou anode biologique.

Les électrons récupérés par l'anode se déplacent dans le circuit électrique jusqu'à la cathode ou ils seront engagés dans des réactions de réductions catalysées par des bactéries (bio cathode) ou non (cathode abiotique) les protons libérés par la réaction d'oxydation rejoignent la cathode et participent à la réaction de réduction en passant, en cas de présence, à travers une membrane échangeuse de protons ou autre système de séparation adéquat recommandé pour améliorer le bon fonctionnement de la pile [Kumar et al 2017], le circuit électrique externe reliant l'anode à la cathode est relié à une résistance habituellement fixée à 1 k Ω , aux bornes de la pile (KEBAILI, 2021)

Les électrons attirés vers l'anode induisent un potentiel positif de la cathode. Ainsi, la différence de potentiel entre la cathode positive et la bioanode négative est appelée force électromotrice ou tension de la cellule (Benghernit et al, 2022).

Les deux électrodes sont conçues avec des matériaux conducteurs afin d'assurer la collecte et le transfert des électrons. la puissance générée par la MFC est continue mais limitée par la réserve de matière organique, c'est-à-dire la vitesse de son renouvellement à proximité de l'anode, ou encore le transport des ions H⁺ jusqu'à la membrane d'échange (Capitaine, 2017)

Utilisant l'acétate comme substrat dans l'anode et l'oxygène comme électron terminal dans la cathode, En les réactions (1) à (3) sont présentées : (Obileke et *al.* 2021)

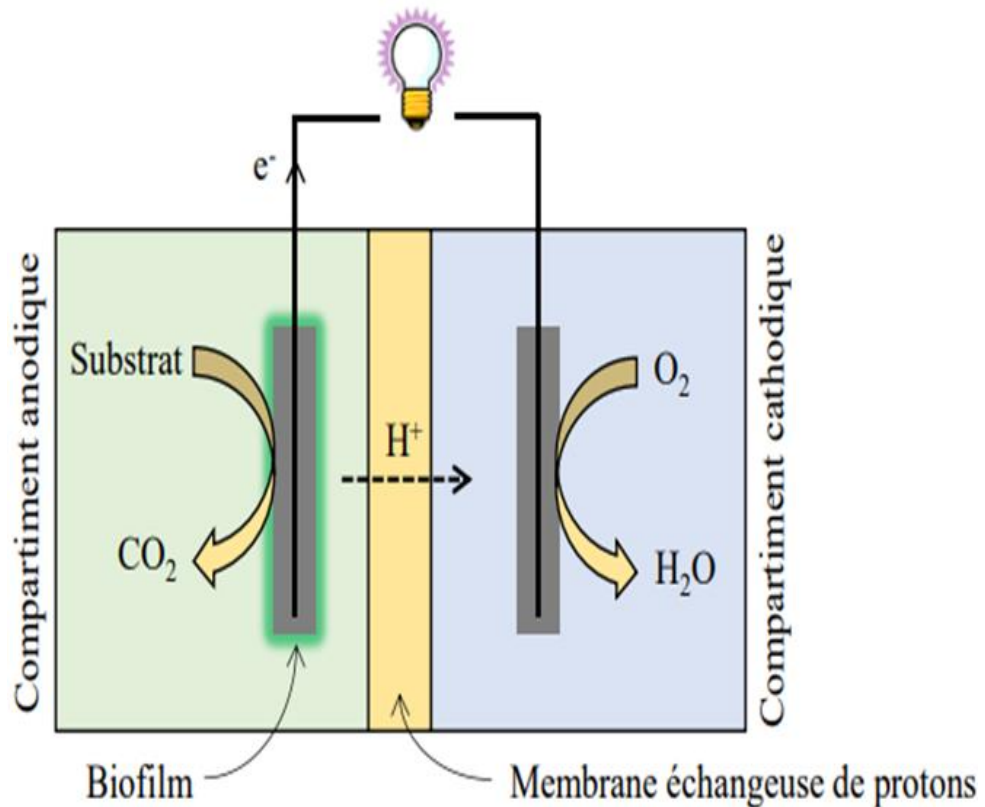
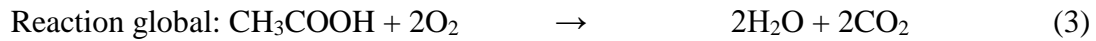
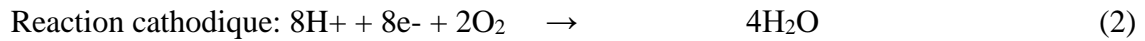
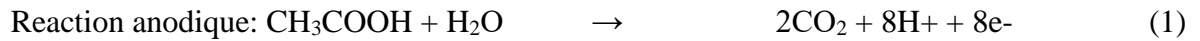


Figure 6 : principe de fonctionnement d'une pile microbienne (Capitaine, 2017)

I.2.9. La classification de pile microbienne

Peuvent être classés en deux types principaux selon la façon dont les électrons sont transportés vers l'électrode :

I.2.9.1. Transfert indirect

Ce type de MFC utilise des médiateurs chimiques, ce qui facilite le flux d'électrons vers l'anode, comme le montre la figure 7 (Logan, 2006) ces médiateurs chimiques sont appelés « métabolites électroactifs » (Flimban et *al.*, 2018, Oibileke et *al.* 2021). peuvent être de nature exogène, c'est-à-dire naturellement présents dans le milieu à traiter, comme les acides humiques ou certains composés soufrés (Stams et *al.*, 2006). d'autres types de médiateurs sont endogènes : ils sont synthétisés par les micro-organismes eux-mêmes, comme les quinones (Newman et Kolter, 2000), les flavines, les cystéines ou les phénazines (Rabaey et *al.*, 2005a). enfin, certains transporteurs externes ajoutés artificiellement ont prouvé leur efficacité (notamment chez les levures). (Babanova et *al.*, 2011, Lepage, 2012).

Les médiateurs artificiels les plus utilisés sont le rouge neutre, la thionine, le chélate de fer, les dérivés de la quinone, la phénazine, la phénoxazine et la phénothiazine (Pocaznoi, 2012).

Le choix d'un médiateur artificiel doit satisfaire certains critères :

- Sa forme oxydée doit facilement pénétrer à travers la membrane.
- les cinétiques des réactions d'oxydation à l'électrode doivent être rapides.
- son potentiel d'oxydo réduction doit être proche de celui du métabolite Réducteur ;
- Aucune de ses formes oxydées ne doit interférer avec d'autres processus métaboliques (Ketep, 2012). (Halimi et *al.*, 2018)

Le médiateur pénètre dans la cellule, acceptant ainsi les électrons avant de les libérer et de les donner à l'anode en tant qu'accepteur final d'électrons. l'étude a conclu que les MFC fonctionnent à un niveau d'activité soutenu élevé car les bactéries sont capables de produire leur médiateur ou de transférer directement des électrons à la cellule. (Oibileke et *al.* 2021).

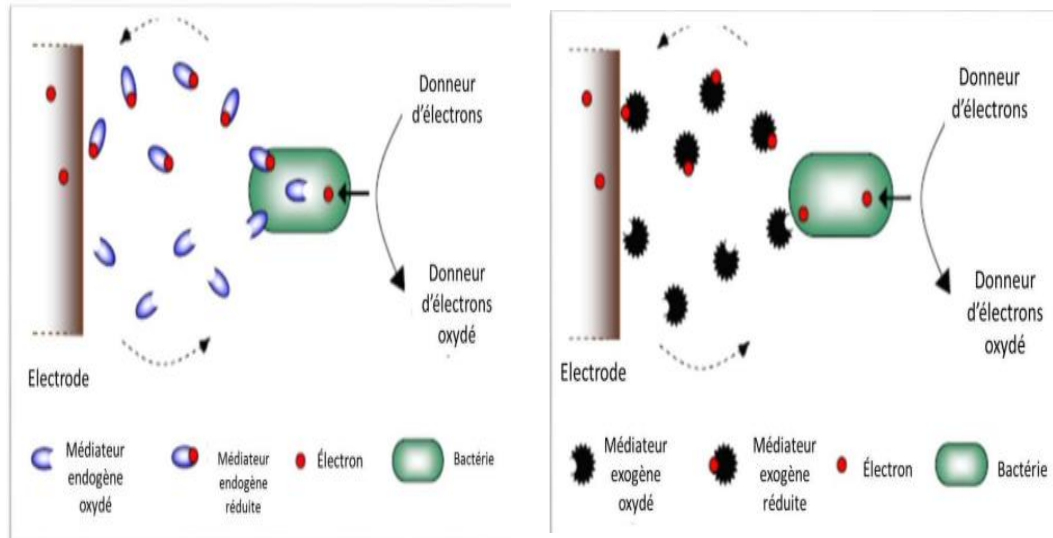


Figure 7 : Représentation schématique du mécanisme de transfert d'électrons indirect entre une bactérie et une électrode via des médiateurs exogènes et endogènes (De Almeida Cournet, 2010, Halimi et *al*, 2018).

I.2.9.2 Transfert direct

C'est un transfert qui nécessite un contact direct entre la membrane externe de la cellule bactérienne et l'anode, cet échange d'électrons est assuré par des protéines redox membranaires de type cytochrome C (OmcB, OmcD, OmcE) qui ont la capacité de transférer les électrons de l'intérieur de la cellule bactérienne vers un accepteur insoluble qui est l'anode. cette découverte qui a eu lieu en 2002 fut révolutionnaire dans le domaine de la pile à combustible microbienne. ce mécanisme de transfert direct via les cytochromes a été clairement démontré chez *Geobacter sulfurreducens* (Figure 8).

En 2005 un nouveau mécanisme de transfert direct a été décrit. Il s'agit de celui réalisé par Les pilis, sont des nanofils électriques ou bien "Nanowires" qui assurent le transfert d'électrons directement de la cellule vers l'électrode. ce mécanisme était étudiés en détail uniquement chez deux microorganismes *Shewanella oneidensis* ; *Geobacter sulfurreducens* (Halimi et *al*, 2018), ces pilis pouvant atteindre jusqu'à 50 μm , ces nanofils permettent à ces bactéries : -à l'instar du transfert par médiateurs -de ne pas être tributaires d'un contact avec l'électrode pour transférer leurs électrons (Reguera et *al* , 2005 ; Gorby et *al.*, 2006 ; Logan

etRegan,2006).de manière générale ,le transfert direct a une efficacité énergétique plus intéressante pour la bactérie que le transfert indirect (Torres et *al.*,2009, Lepage,2012).

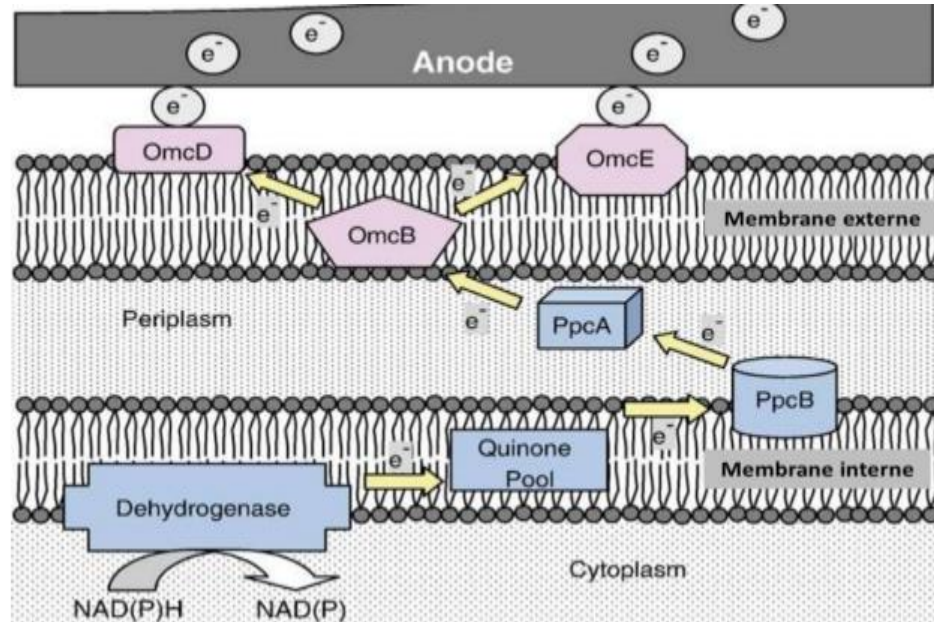


Figure 8 : représentation des mécanismes de transfert d'électrons directe via les cytochromes chez *Geobacter sulfurreducens* vers l'anode (Bergel, 2012, Halimi et *al.*, 2018).

I.2.10.Substrats utilisés pour les MFC

Le substrat est considéré comme l'un des principaux facteurs qui affectent la production d'électricité à l'aide des MFC (Das et Mangwani, 2010) et également appelé anolyte (Garba et al ,2017) (Chae et *al.* ,2009) une grande variété de substrats peuvent être utilisés dans les MFC pour la production d'électricité, allant des composés purs aux mélanges complexes de matière organique présents dans les eaux usées (Pantet *al.*;2010)l'effet du substrat concerne la composition intégrale de la communauté bactérienne dans le biofilm anodique et les performances de MFC (Borole et *al.* ,2011) certains des substrats déjà utilisés dans les MFC comprennent l'acétate, les eaux usées des brasseries de glucose, la biomasse lignocellulosique, les eaux usées de synthèse, les eaux usées du traitement de l'amidon, les lixiviats de décharges, les eaux usées de teinture ainsi que les substrats inorganiques, cependant des études récentes ont montré que l'acétate et le glucose sont les substrats les plus fréquemment utilisés, avec le résultat d'acétate le plus élevé (Obileke et *al.* 2021)

- Pour sélectionner un combustible, deux paramètres sont indispensables à expérimenter :

-La vitesse de biodégradabilité

- La non toxicité vis-à-vis des microorganismes.

Les premiers combustibles par les chercheurs sont des composés de faibles poids moléculaires, tels que des carbohydrates comme le glucose (Chaudhuri et Lovely 2003), généralement les composés simples permettent de donner des densités de puissance plus importantes qu'avec les composés complexes et qui sont de l'ordre de la centaine de mW par mètre carré de surface d'électrode (mW/m²), néanmoins des exceptions sont rapportées, par exemple 506 mW/m² ont été obtenus avec de l'acétate (Liu et al 2005, KEBAILI ,2021)

I.2.10.1.Acétate

Le substrat de référence le plus utilisé est l'acétate car il est rapidement biodégradable et fermentescible ce qui assure donc qu'il ne soit pas consommé par d'autres voies métaboliques que la respiration de l'anode (Addi ,2018,Meddour et *al*, 2022).

Liu et al,(2005) étudiés, l'acétate en tant que substrat pour la génération de densité de puissance a atteint 506 W/m³, 800 mg/L d'électricité dans un MFC à chambre unique. cette valeur tend à être 66 % plus élevée que celle produite avec le butyrate (305 W/m³, 1000 mg/L) ; de même, les performances de quatre substrats différents ont été étudiées en termes d'efficacité coulombienne (CE) et de puissance de sortie. il a été révélé que l'acétate nourri avec du MFC présentait la CE la plus élevée d'environ 72,3 %, suivi du butyrate (43,0 %), du propionate (36,0 %) et du glucose (15,0 %) (Chae et *al*, 2009). le consortium induit par l'acétate à base de MFC qui atteint plus de deux fois la puissance électrique maximale et une résistance à la charge externe de moitié optimale par rapport au MFC basé sur des consortiums induits par des eaux usées riches en protéines (Liu et *al* ,2009], Obileke et *al*. 2021).

I.2.10.2. Glucose

Le glucose est un autre substrat couramment utilisé dans les MFC. La présence de glucose dans les boues d'épuration améliore la propriété de conductivité du MFC (Obileke et al. 2021) les boues anaérobies génèrent une densité de puissance maximale de 0,3 W/m³ par rapport au glucose dans le même système avec une densité de puissance maximale de 161 W/m³ [Hu, 2008]. généralement, les MFC alimentés avec du glucose génèrent un faible CE en raison de la perte d'un électron par des bactéries concurrentes. cependant, la structure bactérienne relativement diversifiée a permis une utilisation beaucoup plus large du substrat et une densité de puissance (PD) la plus élevée. une autre raison du faible CE associé au MFC alimenté avec du glucose est la présence de propriétés de substrat fermentescibles dans le glucose qui consomme divers métabolismes concurrents, comme la fermentation et la méthanogenèse, qui ne peuvent pas produire d'électricité (Chae et al, 2009, Obileke et al.2021).

Divers métabolites tels que le formiate, le succinate, le lactate, l'acétate et le propionate sont produits lors de l'oxydation du glucose dans le MFC en raison de sa nature fermentaire, mais l'acétate a été identifié comme le principal et le plus efficacement utilisé (Kim et al. 2011, Benghernit et al, 2022). l'oxydation électrocatalytique du glucose peut être réalisée grâce à l'oxydation du NADH (Mardiana et al. 2015). les électrons sont donc produits et capturés par les espèces sous forme oxydée (Benghernit et al, 2022).

I.2.11. Applications des piles à combustibles microbiennes

Les piles à combustible microbiennes trouvent des applications dans plusieurs domaines discutés ci-après.

I.2.11.1. Traitement des eaux usées

Les microorganismes présents dans l'eau usée domestique ou industrielle sont capables de dégrader les matières organiques présentes en grande concentration dans ce milieu (Rabaey et al, 2007, Lovley, 2008). l'utilisation des PCMs représente alors à plus ou moins long terme une alternative économique intéressante aux procédés actuels de traitement des eaux usées puisqu'elles permettent en principe de dépolluer tout en produisant de l'électricité. (Smida, 2017) les eaux usées des industries agroalimentaires ainsi que les effluents

urbains sont des combustibles très avantageux pour les biopiles microbiennes. Les avantages d'utiliser les effluents et les eaux usées sont qu'en plus de contenir une grande quantité de matière organique, ils possèdent également les bactéries nécessaires à leur dégradation. (Park *et al.*, 2003, Liu *et al.* 2005, Champavert, 2016).

Le premier prototype de PACM à grande échelle a été conçu en Australie (Queensland) dès 2005. Ce prototype a été testé dans une brasserie de la société Foster. Il est constitué de 12 modules de 3 mètres de hauteur et d'un volume de 1 m³ chacun. Le but est de traiter les effluents de la brasserie afin d'épurer l'eau tout en produisant de l'électricité. Les anodes sont en brosse de fibre de carbone et les cathodes en brosse de graphite (Ahn *et al.*, 2010, Champavert, 2016)

I.2.11.2. Dessalement des eaux de mer

Le dessalement de l'eau de mer est une option pour produire de l'eau potable dans de nombreuses régions du monde, mais la plupart des technologies de dessalement de l'eau sont coûteuses (Shannon *et al.*, 2008, Smida, 2017) les biopiles peuvent être couplées au dessalement de l'eau de mer qui repose sur le transfert d'espèces ioniques en utilisant le courant généré par les bactéries (Cao *et al.*, 2009). La cellule de dessalement microbienne se compose de trois compartiments ; un compartiment anodique, un compartiment cathodique et un compartiment intermédiaire contenant de l'eau de mer. Les compartiments anodique et central sont séparés par une membrane échangeuse d'anions (MEA). Le compartiment cathodique est séparé du compartiment central à l'aide d'une membrane échangeuse de cations (MEC). La production des électrons au niveau de la bioanode suivie de la libération de protons en solution conduit au transfert des ions chlorure vers le compartiment anodique tandis que les ions sodium sont transférés dans le compartiment cathodique (Smida, 2017) cette technologie peut se révéler intéressante dans les régions pauvres n'ayant pas accès à l'eau potable (Champavert, 2016).

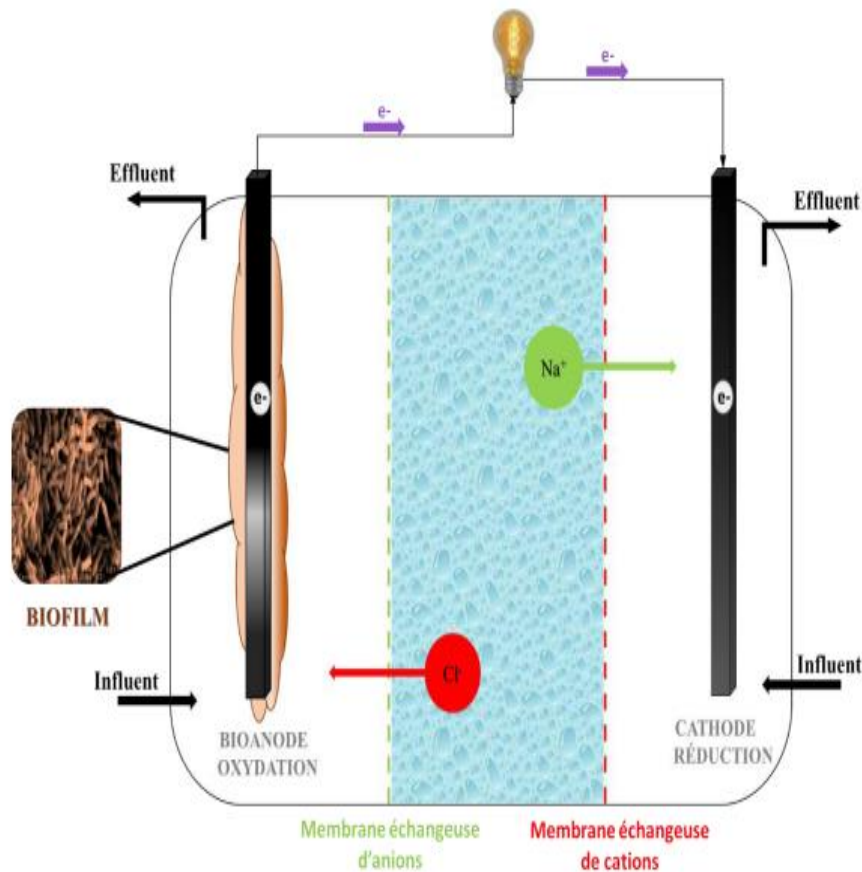


Figure 9 : Cellule microbienne de dessalement à trois compartiments (adaptée de Cao et *al*, 2009) (Smida, 2017).

I.2.11.3. Production d'énergie

Les Piles à combustible microbiennes offrent des nouvelles possibilités pour la production durable d'énergie à partir de composés biodégradables tels que les matières organiques (Du et *al*, 2007b, Nor et *al*, 2015), (Watson and Logan, 2010), un moyen possible pour résoudre le problème des faibles puissances produites est de stocker l'électricité dans des appareils rechargeables et ensuite de distribuer l'électricité aux utilisateurs finaux (Ieropoulos et *al*, 2003, Smida, 2017).

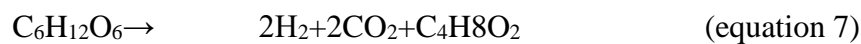
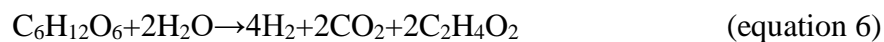
Un exemple de PACM à grande échelle est celle qui a été construite par l'équipe de L. Tender (Massachusetts University, Etats-Unis) (Tender et *al*, 2008). Il s'agit d'une PACM

benthique, c'est à-dire que l'anode est insérée dans les sédiments marins tandis que la cathode se situe dans l'eau de mer (contenant l'oxygène dissous). les anodes utilisées sont en plaques de graphite et les cathodes en brosse de graphite. ce prototype pèse 36 kg. les performances de cette PACM ont été stables pendant un an (puissance de 36 mW) ce qui a permis d'alimenter des dispositifs météorologiques en discontinu grâce à un condensateur qui permettait de stocker l'électricité produite pour la délivrer durant le temps de fonctionnement des équipements (Champavert, 2016).

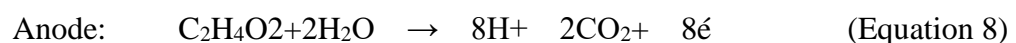
I.2.11.4. Production d'hydrogène

Les PCMs peuvent être facilement modifiées pour produire de l'hydrogène au lieu de l'électricité (Liu et al, 2005b, Das and Veziroglu, 2008, Call et Logan, 2008 et Holzman, 2005), ces biopiles consomment de l'électricité (renouvelable si possible) dans une configuration connue sous le nom de cellule d'électrolyse microbienne et produisent de l'hydrogène à la cathode tout en oxydant la matière organique à la bio anode microbienne (Smida, 2017).

Un système détourné des PACMs a également été envisagé afin de produire du dihydrogène à la cathode : ce sont les électrolyseurs microbiens (Liu et al, 2005, Das et al, 2008, Call et al, 2008, Champavert, 2016). la fermentation bactérienne permet de produire 4 moles de dihydrogène par mole de glucose lorsque le produit final est de l'acétate. dans ce cas, la fermentation du glucose en acétate produit 2 moles d'acétate (Équation 6). si le produit final est du butyrate, alors seulement 2 moles de dihydrogène sont produites par mole de glucose (Équation 7).



L'oxydation de l'acétate à l'anode produit 8 moles d'hydrogène



(Logan et al, 2010 et Champavert, 2016)

I.2.11.5. Bioremediation

La bio remédiation est la décontamination des milieux pollués (par exemple le nitrate ou l'uranium (VI)) par la dégradation chimique de ces polluants ou par l'intermédiaire de bactéries (oxydoréduction) (Champavert, 2016) en 2004, Gregory et al (2004b) ont exploré l'idée d'utiliser des biopiles microbiennes pour la bio remédiation de nitrate in situ. dans ce cas la bio électrode est la cathode qui sert à réduire les polluants par le biofilm développé à la surface, qui peut être soit issu d'une culture mixte soit d'une culture pure de *Geobacter metallireducens* dans des conditions anaérobiques (Smida, 2017). lorsqu'un potentiel de 500 mV (vs Ag/AgCl) est appliqué, le nitrate (NO_3^-) est réduit en nitrite (NO_2^-) par une culture pure de *Geobacter metallireducens*. le même groupe de recherche a aussi montré que des cultures de *Geobacter sulfurreducens* étaient capables de réduire le fumarate ($\text{C}_4\text{H}_3\text{O}_4^-$) en succinate ($\text{C}_4\text{H}_5\text{O}_4^-$) (Lovley, 2006, Smida, 2017).

Méthodologie

II .Matériels et méthodologies

La partie expérimentale de ce travail a été réalisée dans un niveau de laboratoire microbiologie de Département des Sciences Biologiques, UNIVERSITE KASDI MERBAH – OUARGLA et laboratoire EL-AMEL .nous sommes fixés comme objectif : recherche des bactéries électroactives et essai d'élaboration des biopiles microbiennes.

II.1.Echantillonnage

Dans cette expérience, nous avons faire premièrement de prélèvement des échantillons d'eau d'un lac salé de sebkha de AIN BEIDA ouargla (SB) et de sol herbeux (sol d'université)(SA), l'échantillonnage est effectué de façon aléatoire à l'aide d'une spatule stérile à une profondeur de 20 cm. chaque échantillon de sol prélevé dans des flacons en verre stériles.



Photo 1: SB: SEBKHA DE AIN BEIDA SA : sol (Université)

II.2.Analyses physico-chimiques

II.2.1.Mesure de conductivité

La conductivité est l'aptitude d'une solution à laisser les charges électrique se déplacer librement, donc permettre le passage d'un courant électrique la conductimétrie implique la mesure de la conductance exprimée en siemens S ou de la résistance en Ω de l'analyte, on ne s'intéresse qu'à la mobilité des ions et pas aux propriétés d'oxydoréduction (Piard, 2018).

II.2.2.Mesure de pH

La mesure électrochimique du pH repose sur la mesure de différences de potentiel. on utilise nécessairement un couple d'électrodes composé d'une électrode de référence à

potentiel déterminé (type Hg /Hg₂ Cl₂ ou Ag/AgCl) et d'une électrode indicatrice réagissant à la concentration de l'ion H⁺, classiquement une électrode de verre. ce couple d'électrodes est immergé dans la solution à étudier et la différence de potentiel est convertie en pH à l'aide d'un pH mètre (Aminote et al, 2004).

II.3.Réalisation des réacteurs biopiles

Nous avons conçu un montage simplifié d'une biopile, trois types d'électrodes (charbon-aluminium-cuivre) ont été testés dans cette expérience afin de choisir le minérale que peuvent réagir avec les bactéries présentent dans notre échantillon et donne une valeur élevée du voltage.

Dans un récipient en verre nous avons mettre une quantité de notre échantillon puis on ajoute une quantité d'eau distillé à des deux types d'échantillons ; ensuite deux fils de cuivre sont introduit et sont lié entre eux et attaché avec deux électrodes (représente cathode et anode) ainsi représente une pile microbienne.

De l'autre côté pour former la pile semi microbienne dans deux récipient en verre nous avons mettre une quantité d'échantillon puis en ajoute une quantité d'eau distillé ; ensuite introduire un fil de cuivre attaché avec une électrode (anode) et le deuxième fil de cuivre (cathode) introduire dans un Bécher contient d'eau distillé ; puis ces deux file nous avons attaché entre eux, pour les deux types d'échantillons.

Les dispositifs sont incubés à température ambiante dont le voltage est mesuré quotidiennement, nous avons utilisé un multimètre au niveau de la zone d'attachement des deux fils en mesurent le voltage pour les trois types d'électrodes et chaque types pour les deux échantillons (SA-SB) par multimètre EMPTOP (annexe 3)

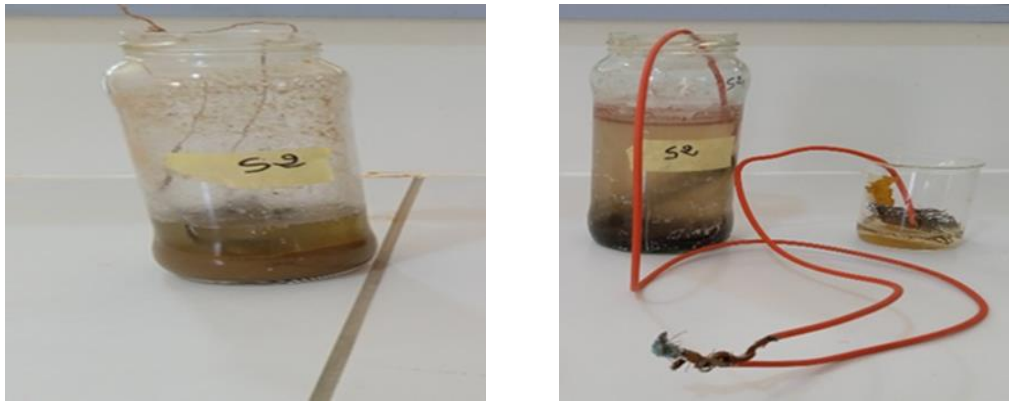


Photo 2 : Pile totalement microbienne de SB ; pile semi microbienne de SB

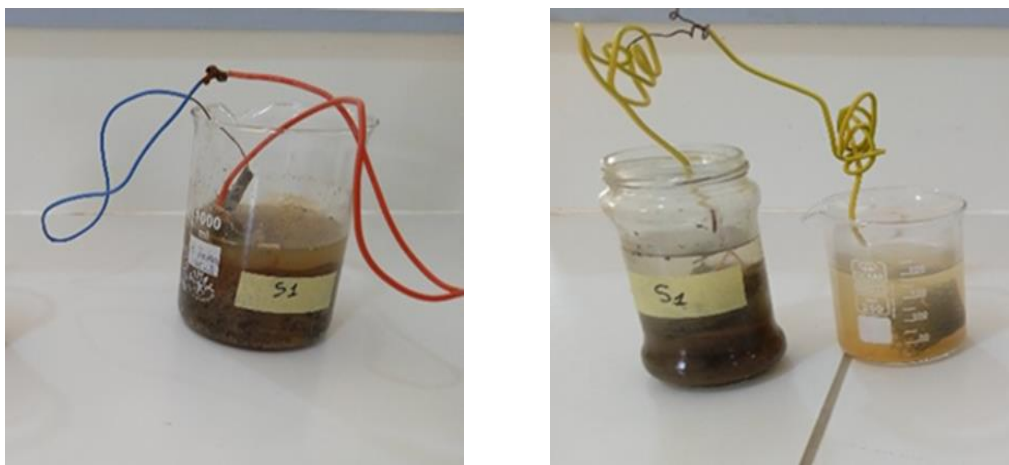


Photo 3 : Pile totalement microbienne de SA ; Pile semi microbienne de SA

II.4. Analyses Microbiologique

II.4.1. Isolement des bactéries aérobies et réalisation des réacteurs biopiles

Afin d'isoler la microflore bactérienne aérobie mésophile existante dans les deux échantillons, nous avons procédé des cultures sur les milieux de Chapman et de gélose nutritif GN solide (annexe 1). Pour se faire, une série de dilutions de la suspension de sol allant de 1/2 à 1/4 a été préparée. Les cultures sont ensuite incubées à 30C pendant 3jours.

Après incubation, quelque colonies des bactéries développées sur GN sont inoculées dans le bouillon BN et les bactéries poussé sur le milieu de Chapman sont cultivées dans le BN salé (BN salé 75g/l de NaCl) ,dans chaque culture il y a le circuit électrique (fil de cuivre) lie les deux électrodes, ainsi on forme 4 types de biopiles aérobie ,le suivi de voltage de ces cultures se fait chaque jour par utilisation d'un multimètre (EMPTOP, 2000Counts)(annexe 3)

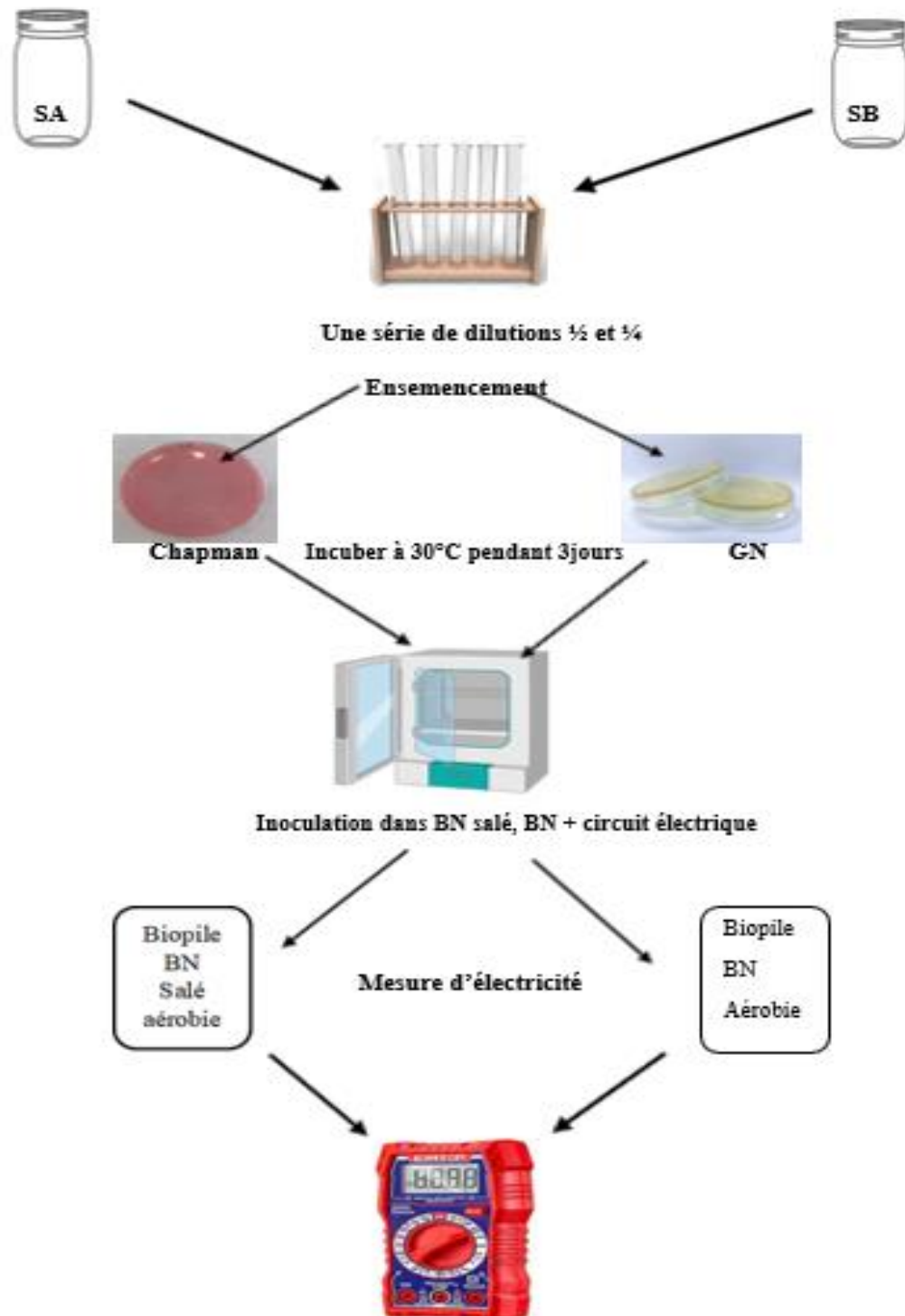


Figure 10 : biopiles réalisées par les bactéries aérobies

II.4.2. Isolement des bactéries anaérobies et réalisation des réacteurs biopile

L'isolement des bactéries anaérobies de chaque échantillons (SA, SB) est réalisés par l'ensemencement de 0.1ml de différentes dilutions déjà préparés (SM et D1/2 et D1/4) sur des boites pétries contenant le milieu GN et le Chapman(annexe 1). ces cultures sont met à l'intérieure d'un coffre en métal avec une bougie en flammes ensuite ce coffre est bien fermé par leur couvercle tandis que la bougie est en flammes pour éliminer l'O₂ et favoriser l'anaérobiose. l'incubation se fait pendant 3 jours à 30°C.

Les colonies isolées ont été repiquées dans un milieu BN et BN salé et incubées pendant deux semaines à 30°C. les dispositifs sont ajouté une quantité d'huile de paraffine, ainsi on forme deux types de piles anaérobies ;le suivi de voltage de ces cultures se fait chaque jour par utilisation d'un multimètre (EMPTOP, 2000Counts)(annexe 3)

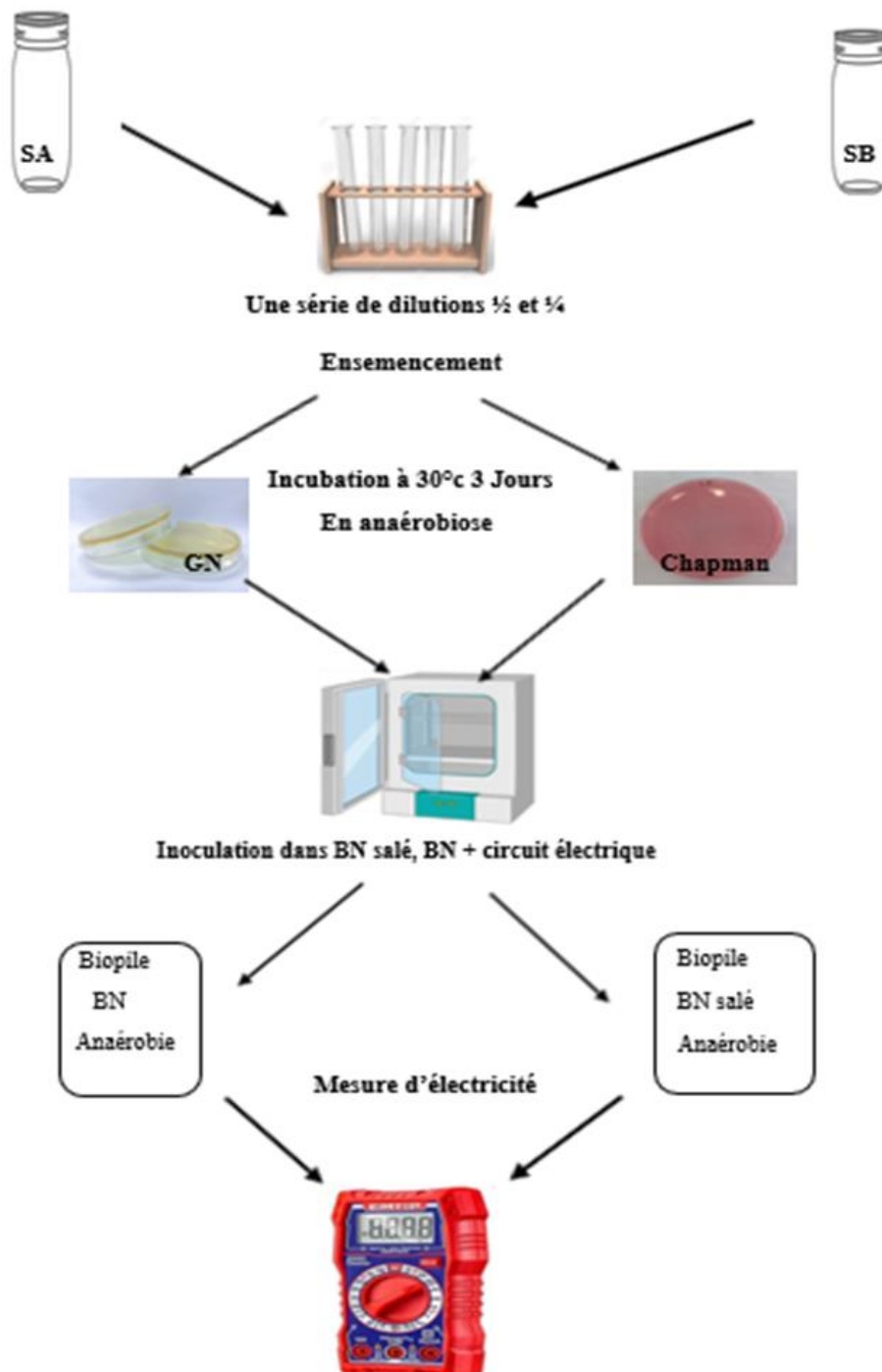


Figure 11 : biopiles réalisées par les bactéries anaérobies

II.5. Isolement des bactéries électroactives

L'isolement des souches électroactives se fait à partir de biopile inoculée par les bactéries aérobies isolées de sebkhet Ain Beida (SB), dont le prélèvement des bactéries adsorbées sur les surfaces des électrodes d'aluminium est réalisé par un écouvillon ensuite l'isolement est effectué sur les milieux de Chapman et la gélose salé.

Les boîtes sont incubées pendant 72h à 30°C. les colonies apparues sont purifiées plusieurs fois sous les mêmes conditions.

II.6. Sélection

Afin de sélectionner les souches ayant grand pouvoir électroactif des précultures sont effectuées par l'inoculation de deux colonies des souches purifiées (S1.S2.S3.S4.S5.S6) dans 50 ml de BN salé. ces derniers sont incubés sous agitation 150 tour:/min à 30C pendant 2 jours. les biopiles de ces souches sont constitué de 150 ml de BN salé avec des électrodes d'aluminium de surface 35 cm² (5cm x7 cm), ces cultures sont incubées sous agitation 100tour:/min à 30C pendant 10 jours.

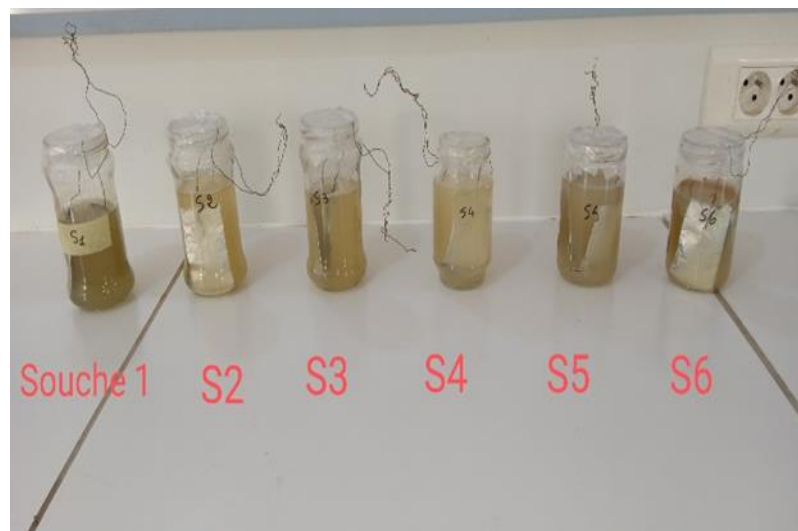


Photo 4 : biopiles des six souches isolées

II.7. Pré identification de souche sélectionnée

II.7.1. Caractérisation morphologique

II.7.1.1. Caractérisation macroscopique

L'observation de l'aspect macroscopique des colonies isolées permet d'effectuer une première caractérisation, avec une orientation possible des résultats au cours de l'identification.

- Aspect : lisse, rugueuse, sèche.
- L'opacité : opaque, translucides, transparente
- L'élévation : bossue, convexe, plane.
- La pigmentation : couleur de la colonie.
- La taille des colonies par la mesures du diamètre : petite ; moyenne ou grande taille.
- La forme des colonies : punctiforme, irrégulières,...etc.

II.7.1.2. Caractérisation microscopique

L'observation de l'aspect microscopique des colonies obtenue est effectuée par l'examen de coloration de Gram. le principe de cette méthode, repose sur une différence fondamentale entre la composition biochimique des parois cellulaires. elle permet la mise en évidence de la forme, l'arrangement, la pureté, ainsi que la sporulation. elle repose sur un classement des bactéries selon leur capacité a fixer le cristal violet (Prescott, et *al.* 2010, Tou-Dallil, 2021).

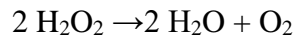
II.7.2. Caractérisation biochimique

Les analyses biochimiques permettent en général de distinguer les espèces, même étroitement apparentées entre elles. Cette approche nous oriente sur le métabolisme des bactéries et les enzymes qu'elles possèdent. Certains tests ont été réalisés en utilisant la galerie API 20E (annexe 2) et d'autres en utilisant des réactifs appropriés.

II.7.2.1. Recherche de la catalase

Certaines bactéries produisent une catalase, qui est une enzyme de nature ferroprotéique, ayant La propriété d'empêcher l'accumulation du peroxyde d'hydrogène

H₂O₂ dans la cellule Bactérienne, en le décomposant avec dégagement d'oxygène O₂ selon la réaction :



C'est l'action directe de l'enzyme qui est mise en évidence dans la masse bactérienne (Zámocký, et al. 2000, Gudelj, et al. 2001, Tou-Dallil, 2021).

II.7.2.2. Recherche de l'oxydase

Ce test permet la détection d'un type particulier de la chaîne respiratoire, qui comporte en fin de chaîne un cytochrome C et l'oxydase associée. L'oxydase est une enzyme entrant dans divers couples d'oxydoréduction, agissant sur un substrat incolore, et entraînant la formation d'une semi-quinone rouge. (Tarrand et Gröschel 1982, Kroll 1985). Les bactéries qui possèdent une telle chaîne peuvent oxyder des composés chimiques comme le réactif de l'oxydase « dihydro-chlorure de tetraméthyl-p-phenylène-diamine 1% ». Les électrons sont transférés de ce réactif au cytochrome C et de là, vers l'oxygène, via l'oxydase. Ainsi oxydé, le réactif développe une couleur violette intense (Tou-Dallil, 2021).

II.8. Conservation des souches

Les souches bactériennes sont cultivées dans des tubes contenant un milieu BN additionné de 75g NaCl et glycérol (20%). Après croissance à 30°C, elles sont conservées au congélateur.

II.9. Optimisation de biopile

Dans le deuxième contexte on a concentré l'étude sur l'isolat sélectionné S3 pour avoir des informations sur leur pouvoir électroactifs ainsi l'effet de surface d'électrodes lors de culture

Le potentiel de la souche S3 est évalué à partir de pré-cultures de colonies prélevées à partir de culture jeune sur milieu solide (48 heures) qu'on ensemence dans des erlenmeyers contenant 30 ml de milieu BN salé, ces derniers sont incubés à 30°C avec une agitation de 100 tr/min pendant 48 h. Les contenus des erlenmeyers sont versés dans des récipients en verre contenant 410ml de milieu de culture BN salé puis incubés à 30 °C sous agitation de 100 tr/min pendant 10 jours.

Les biopiles sont constituées à partir des précultures en utilisant des électrodes d'aluminium de différentes dimensions :

- 10cm longueur et 7 cm de largeur c'est-à-dire double de la surface 35cm²
- 4cm longueur et 4cm de largeur c'est dire la moitié de la surface 35cm²
- La dernière biopile avec électrodes de même surface comme la première biopile S3 (35 cm²)

L'évolution de la biomasse est suivie quotidiennement par la mesure de la densité optique (DO) à 600 nm (Beal et al ,2020)ainsi que le voltage.

Résultats et discussions

III.RESULTAT ET DISCUSSION

III.1.Caractérisation des échantillons

Les résultats d'analyses physicochimiques des échantillons étudiées sont signalés par :

Le tableau 1 : PH et conductivité électrique des échantillons étudiés à 30°C.

L'échantillon	PH	conductivité
SA	8	5 ms/cm
SB	7,25	132 ms/cm

SB : SEBKHA DE AIN BEIDA **SA** : sol (Université)

Le développement des microorganismes sur les deux échantillons dépendent à l'état nutritionnelle et PH de l'environnement.

L'état nutritionnel de l'environnement affecte considérablement la réponse d'abactirium pour former un biofilm multicouche ou rester en suspension. l'environnement nutritif et plus probablement si influent dans cette réponse due aux couts énergétique de la jonction et de la sortie du biofilm. il semble que la formation de biofilm répond aux différents besoins des espèces bactériennes différentes en fonction des environnements nutritifs (Price, 2012 ; Tilahun et al, 2016).le pH optimal pour la sécrétion de polysaccharides dépend de l'espèce individuelle ; cependant, elle se situe autour de pH 7 pour la plupart des bactéries (Tilahun et al, 2016 ; Alotaibi et al, 2021).

III.2.Réalisation des réacteurs biopiles :

Le nombre des bactéries electroactive est en quantité faible et avec la présence d'autres bactéries non électro actives et d'autres types des microorganismes donc il y a un concurrence sur les nutriments ça ne favorise pas la formation d'un biofilm electroactive sur les électrodes ainsi l'absence de transfert d'électrons aux électrodes par les biofilms électroactives.

Selon Tilahun et *al*, 2016, l'état nutritionnel de l'environnement affecte considérablement la réponse d'abactirium pour former un biofilm multicouche ou rester en suspension.il semble que la formation de biofilm répond aux différents besoins des espèces

bactériennes différentes en fonction des environnements nutritifs (Price, 2012 ; Tilahun et al, 2016)

III.3. Analyses Microbiologique :

III.3.1. Isolement des bactéries aérobies et réalisation des réacteurs biopile

Tableau 2 : potentiels des biopiles aérobies

Les biopiles	SA BN aérobie	SA BN salé aérobie	SB BN aérobie	SB BN salé aérobie
électrodes d'aluminium	0 mv	20,7mv	102,8mv	594mv
Electrodes de : cuivre ou charbon	0 mv	0 mv	0 mv	0 mv

SB: SEBKHA DE AIN BEIDA **SA :** sol (Université)

D'après le tableau 2 ; on remarque que le voltage maximal est différent dans les biopiles qui ont des électrodes d'aluminium dont la plus grande valeur était dans la biopile SB BN salé aérobie (594mV). Mais les biopiles qui ont des électrodes de charbon et les biopiles qui ont les électrodes de cuivre ne donnent aucune valeur de voltage.

Les bactéries halophiles et les haloarchées vivent toujours dans des écosystèmes à forte salinité, elles peuplent de façon quasi-exclusive les marais salants, les lacs salés et les mines de sel où la salinité est bien supérieure à celle des océans (3,5 % de NaCl) (Kifouche et al, 2023).

Les bactéries halophiles sont des organismes remarquables qui ont évolué des stratégies pour survivre à des concentrations salines élevées (Gaffney et al, 2021). il a été démontré que les bactéries halophiles sont électroactives et, en général, l'électroactivité est largement observée parmi toutes les familles de bactéries (Koch et al, 2018 ; Shrestha et al, 2018). 'intégration de bactéries halophiles dans les piles à combustible microbiennes est

devenue particulièrement intéressante pour la production d'énergie renouvelable et la biodétection auto-alimentée (Gaffney et al, 2021).

Les biofilms électroactifs aérobies se forment naturellement en quelques jours dans de l'eau de mer naturelle en système ouvert (Dumas et al, 2008) ou bien dans un système fermé continuellement renouvelé en eau de mer naturelle (Erable et al, 2010), la réduction du dioxygène par électro catalyse microbienne a été perçue comme une possibilité de réaliser des cathodes microbiennes (Bergel et al., 2005 ; Clauwaert et al., 2007 et Debuy,2015)

P. aeruginosa est une bactérie aérobie et électro chimiquement active son T4P est connu pour être responsable de la fixation de la surface, de la motilité de contraction et de la formation de biofilm. (Liu et al ,2019)

Par exemple les médiateurs endogènes produits par *Pseudomonas aeruginosa* sont la pyocyanine et la phénazine. la pyocyanine est un pigment bleu-vert qui a été identifié comme le responsable de l'activité électrochimique de *P. aeruginosa* (Rabaey et al, 2004 ; Schaetzle et al, 2008) mais des analyses HPLC ont confirmé que *P. aeruginosa* produit simultanément les deux pigments en conditions aérobies. il a été démontré que la production des pigments augmente la puissance fournie par une pile microbienne mettant en jeu un biofilm de *P. Aeruginosa* à l'anode (Pocaznoi, 2012).

Les métaux fortement électro-Positifs, comme l'uranium et l'aluminium, sont facilement oxydés par ces sulfates acides ; classer les métaux selon leur pouvoir réducteur ; ainsi on a dans l'ordre décroissant : (Le Ber, 1964).

U >Al> Pe > Cu > Ni > Ag > Hg > Au

L'aluminium, métal très réducteur, est oxydé rapidement par les sulfates acides. L'oxydation conduit à la formation sur l'électrode d'une couche de sulfate d'aluminium. En oxydation, nous observons une passivation très nette que l'on peut attribuer à la formation, sur l'électrode, de la couche d'aluminium. le courant reste très faible : de l'ordre de 5 U A. (Le Ber, 1964).

III.3.2.Isolement des bactéries anaérobies et réalisation des réacteurs biopile :

Les résultats suivants montrent les données des voltages enregistrés au niveau des biopiles anaérobies :

Tableau 3 : Mesure de voltage des deux biopiles anaérobies

Les biopile	SA BN anaérobie	SB BN salé anaérobie
Les valeurs maximales	0 mv	50,2 mv

SB: SEBKHA DE AIN BEIDA **SA :** sol (Université)

Sur la base des résultats obtenus on remarque que les bactéries halophiles anaérobies d'échantillon SB enregistrent 50.2mVde voltage mais les bactéries de l'échantillon SA ne donnaient aucune valeur de voltage , c'est-à-dire que sa valeur était nulle.

-De là, nous concluons d'après les deux expériences d'aérobiose et d'anaérobiose que les bactéries halophiles aérobies de l'échantillon SB ont un pouvoir électroactif le plus puissant.

Selon (Lin et al, (2004) ; Erable and Bergel, (2009) ; Pocaznoi,2012) les micro-organismes électro actives sont souvent décrits comme des micro-organismes anaérobies stricts. Ils sont souvent très sensibles à la présence d'oxygène même sous forme de traces. seuls quelques papiers font état de biofilms électro actives aéro-tolérants mais souvent dans des proportions d'oxygène relativement modérées.

Les identifications des micro-organismes composant les biofilms électroactifs du Terreau ont été réalisées à partir d'un biofilm développé dans les conditions optimales. les résultats obtenus par culture en conditions aérobies ont montré que 97% des isolats appartenaient au groupe des Gammaprotéobactéries. deux genres étaient majoritairement représentés : *Pseudomonas* (61%) et *Enterobacter* (36%).ces deux genres ont également été identifiés dans les conditions anaérobies indiquant que les bactéries concernées sont anaérobies facultatives. (Parot, 2007).

III.3.3.Isolement et purification des bactéries électroactives

En tant que les bactéries halophiles aérobies de l'échantillon SB donnant la meilleure valeur de voltage par rapport les autres bactéries, six souches bactériennes distinctes sont isolée à partir des électrodes de pile précédente.

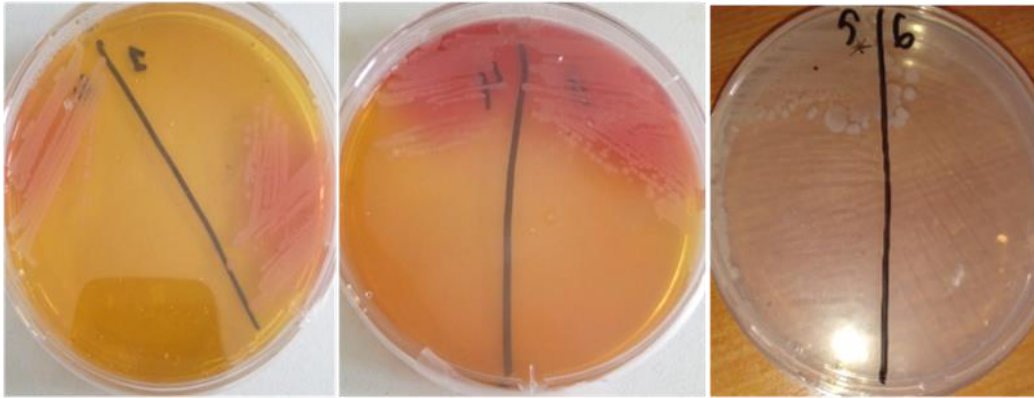


Photo 5 : six souches électroactives

Les bactéries qui se trouvent dans l'électrolyte rejoignent l'électrode pour se condense en amas adhérent que représente le biofilm électro actif (Kebaili ,2021).

La diversité microbienne permet une variété de mécanismes de transfert électronique, une plus grande adaptabilité aux combustibles et une plus grande stabilité des piles. (Reimers et al, 2001 ; Holmes et al ,2004 ; Parot et al ,2008, Salvin, 2012).

Semblable à la formation de biofilm non électrique, le développement d'EABS est un processus continu et hautement dynamique qui comprend les étapes de la fixation microbienne sur les surfaces ou les interfaces, la maturation du biofilm et la dispersion du biofilm (Hu et al, 2022).

La matrice EPS d'EABS est électriquement conducteur, qui est conférée par des composants de transfert d'électrons extracellulaires, y compris les cytochromes, les nanofils et les médiateurs électroniques (Hu et al, 2022).

Les bactéries electroactive permet la génération spontanée de signaux électriques sans avoir besoin de médiateurs chimiques supplémentaires (Kiran et al ,2019, Hu et al, 2022).

- L'analyse protéomique et les études électrochimiques ont révélé que la matrice contient des protéines actives redox (telles que MTRC et OMCA) et des flavines.
- La matrice de biofilm de *Geobacter* est très conductrice en raison de l'abondance des C-Cyts et des nanofils associés à la matrice qui sont proposés pour être des filaments polymérisés électriquement conducteurs IV ou OMCZ / OMCS(Thormann et al ,2004, Yalcin et al ,2020)

- Ils ont constaté que l'augmentation de la production de flavine stimulait la formation de biofilms de *S. oneidensis* sur les anodes.

III.4.Sélection:

Tableau 4 : Evolution du voltage des six souches

	Jour 1	Jour2	Jour 3	Jour 4	Jour 5	Jour 6
S1	20mv	5mv	4,8mv	3,6mv	4mv	4,1mv
S2	0,01mv	35,5mv	8mv	0,5mv	10mv	9mv
S3	9mv	599mv	243mv	530mv	514mv	403mv
S4	78mv	9mv	26mv	63mv	90mv	60 ,5mv
S5	0,01mv	32	1,7mv	31mv	41mv	9,6mv
S6	7mv	61	2,3mv	49mv	50mv	38mv

D'après le tableau 4 ; On remarque que les valeurs de voltage est différent dans les six biopiles note que la plus grande valeur enregistré par la souche S3 après 2jours d'incubation qui était de 599 mV, cependant dans les autres piles il y a une variation perturbée avec le temps dont les mesures varient entre 0.01mV et 90mV.

III.5.pré identification de souche

III.5.1.Aspect macroscopique

La souche isolée à partir de échantillon d'eau de sebkha Ain Beida, ont des colonies rondes à bord régulier et d'aspect lisse, opaques, pigmentées de rose / rouge sur milieu Chapman, et sur milieu GN les colonies apparus sans pigmentation.

III.5.2.Aspect microscopique : Les cellules bactériennes de cette souche sont des coques Gram positif groupée en paires, tétrade ou en grappe irrégulière.

Les bactéries « modèles » dont les mécanismes de transfert d'électrons sont les plus étudiés sont des bactéries à coloration de Gram négative telles que *Geobacter et Shewanella*. Or, quelques études ont également montré que les bactéries à coloration de Gram positive sont également capables d'échanger des électrons (Debuy, 2015).

III.5.3. Caractérisation biochimique

Le principe de l'identification biochimique est le même que celui de la méthode enzyme/substrat. Chaque tube contient un substrat différent avec lequel chaque enzyme bactérienne réagit.

Les résultats de l'identification biochimique de souche bactérienne obtenue à l'aide du catalogue analytique sont consignés dans le tableau 5.

Tableau 5 : Résultats des tests biochimiques

Test négatif : -

Test positif : +

tests	catalase	oxydase	GLU	Sac	Ara	Man	ONPG	Cit
souche	+	+	-	-	-	-	-	-

VP	H ₂ S	indol	Ldc	ADH	ODC	TDA	GEL
-	-	-	-	-	-	+	-

Grace aux tests biochimiques représentés dans le tableau 5, il est possible de connaître certaines caractéristiques du métabolisme de bactérie analysée.

La souche est catalase positive, ne produise pas le soufre ne dégrade pas le mannitol. De même, elle ne produise pas d'indole et H₂S ; les résultats des caractérisations morphologiques et biochimiques laissent apparaître que la souche isolée à partir de échantillon d'eau de sebkha Ain Beida se rapproche de genre bactérien *Micrococcus* (Leyral et Joffin, 2007).

La caractérisation phénotypique, bien qu'elle constitue une étape fondamentale et préliminaire, elle reste sommaire et imprécise aussi et afin d'attribuer des profils acceptables et fiables à la souche sélectionnée, une identification moléculaire s'avère indispensable et obligatoire.

Micrococcus est un genre appartenant à la famille des *Micrococcaceae*, décrit pour la première fois en 1872 par Cohn. (Stackebrandt et al, 1995) ce genre regroupe environ 17 espèces (*M. luteus*). les microcoques sont cultivés sous des températures optimales allant de 25

à 37°C et obligatoirement en conditions aérobies. ils poussent bien dans des environnements avec peu d'eau ou des concentrations élevées de sel (jusqu'à 05% NaCl)

Pour la première fois, *Micrococcus luteus*, une bactérie gram-positif, s'est révélée capable de catalyser la réduction électrochimique de l'oxygène sur une électrode de carbone. Une large gamme de bactéries aérobies et anaérobies facultatifs, y compris plusieurs bactéries Gram positives, présentait la même propriété électrochimique (Cournet et al, 2010).

III.6. Evaluation de l'effet de surface des électrodes et la biomasse sur le potentiel de pile :

Les courbes suivantes présentent l'évolution de biomasse et des potentiels de différentes piles bactériennes.

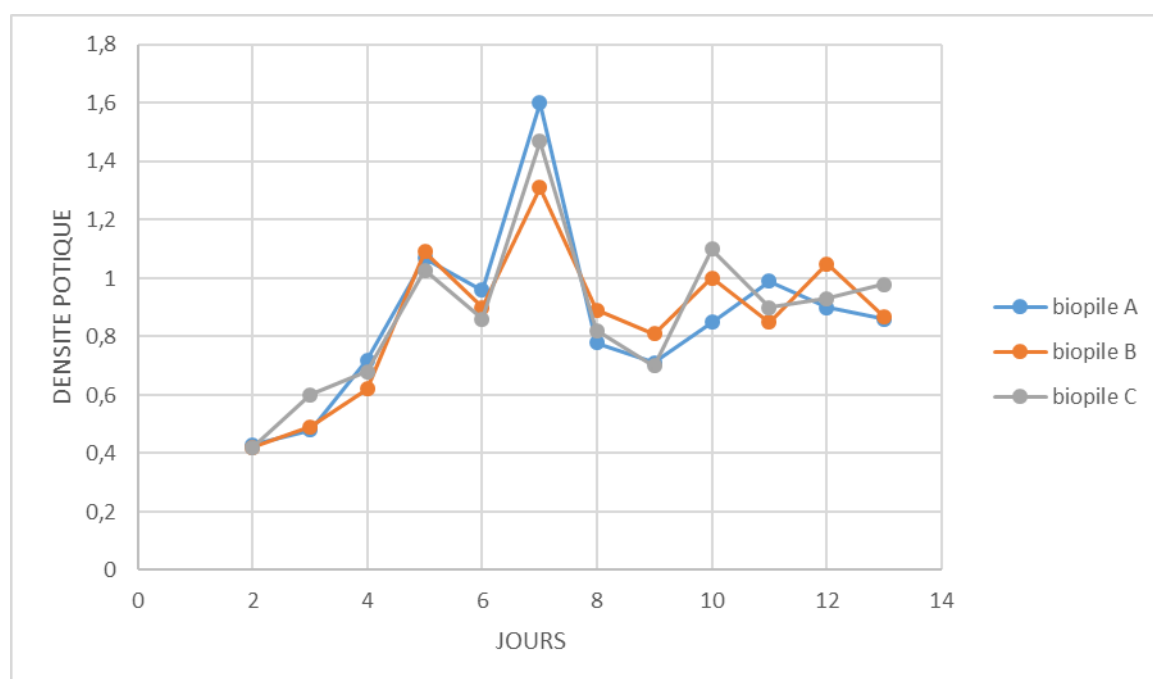


Figure 12 : Evolution de la biomasse bactérienne en fonction de temps dans les différents biopiles

Biopile A : surface d'électrodes 70 cm²

Biopile B : surface d'électrodes 35cm²

Biopile C : surface d'électrodes 16cm²

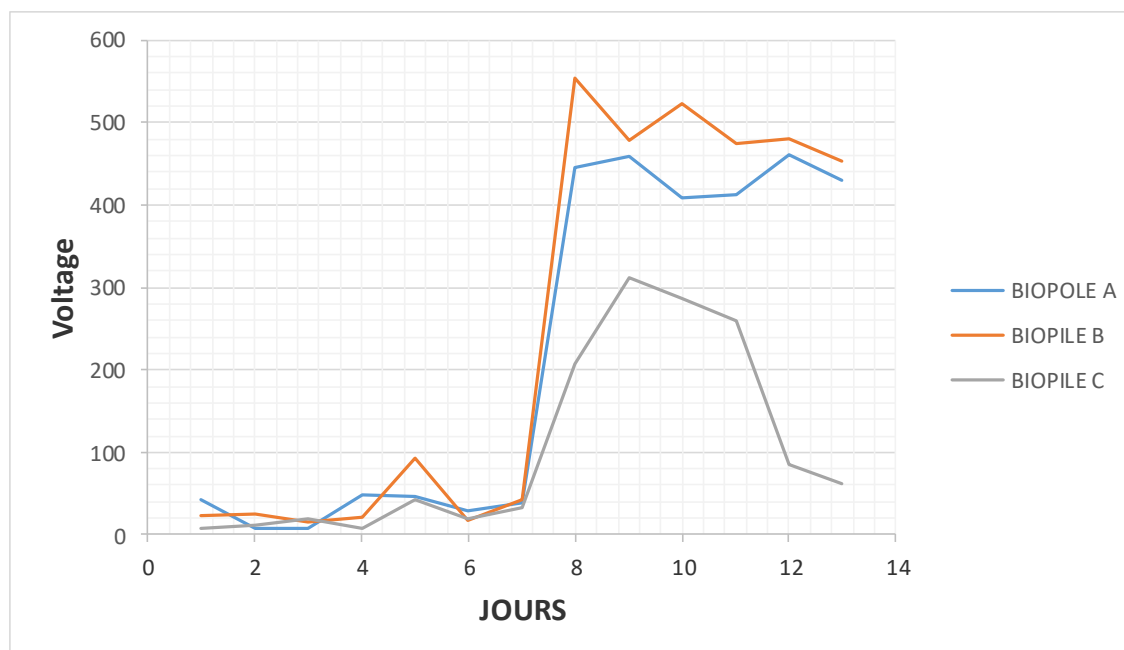


Figure 13 : Evolution de voltage en fonction de temps dans les différents biopiles

Biopile A : surface d'électrodes 70 cm²

Biopile B : surface d'électrodes 35cm²

Biopile C : surface d'électrodes 16cm²

Depuis le j1 de réalisation des biopiles la formation d'un biofilm sur les électrodes se déroule par étapes suivantes (Pocaznoi, 2012) où nous constatons que le voltage varie d'une biopile à d'autre avec des valeurs ne dépassant pas 50mV. Les biofilms électroactifs sont le résultat de l'adhésion sur les électrodes selon (Costerton et al, 1978) : l'attachement de quelques micro-organismes à la surface principalement par des liaisons non covalentes). puis se fixent de façon permanente en sécrétant des polymères extracellulaires qui jouent un rôle de « colle » (Geesey, 1982).

-Et à partir de j2 : après leur adhésion irréversible, les micro-organismes se divisent et forment des micro-colonies (Parsek and Greenberg, 2000). Les micro-colonies grandissent et forment ensuite des films continus (Suci et al., 1994). Jusqu'à le j7 Les biofilms continuent leur croissance en développant des structures tridimensionnelles complexes (Sauer et al., 2002) avec valeur maximale de densité optique égale : 1,6 et 1,31 et 1,47 chez biopiles A.B.C

respectivement. encore augmentation notable pour presque tous les trois biopiles avec valeur maximale chez la biopile B est :555 mV et par rapport à la courbe de densité optique très probablement Les biofilms continuent leur croissance, encore les bactéries ont la propriété de l'électro activité.

-De le j 7 à le j 8 il y a une diminution très forte de densité optique égale 0.78 chez biopile A on pense il y a : un vieillissement du biofilm ou certains stress, tels que des perturbations chimiques ou physiques, des carences en oxygène et/ou nutriments, les bactéries peuvent se détacher du biofilm. ces micro-organismes retournent à l'état planctonique (Sauer et *al*, 2002 ; Sauer et *al*, 2004).

-De le j8 à le j 13 il y a une perturbation des valeurs de densité optique même le voltage une fois augmentent et une fois diminuent mais ne dépasse pas 1,1 de densité et 523 mv de voltage . les valeurs de voltage et la densité sont presque stable, cette stabilité veut dire les bactéries sont en vieillissement selon (Sauer *et al*, 2002 ; Sauer et *al*, 2004).

A partir de la comparaison entre les deux courbes (densité et voltage), nous pensons que plus la biomasse augmente plus le voltage augmente. c'est à dire il y a une relation proportionnelle entre ces derniers.

D'après ces résultats, nous constatons que le voltage ne dépend pas à la surface d'électrode car la biopile A ne donne pas la plus grande valeur de voltage par rapport à sa grande surface ; c'est ce que a dit Rousseau (2013) : l'intensité du courant d'oxydation, sont souvent normées par rapport au volume réactionnel et non par rapport à la surface d'électrode.

Conclusion et perspectives

Ce travail de projet de master a été consacré à la recherche des bactéries électroactives autochtones de notre wilaya d'Ouargla et la réalisation d'une pile à combustible microbienne qui sert à produire de l'énergie et à traiter les milieux pollués.

Les bactéries halophiles aérobies isolés a partir de à sebkha tain Bida de Ouargla montrent leur importante électroactivité justifiés par la valeur maximale de voltage par ces souches environ 594 mV.

Les bactéries halophiles sont des organismes remarquables qui ont évolué des stratégies pour survivre à des concentrations salines élevées, l'intégration de bactéries halophiles dans les piles à combustible microbiennes est devenue particulièrement intéressante pour la production d'énergie renouvelable.

L'isolement des souches électroactives à partir des électrodes d'aluminium de biopile (SA) a révélé l'existence de six souches bactériennes, ces dernières ont testées séparément, une seule souche a montré une activité électrochimique importante avec une voltammétrie à potentiel de 599 mV . l'identification de cette souche a révélé leur affiliation au genre *Micrococcus*

Dans le deuxième contexte on a concentré l'étude sur l'isolat sélectionné pour avoir des informations sur leur pouvoir électroactifs ainsi l'effet de surface d'électrodes lors de culture, nous avons formé par cette souche des biopiles même conditions mais avec différent dimensions des électrodes.

La croissance de biofilms électroactifs de *Micrococcus* autant sur les deux électrodes était corrélé à la production de voltage mais l'intensité du voltage a souvent normée par rapport au volume réactionnel et non par rapport à la surface d'électrode.

Pour conclure, cette étude a permis de mettre en évidence la présence de microorganismes électroactifs halophiles, de mieux comprendre leur implication dans les cycles biogéochimiques ainsi que dans leurs relations trophiques. ces résultats ont également ouvert la réflexion sur le rôle hypothétique de l'électroactivité dans l'origine de la vie. d'autre part la capacité électroactive de ces microorganismes extrêmophiles, dans la production de molécules organiques à partir de voltage présente des potentialités intéressantes en biotechnologie.

Les recherches effectuées dans ce travail besoin d'autres expérimentations plus approfondies et les perspectives que nous proposons pour les faire progresser c'est :

- L'identification moléculaire de la souche électroactive sélectionnée
- Optimiser le dispositif de pile à combustible microbienne.
- Tester de nouvelles gammes de substrats
- Application de biopile pour la Bioremediation

Références bibliographiques

- Benghernit, M. Kameche, M. Zerhouni, F. Z. Krim, F. Z. Sahraoui, T. Innocent, C. (2022). The study of the performance of a biological fuel cell: A progress towards the improvement of low electrical bioenergy output by using an amplification system. *Biotechnology Letters*, 44(12), 1359-1378.
- Meddour, B. Rahmani, A. 2022. Biopiles microbienne à base de micro algues une application pertinente des énergies renouvelable (Doctoral dissertation, Université KASDI MERBAH OUARGLA).
- Obileke, K. Onyeaka, H. Meyer, E. L. Nwokolo, N. (2021). Microbial fuel cells, a renewable energy technology for bioelectricity generation: A mini-review, *Electrochemistry Communications*, 125, 107003.
- KEBAILI, H. 2021. Mise en évidence des propriétés électroactives des microorganismes terreux : applications aux piles à combustibles et conception d'une bioanode microbienne (Doctoral dissertation, Université MOHAMED BOUDAIF ORAN).
- HALIMI, H. KHALDI, S. (2018) Master en Biologie Moléculaire des Microorganismes : Élaboration d'une pile à combustible microbienne en utilisant les souches *Shewanella oneidensis* MR1 et *Exiguobacterium* sp, Université des Frères Mentouri Constantine
- Timoté, D. Mathilde, G. Zoé, L. Raphael, V. Abdul Aziz, J. (2018). Pile à combustible et applications. Rapport de projet de Physique P6 sujet 34(11 /06/2018) : Insa Rouen Normandie -Institut National Des Sciences Appliquées, 24p.
- Capitaine, A. 2017. Récupération d'énergie à partir de piles à combustible microbiennes benthiques (Doctoral dissertation, Université de Lyon).
- Smida, H. (2017). Modulation de l'interface entre biofilms microbiens électro actifs et surface d'électrode : modifications de surface et effets de milieux (Doctoral dissertation, Rennes 1).
- Champavert, J. (2016). Développement d'électrodes modifiées et d'un bioréacteur électrochimique à flux continu pour une application aux biopiles microbiennes (Doctoral Dissertation, Université Montpellier).
- Bedu, E. Golli, A. Quinio, P. Abdul Aziz, J. (2014). Pile à combustible et production de H₂ à partir d'un panneau solaire. Rapport de projet P6 sujet 39(26/05/2014) : Insa Rouen -Institut National Des Sciences Appliquées, 43p.

Références bibliographiques

- Lepage, G. (2012). caractérisation et optimisation d'une pile à combustible microbienne. Université de Grenoble. Français
- Mabrouk, W. (2012). Synthèse et caractérisation de nouvelles membranes protoniques : Applications en pile à combustible à membrane échangeuse de protons (Doctoral dissertation, Conservatoire national des arts et métiers-CNAM ; Université Tunis El Manar. Faculté des Sciences Mathématiques, Physiques et Naturelles de Tunis (Tunisie)
- Mayé, P. (2010). Générateurs électrochimiques : Piles, accumulateurs et piles à combustible. Duno
- Tou-Dallil, I. (2021). Etude des propriétés électroactives des biofilms biologiques : application à la génération de l'électricité (Doctoral dissertation, Université M'hamed Bougara Boumerdès : Faculté des sciences).
- Piard, J. (2018). Chimie générale expérimentale : tout pour réussir les TP aux concours. De Boeck Supérieur.
- Aminot, A. & Kérouel, R. (2004). Hydrologie des écosystèmes marins : paramètres et analyses .Editions Quae.
- Alotaibi, G. F., et Bukhari, M. A. (2021). Factors influencing bacterial biofilm formation and development. Am. J. Biomed. Sci. Res, 12(6), 617-626
- Tilahun, A ; Haddis, S ; Teshale, A ; & Hadush, T. (2016). Review on biofilm and microbial adhesion. Int J Microbiol Res, 7(3), 63-73.
- Kifouche, A. Bensaci, R. Bouderbala, I. 2023. Les microorganismes halophiles et leurs Potentiels Biotechnologiques. (Doctoral dissertation, Université des Frères Mentouri Constantine 1).
- Gaffney, E. M., Simoska, O., & Minter, S. D. (2021). The use of electroactive halophilic bacteria for improvements and advancements in environmental high saline biosensing. Biosensors, 11(2), 48.
- Pocaznoi, D. (2012). Optimisation d'anodes microbiennes à partir de lixiviat de sol pour la conception de piles à combustible microbiennes (Doctoral dissertation, Institut National Polytechnique de Toulouse-INPT).

Références bibliographiques

- Debuy, S. (2015). Développement de cathodes microbiennes catalysant la réduction du dioxygène (Doctoral dissertation).
- Liu, X., Wang, S., Xu, A., Zhang, L., Liu, H., & Ma, L. Z. (2019). Biological synthesis of high-conductive pili in aerobic bacterium *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied microbiology and biotechnology*, 103, 1535-1544.
- Le Ber, F. (1964). Electrochemical study in the molten sodium acid sulphate-potassium acid sulphate eutectic; Etude électrochimique dans l'eutectique fondu sulfate acide de sodium-sulfate acide de potassium.
- Parot, S. (2007). Biofilms électroactifs : formation, caractérisation et mécanismes (Doctoral dissertation).
- Salvin, P. (2012). Etude des biofilms électroactifs issus des milieux humides de la Guyane Française : application aux piles à combustible microbiennes (Doctoral dissertation, Antilles-Guyane).
- Hu, Y., Han, X., Shi, L., & Cao, B. (2022). Electrochemically active biofilm-enabled biosensors: Current status and opportunities for biofilm engineering. *Electrochimica Acta*, 428, 140917.
- Chapitre i bactéries sporulées gram positif .Université Frères Mentouri, Constantine 1)
- Stackebrandt, E., Koch, C., Gvozdiak, O., & Schumann, P. (1995). Taxonomic dissection of the genus *Micrococcus*: *Kocuria* gen. Nov., *Nesterenkonia* gen. Nov.
- Cournet, A., Délia, M. L., Bergel, A., Roques, C., & Bergé, M. (2010). Electrochemical reduction of oxygen catalyzed by a wide
- Berthomieu, R. (2021). Etude du mécanisme d'échange électronique chez *Clostridium pasteurianum*.
- Garbini, G. L., Barra Caracciolo, A., and Grenni, P. (2023). Electroactive Bacteria in Natural Ecosystems and Their Applications in Microbial Fuel Cells for Bioremediation: A Review. *Microorganisms*, 11(5), 1255.
- Yoo, Z ; Li, J ; Wang, Y ; Wu, D ; Li, F ;& Song, H. (2023). Advances in mechanisms and engineering of electroactive biofilms. *Biotechnology Advances*, 108170.

Références bibliographiques

- Ostormujof, L. M. (2023). Etude spatiotemporelle des biofilms électroactifs multi-espèces à l'échelle microscopique par une approche microfluidique et optique (Doctoral dissertation).
- Cao, Y ; Mu, H ; Liu, W ; Zhang, R ; Guo, J ; Xian, M ; et Liu, H. (2019). Electricigens in the anode of microbial fuel cells: pure cultures versus mixed communities. *Microbial cell factories*, 18(1), 1-14.
- Pierra, M. (2013). Couplage de la fermentation sombre et de l'électrolyse microbienne pour la production d'hydrogène : formation et maintenance du biofilm électroactif (Doctoral dissertation, Université Montpellier 2 (sciences et technique))
- Lovley, D. R, and Holmes, D.E. (2022). Electromicrobiology: the ecophysiology of phylogenetically diverse electroactive microorganisms. *Nature Reviews Microbiology*, 20(1), 5-19.
- Beal, J., Farny, N.G., Haddock-Angelli, T. et al. (2020). Robust estimation of bacterial cell count from optical density. *Commun Biol* 3, 512

Annexes

Annexes 1

Les composants des milieux:

Les composants de gélose nutritive:

- Extrait de viande : 1.0 g/L
- Extrait de levure: 2.5 g/L
- Peptone: 5.0 g/L
- Chlorure de sodium: 5.0 g/L
- Agar-agar: 15.0 g/L

pH= 7.0

Les composants de gélose Chapman:

- Peptone: 10 g/L
- Extrait de bœuf: 1g/L
- Chlorure de sodium: 75g/L
- D-mannitol: 10 g/L
- Rouge de phénol: 25 mg/L
- Agar: 15 g/L

Ajuster le pH à 7.4+₋ 0.2 à 25°C (après autoclavage).

Les composants de bouillon nutritive:

- Tryptone: 10.0 g/L
- Extrait de viande: 5.0 g/L
- Chlorure de sodium: 5.0 g/L

pH final à 25°C: 7.2+₋ 0.2

Annexe 2

Le principe de l'identification biochimique est le même que celui de la méthode enzyme/substrat, chaque tube contient un substrat différent avec lequel chaque enzyme bactérienne réagit.

1-ONPG : test de l'enzyme β -galactosidase par hydrolyse du substrat o-nitrophényl- β D-galactopyranoside

2- ADH : décarboxylation de l'acide aminé arginine par l'arginine dihydrolase

3-LDC : décarboxylations de l'acide aminé lysine par la lysine décarboxylase

4- ODC : décarboxylations de l'acide aminé ornithine par l'ornithine décarboxylase

5-Cit : utilisation du citrate comme seule source de carbone

6- H₂S : production de sulfure d'hydrogène

7-URE : test de l'enzyme uréase

8-TDA (Tryptophane désaminase) : détection de l'enzyme tryptophane désaminase : réactif à mettre – Chlorure ferrique.

9-IND : Test Indole – production d'indole à partir de tryptophane par l'enzyme tryptophanase, réactif – L'indole est détecté par l'ajout du réactif de Kovac.

10- VP : le test de Voges-Proskauer pour la détection de l'acétoïne (acétylméthylcarbinol) produite par fermentation du glucose par des bactéries utilisant la voie du butylène glycol

11-GEL : test de production de l'enzyme gélatinase qui liquéfie la gélatine

12-GLU : fermentation du glucose (sucre hexose)

13-MAN : fermentation du mannose (sucre hexose)

14-INO : fermentation de l'inositol (polyalcool cyclique)

15-SOR : fermentation du sorbitol (sucre d'alcool)

16-RHA : fermentation du rhamnose (sucre de méthyl pentose)

17-SAC : fermentation du saccharose (disaccharide)

18-MEL : fermentation du mélibiose (disaccharide)

19-AMY : fermentation de l'amygdaline (glycoside)

20-ARA : fermentation de l'arabinose (sucre pentose)

Annexe 3 : multimètre EMPTOP



Essai d'élaboration d'une biopile bactérienne

Résumé : La présente étude a pour objectif la réalisation d'une pile à combustible microbienne qui sert à produire de l'énergie et à traiter les milieux pollués.

Notre montage expérimental montre que les bactéries halophiles aérobies isolées à partir de sebkha tain Bida présentent un pouvoir électroactif important par l'utilisation d'électrodes d'aluminium dont le voltage enregistré produite par ces souches est estimé environ 594 mV.

Parmi les souches isolées, six ont été sélectionnées et testées séparément, le screening bactérien a révélé une faible capacité de la majorité de ces dernières à échanger les électrons. Cependant une seule souche a montré une activité électrochimique importante avec une voltammétrie à potentiel de 599mV. L'identification de cette souche a révélé leur affiliation au genre *Micrococcus*.

La croissance de biofilms électroactifs de *Micrococcus* autant sur les deux électrodes était corrélé à la production de voltage mais l'intensité du voltage souvent normée par rapport au volume réactionnel et non par rapport à la surface d'électrode.

Mots clés : pile microbienne ; biofilms électroactifs ; bactéries halophiles ; voltage ; *Micrococcus*.

Test to develop a bacterial biopile

Abstract: The objective of this study is to develop a microbial fuel cell that is used to produce energy and treat polluted environments.

Our experimental set-up shows that aerobic halophilic bacteria isolated from sebkhet tain Bida exhibit a significant electroactive power by the use of aluminum electrodes whose recorded voltage produced by these strains is estimated at about 594 mV.

Among the isolated strains, six were selected and tested separately, and bacterial screening revealed a low ability of the majority of these strains to exchange electrons. However, only one strain showed significant electrochemical activity with a potential voltammetry of 599mV. The identification of this strain revealed their affiliation to the genus *Micrococcus*.

The growth of *Micrococcus* electroactive biofilms on both electrodes was correlated with the production of voltage, but the intensity of the voltage often normalized in relation to the reaction volume and not in relation to the electrode surface.

Keywords: microbial battery; electroactive biofilms; halophilic bacteria; voltage; *Micrococcus*.

محاولة تصميم بطارية بكتيرية

الملخص: الهدف من هذه الدراسة هو تطوير خلية وقود ميكروبية تستخدم لإنتاج الطاقة ومعالجة البيئات الملوثة.

يظهر إعدادنا التجريبي أن البكتيريا الملحية الهوائية المعزولة من سبخة عين بيضاء تظهر قوة كهربائية كبيرة باستخدام أقطاب الألمنيوم التي يقدر التوتر الكهربائي المسجل الناتج عن هذه السلالات بحوالي 594 مللي فولت

من بين السلالات المعزولة، تم اختيار ستة واختبارها بشكل منفصل، وكشف الفحص البكتيري عن انخفاض قدرة غالبية هذه السلالات على تبادل الإلكترونات. كشف تحديد هذه السلالة عن انتمائها إلى جنس ميكروكوكس ومع ذلك، أظهرت سلالة واحدة فقط نشاطا كهروكيميائيا كبيرا مع قياس فولت ميتري يبلغ 599 مللي فولت مكورات دقيقة.

ارتبط نمو الأغشية الحيوية النشطة كهربائيا على كلا القطبين بإنتاج التيار الكهربائي، ولكن شدة التيار غالبا ما تكون طبيعية فيما يتعلق بحجم التفاعل وليس بالقطب.

الكلمات الدالة: البطارية الميكروبية. الأغشية الحيوية الكهربائية. البكتيريا الملحية. التوتر الكهربائي. المكورات الدقيقة