



HAL
open science

Développement et propriétés de biofilms électroactifs en conditions hydrodynamiques contrôlées

Florent Bouchon

► **To cite this version:**

Florent Bouchon. Développement et propriétés de biofilms électroactifs en conditions hydrodynamiques contrôlées. Biotechnologies. Université Paris-Saclay, 2023. Français. NNT : 2023UP-ASB046 . tel-04263439

HAL Id: tel-04263439

<https://pastel.hal.science/tel-04263439v1>

Submitted on 28 Oct 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Développement et propriétés de biofilms électroactifs en conditions hydrodynamiques contrôlées

Development and properties of electroactive biofilms under controlled hydrodynamics

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n° d'accréditation 581, agriculture, alimentation, biologie,
environnement, santé (ABIES)

Spécialité de doctorat : Biotechnologies

Graduate School : Biosphera. Référent : AgroParisTech

Thèse préparée dans l'**UR Procédés biotechnologiques au Service de l'Environnement** (Université Paris-Saclay, INRAE), sous la direction de **Théodore BOUCHEZ**, ICPEF (HDR), la co-direction de **Alain BERGEL**, Directeur de recherche, le co-encadrement de **Yannick FAYOLLE**, Ingénieur de recherche et de **Ahlem FILALI**, Chargée de recherche

Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 20 septembre 2023, par

Florent BOUCHON

Composition du Jury

Membres du jury avec voix délibérative

Nicolas BERNET Directeur de recherche, INRAE (centre Occitanie-Montpellier)	Président
Wafa ACHOUAK Directrice de recherche, CNRS (Aix-Marseille Université)	Rapporteur & Examinatrice
Frédéric BARRIÈRE Maître de conférences (HDR), Université Rennes 1	Rapporteur & Examinateur
Romain BRIANDET Directeur de recherche, INRAE (Université Paris-Saclay)	Examinateur
Claire DUMAS Chargée de recherche, INRAE (centre Occitanie-Toulouse)	Examinatrice

Titre : Développement et propriétés de biofilms électroactifs en conditions hydrodynamiques contrôlées

Mots clés : Réacteur de Couette-Taylor électrochimique – Biofilm électroactif – Technologie électro-microbienne – Hydrodynamique contrôlée – Contrainte de cisaillement – Populations microbiennes

Résumé : Dans un contexte mondial de besoins énergétiques dans un cadre de ressources limitées, les technologies électro-microbiennes représentent une solution alternative et de plus en plus réaliste pour la valorisation des déchets organiques.

La limite principale à l'intégration de ces technologies au sein des usines de traitement et de valorisation des eaux résiduaires urbaines réside dans leur stabilité et fiabilité sur le long terme. En effet, les anodes microbiennes, capables de récupérer les électrons issus de l'oxydation de la matière organique, sont marquées par une décroissance de leurs performances au cours du temps dans les réacteurs opérés en continu. Cette chute des performances de ces systèmes est souvent associée aux évolutions des propriétés des biofilms électroactifs (structurales et fonctionnelles).

Le potentiel d'électrode et le contrôle de l'hydrodynamique ont été identifiés comme les deux leviers d'action principaux. Or, le rôle de l'hydrodynamique pour la gestion des biofilms électroactifs a été peu étudié et mérite d'être investigué au vu de son impact significatif sur les performances des biofilms non-électroactifs.

Un réacteur de Couette-Taylor électrochimique innovant a été conçu pour étudier l'effet de l'hydrodynamique sur les biofilms électroactifs. Le suivi bio-électrochimique couplant plusieurs techniques d'analyses a été mis en œuvre pour avancer dans la compréhension des interactions entre les paramètres électrochimiques, hydrodynamiques et biologiques au cours du temps. La conception de ce réacteur a été préalablement validée à l'aide d'un modèle abiotique. Pour ces conditions, des comportements électrochimiques reproductibles en fonction des différentes conditions hydrodynamiques ont été obtenus sur les vingt électrodes individualisées disponibles.

Des spécificités liées aux écoulements de Couette-Taylor (régimes à vortex) ont été identifiées et exprimées en fonction de nombres adimensionnels.

Le suivi électrochimique et la caractérisation des populations microbiennes et de leur activités dans les biofilms électroactifs mixtes développés à partir d'eaux usées réelles a permis d'évaluer les performances de chaque bio-anode sous potentiel imposé. Le développement jusqu'à la phase de maturation des biofilms électroactifs a conduit à des résultats très reproductibles (10 % de variabilité des performances électrochimiques) permettant de répondre aux limitations des systèmes d'étude actuels grâce à l'homogénéisation de la contrainte de cisaillement sur de grandes surfaces d'électrodes. Les potentiels d'électrode les plus bas (-300 mV/ECS) entraînent le développement des électrodes les plus efficaces mais ne permettent pas d'exploiter le maximum de leurs performances en électrolyse. Des compétitions pour les électrons ont été supposées entre l'électrode et certaines espèces microbiennes (sulfato-réductrices et méthanogènes) et semblent favorisées par des potentiels élevés (0 et 150 mV/ECS) et des contraintes de cisaillement faibles (≤ 130 mPa). Une compétition pour la niche écologique de *Geobacter* a été détectée avec *Trichloromonas* qui semble être un indicateur de plus faibles performances électroactives.

L'influence de l'augmentation de la contrainte hydrodynamique sur la maturation du biofilm a ensuite été étudiée en augmentant la contrainte de cisaillement par paliers de 8,3 mPa à 5 Pa. Cette dernière n'induit pas d'effet significatif sur la chute d'activité électrochimique observée au cours du temps. Cependant, l'augmentation des courants limites obtenus pour les contraintes de cisaillement les plus élevées (2,4 et 5 Pa) et la modification profonde de la composition des biofilms obtenus à 5 Pa révèlent un impact fort de l'hydrodynamique sur les biofilms électroactifs matures.

Title: Development and properties of electroactive biofilms under controlled hydrodynamics

Keywords : Electrochemical Couette-Taylor reactor – Electroactive biofilm – Microbial electrochemical technology – Controlled hydrodynamics – Long-term shear stress – Microbial populations

Abstract: In the global context of increasing energy demands and limited resources, microbial electrochemical technologies offer a viable solution for the recovery of organic waste. However, their integration into urban wastewater treatment and recovery plants is hindered by long-term stability and reliability challenges. Microbial anodes, responsible for electron recovery through organic matter oxidation, experience a decline in performance over time in continuously operated reactors, which is attributed to changes in the structural and functional properties of electroactive biofilms.

While electrode potential and hydrodynamics are recognized as key factors in these technologies, the role of hydrodynamics in managing electroactive biofilms has been understudied and warrants further investigation due to its significant impact on non-electroactive biofilms.

To address this gap, an innovative electrochemical Couette-Taylor reactor was developed to examine the influence of hydrodynamics on electroactive biofilms. Bio-electrochemical monitoring, employing various analytical techniques, was implemented to deepen our understanding of the interactions among electrochemical, hydrodynamic, and biological parameters over time. The reactor design was validated through abiotic experiments, demonstrating reproducible electrochemical behavior under different hydrodynamic conditions on twenty individualized electrodes. Specific characteristics associated with Couette-Taylor flows, such as vortex regimes, were identified and quantified using dimensionless numbers.

By employing electrochemical monitoring and characterizing microbial populations and their activities within mixed electroactive biofilms cultivated from real wastewater, the performance of each bio-anode was assessed under poised potentials. The development and maturation of electroactive biofilms yielded highly reproducible results, with a 10% variability in electrochemical performance. The homogenization of shear stress across large electrodes surfaces helped overcome the limitations of current systems. Notably, the most efficient electrodes were achieved at the lowest electrode potentials (-300 mV/ECS), although their full electrolysis potential remained untapped. Competition for electrons between the electrode and specific microbial species, such as sulfate-reducers and methanogens, seemed to be promoted by higher potentials (0 and 150 mV/ECS) and low shear stresses (≤ 130 mPa). Competition for *Geobacter's* ecological niche was observed with *Trichloromonas*, indicating lower electroactive performance.

The impact of increasing hydrodynamic stress on biofilm maturation was investigated by incrementally raising shear stress from 8.3 mPa to 5 Pa. Surprisingly, this parameter had no significant effect on the observed decline in electrochemical activity over time. However, higher shear stresses (2.4 and 5 Pa) resulted in increased limiting currents, and significant changes in biofilm composition were observed at 5 Pa, highlighting the strong influence of hydrodynamics on mature electroactive biofilms.

Membre du jury invité

Christophe Lasseur - PhD - Project Manager at European Space Agency, Noordwijk, Netherlands

Laboratoire

INRAE (Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement)

UR 1461 - PROSE (PRocédés biOtechnologiques au Service de l'Environnement)

1, rue Pierre-Gilles de Gennes CS 10030, 92761 Antony Cedex, France

Partenaires

Laboratoire de Génie Chimique, Université de Toulouse, CNRS, INP, UPS, Toulouse, France

SIAAP, Syndicat public de l'assainissement parisien, Paris, France

6TMIC, Solutions industrielles en ingénieries avancées, Castenet-Tolosan, France

Financement

ANR BIOTUBA (ANR-17-CE06-0015-01, 2018-2023)

DRRT Île-de-France

Remerciements

C'est ainsi et de la plus belle des manières que commence cette version définitive de mon manuscrit ; c'est aussi, avec un peu d'émotions, la façon d'y mettre un terme en y écrivant ces quelques mots, peut-être un peu moins scientifiques.

Je commencerais avec les plus belles découvertes effectuées durant cette thèse et qui me permettent d'écrire ces lignes. Il s'agit là de la multitude d'esprits, d'instantanés, de sourires et d'encouragements que - vous qui lisez ces lignes - avez pu m'offrir pour me permettre d'arriver au bout de cette aventure. Vous tous m'avez permis de grandir, scientifiquement et humainement. J'espère que ces quelques remerciements vous permettront de vous rendre compte que cette thèse n'aurait pas pu voir le jour sans votre participation à tous !

Dans un premier temps, ce manuscrit n'aurait pas pu être publié sans l'évaluation pertinente des différents membres constituant mon jury de thèse. Je remercie donc M. Nicolas Bernet, président du jury pour avoir su guider les discussions passionnantes lors de la soutenance de thèse ainsi que pour sa lecture minutieuse du manuscrit qui a révélé des questions intéressantes lors de l'oral. Je remercie aussi Mme. Wafa Achouak et M. Frédéric Barrière en tant que rapporteurs qui ont chacun pris sur leurs congés estivaux un temps précieux pour relire ces nombreuses pages et relever chaque imprécision ou élément de discussion se trouvant dans ces lignes. Leurs questions très pertinentes m'ont permis de noter des points d'intérêt qui seront utiles dans la poursuite de mes travaux ou de futurs projets ! M. Romain Briandet et Mme. Claire Dumas ont ainsi pu compléter, en tant qu'examineurs et grâce à leur lecture attentive du manuscrit, les questionnements des rapporteurs qui ont nourri la soutenance. En tant qu'invité, je remercie aussi M. Christophe Lasseur d'avoir traversé plusieurs frontières européennes pour venir assister à ma soutenance en apportant un éclairage original sur le sujet de thèse grâce à son expérience.

Deux membres du jury jouaient aussi un autre rôle, que je souhaitais souligner. En effet dans un premier temps, Théodore Bouchez a aussi été un directeur de thèse exemplaire. Malgré un agenda surchargé lié à la direction de l'unité PROSE où tu m'as accueilli, tu as toujours su trouver une disponibilité pour caler une réunion ou relire une « petite » partie de plusieurs dizaines de pages en urgence parce que la deadline était déjà dépassée d'une semaine. Tu as été d'un grand soutien et je te remercie infiniment. Enfin, le dernier membre du jury, Yannick Fayolle, a aussi joué le rôle d'un encadrant modèle ! N'oublions pas que sans toi, le projet de thèse n'aurait pas pu voir le jour puisque tu as réussi à donner naissance puis à coordonner BIOTUBA admirablement, malgré tous les soucis qu'il aura fallu affronter au fur et à mesure de l'avancement du projet. Et outre cette casquette, tu as aussi su être un encadrant drôle et toujours positif, qui m'a permis de m'épanouir au sein de l'unité, et qui a su me faire confiance en me donnant une grande autonomie dans l'exercice de ma recherche. En parallèle tu as toujours été calme et tempéré, capable de me canaliser quand je commençais à partir un peu trop loin (parfois aussi avec l'aide des autres encadrants). Enfin pour l'humain que tu as été, cela aura été un vrai plaisir de travailler à tes côtés, ce

pour quoi je ne pourrais jamais assez te remercier !

Mais pour un sujet de thèse aussi complexe, il me fallait bien le double d'encadrants d'exception pour réussir à en venir à bout ! En effet, Théodore a pu recevoir le soutien fort d'Alain Bergel à la co-direction de la thèse. Alain, ta sagesse et tes remarques « peut-être un peu stupides » ont toujours été les plus pertinentes et celles capables de résoudre la plupart de nos questionnements et problématiques. Je remercie aussi le meilleur élève que tu as été (n'en déplaise aux autres encadrants ;p) pour les corrections éclair que tu étais capable de me renvoyer quelques heures à peine après l'envoi d'un chapitre complet de thèse (qui pouvait parfois en demander une assez grande quantité, ce qui ne te faisais absolument pas peur). Je te remercie aussi pour ton honnêteté qui m'a permis d'avancer et de m'améliorer tout au long de mon parcours ! Et finalement, je souhaite remercier le dernier encadrant de cette équipe, qui a permis à ce travail de voir le jour, Ahlem Filali, qui avait aussi le rôle de voisine de bureau. Ainsi, c'était souvent l'une de mes premières interlocutrices quand j'avais la moindre question, puisque je n'avais qu'à passer la tête dans le couloir pour avoir une réponse ! Merci d'avoir été là tout au long de cette aventure, de m'avoir à chaque fois consacré des journées entières pour assurer une relecture minutieuse ou d'avoir réfléchi à des problèmes insolubles pendant des heures avec moi ! Je m'excuse finalement de ne pas avoir pu écrire ce fameux dernier chapitre de modélisation qui avait été mentionné dès le début du stage et qui nous a tenu en haleine jusqu'à la fin des expérimentations, après la fin de la troisième année de thèse, où l'on s'est dit que, finalement, c'était peut-être un peu trop tard, et qui nécessitera sûrement un autre thésard à temps complet !

Durant mes années de thèse, j'ai pu présenter l'avancée de mes travaux lors de mes différents comités de thèse où Renaud Escudié, Matthieu Etienne, Etienne Paul, et Cristian Tréléa ont pu juger les orientations de mon travail d'un regard extérieur. Je les remercie pour leur bienveillance et leurs conseils qui m'ont permis d'arriver à écrire ce manuscrit.

Cristian Tréléa faisait notamment le lien avec l'école doctorale ABIES au sein de laquelle je remercie particulièrement Pierre Larraufie pour son suivi administratif effectué tout au long de la thèse. Je remercie aussi ABIES dans le cadre de sa participation financière à l'université d'être coordonnée dans le cadre du projet MELISSA à laquelle j'ai eu la chance de participer grâce à l'invitation de Jean-Philippe Steyer.

Je remercie également les partenaires du projet BIOTUBA dans lequel s'inscrit ma thèse, que ce soit le LGC, 6TMIC et le SIAAP avec qui nous avons eu l'occasion d'échanger sur l'avancée du projet lors de plusieurs réunions.

Les expérimentations scientifiques de cette thèse n'auraient pas pu être menées sans les prélèvements effectués sur les sites de Carré de Réunion et d'Ollainville exploités respectivement par SUEZ et le syndicat de l'Orge qui m'ont autorisé à venir chaque semaine pendant près d'un an. A ce titre, je les remercie tous les deux.

Le réacteur expérimental de Couette-Taylor développé lors de cette thèse a vu le jour en partie grâce au travail des équipes de Christian Poulalion (auparavant STIM) que je remercie, qui ont fabriqué la plupart des différentes pièces détachées.

Je remercie Vlad Costache de la plateforme MIMA2 de Jouy en Josas et Fatou Toutie Ndoye de l'unité FRISE à Antony avec qui nous avons développé des protocoles de microscopie et de tomographie respectivement, qui n'ont pas pu être testés dans le cadre de cette thèse mais qui offrent des perspectives de travaux futures très intéressantes.

J'ai eu la chance de m'initier à l'enseignement en encadrant deux groupes projet de Centrale-Supélec aux côtés de Cristian Puentes grâce à Florence de Fouchécour qui m'a transmis l'opportunité, ce qui a été une belle rencontre. Ainsi qu'avec Sandra Ortega du côté de l'ESA, avec qui nous avons pu avoir des discussions très intéressantes autour de l'électrochimie microbienne.

Je remercie aussi Nouhaila Simouh d'avoir été une stagiaire exceptionnelle, toujours pleine d'énergie et avide d'apprendre sur un sujet très complexe. Cette expérience m'a donné goût à l'encadrement et j'espère avoir la chance de tomber sur d'autres étudiants aussi studieux qu'elle !

J'en viens finalement aux autres membres de l'unité PROSE au sein de laquelle j'ai pu évoluer durant ces quelques années. Mes premiers remerciements iront à Pierre Mauricrace sans qui ce beau pilote développé lors de cette thèse n'aurait certainement jamais vu le jour (et qui a été une source intarissable de conseils pratiques et de petits matériels), je remercie aussi Sylvain Moreau sur les phases de conception et Christian Duquennoi lors des phases encore antérieures de modélisation qui ont su m'apporter toute leur expérience dans ces domaines respectifs. Je remercie également Michel Laurent, Florence de Fouchécour et Valentin Larzillière pour leurs différentes participations aux collectes hebdomadaires. Finalement, je remercie aussi Chrystelle Bureau et Elodie Gittard pour leur implication dans le séquençage de mes échantillons. Grâce à toutes ces personnes, des résultats expérimentaux de qualité ont pu être présentés dans cette thèse. Je souhaitais aussi remercier Sophie Thibault pour son accompagnement lors des expérimentations sur l'extraction d'ADN/ARN et Anne Goubet avec qui nous avons tenté en vain, d'observer de jolis biofilms de *Geobacter*. Viennent à la suite tous les autres membres de l'unité PROSE, que ce soit Olivier pour son aide dans mes analyses statistiques, Eleftheria avec qui nous avons pu discuter électrochimie microbienne alors qu'elle arrivait juste au moment où j'entamais la phase finale de rédaction, Ariane qui m'a fait confiance avec Ahlem pour la co-animation du Journal Club du vendredi avec Marion, Catherine (et Véronique avant elle) pour leur soutiens administratif.

Sur un plan moins scientifique mais tout aussi nécessaire à la bonne conduite d'une thèse, merci aussi à tous les membres inconditionnels des activités du midi, notamment sportives comme au foot (quand assez de motivés), frisbee (toujours au moins 5 fois par semaine grâce à l'équipe hydro), volley (quand le terrain n'est pas une piscine), badminton (quand on

est pas assez pour un volley), ping-pong (quand le gymnase est inondé, cf. volley), babyfoot (avec pratique sérieuse au tournois inter-prosien organisé pour le joueur semi-pro « Jojo national »), pétanque (bien sûr que c'est un sport), plumfoot (merci Hoang, mais attention à la blessure). Merci à tous ceux que j'ai pu affronter ou avec qui j'ai pu jouer à un niveau universitaire (les Pauls et les Pierres, Alexis, Samy, Hoang, Timo, Olivier, Cyril, Léonard, Laurent, Shu-Chen, Vazken, Valérie, Cédric, Marion, Paola, Matthieu, Sylvain, Yannick, Mikel, Alban, Charles, François, Aaron, Guillaume...). Merci aussi à tous ceux, avec qui, blessé ou avec un peu moins de motivation pour transpirer, j'ai pu partager de nombreuses parties de jeux de société (notamment avec les nombreuses teams de stagiaires du Lavoisier que j'ai eu la chance de rencontrer). Durant ma thèse, j'ai aussi eu l'opportunité de développer une réelle passion pour MPG (et MPP avec son lot de déconvenues comme ce 0-1 face à la Tunisie à l'euro) grâce au trio infernal Sylvain – Matthieu – Yannick et leur flair inégalé pour dénicher des pépites. Finalement, je remercie aussi tous les collègues avec qui j'ai pu partager différents karaoké, barbecue, baby-bières ou juste bières aux Mamane, Sputnik, BHV et autres Loulou (mention spéciale pour Chrystelle, Cédric, Gaëlle et Véronique, moins cités parmi les sportifs).

Merci à toutes les personnes rencontrées lors des différentes conférences ou déplacement que j'ai eu la chance de faire pour présenter mes travaux, avec qui nous avons pu partager nos expériences et nos connaissances (notamment lors de l'ISMET et de l'université d'été organisée par MELISSA). J'ai gardé de très beaux souvenirs de tous ces moments partagés.

En dehors de l'IRSTEA puis de l'INRAE, j'ai aussi pu bénéficier du soutien de mes différents amis/colocs qui m'ont apporté beaucoup de réconfort et de soutien. Je pense notamment à la chill'loc (pour la partie antonienne) quasiment au complet pour assister à ma soutenance et à Capucine, Houssem, Cristina, Cécile et Jade (pour la coloc fresnoise). En grande partie grâce à vous, à toute l'énergie que vous étiez capables de m'apporter au quotidien, j'ai pu trouver la force de finir cette thèse ! Merci aussi à tous mes amis que j'ai pu me faire depuis Rennes jusqu'à Paris avec qui j'ai pu passer de longs moments à parler de mon sujet de thèse sous toutes ses formes et qui connaissent maintenant quasi toutes ses subtilités à force de m'écouter en parler et notamment à François qui a pu venir assister à la soutenance ! Merci aussi à la team Auvergne qui a fait le déplacement jusque dans cette ville immense qu'est Paris pour venir assister à ma soutenance ainsi qu'à tous les autres de la prépa qui n'ont pas pu venir mais qui ont constitué un vrai soutien durant toutes ces années. Je pense notamment à Camille, Paul, Guillaume, Marie. Finalement, merci à toi Maman, merci pour tout l'amour inconditionnel que tu as pu m'apporter et ton soutiens durant toutes ces années, qui me permet aujourd'hui de devenir enfin ce fameux docteur Bouchon !

SOMMAIRE

Sommaire

Sommaire	1
Liste de publications et communications	6
Liste des abréviations	10
Listes des tables	16
Liste des figures	18
Introduction générale	22
Chapitre 1 : Synthèse bibliographique	28
1. Synthèse bibliographique	31
1.1 Les systèmes électro-microbiens	31
1.1.1 Eléments constitutifs d'un système électro-microbien	32
1.1.2 Diversités des biofilms anodiques impliqués dans les systèmes électro-microbiens	37
1.1.3 Transferts d'électrons entre les microorganismes et l'électrode	41
1.1.4 Evolutions spatiale et temporelle des populations microbiennes au sein des biofilms électroactifs	45
1.2 Influences de l'électrode et de l'électrolyte sur les performances du système électro-microbien	51
1.2.1 Influence du potentiel d'électrode sur l'organisation fonctionnelle du biofilm électroactif	51
1.2.2 Influence de l'électrolyte sur les biofilms électroactifs	53
1.3 Conclusions : Vers un système à hydrodynamique contrôlée pour l'étude de biofilms électroactifs	74
1.3.1 Problématiques des systèmes actuels	74
1.3.2 Besoin d'un réacteur à hydrodynamique contrôlée pour l'étude de biofilms électroactifs à long terme	74
Problématique et objectifs de thèse	78
Chapitre 2 : Influence de l'hydrodynamique sur les réactions électrochimiques en réacteur de Couette-Taylor	82
2. First electrochemical Couette-Taylor reactor for studying the influence of transport phenomena on electrochemical kinetics	85
2.1 Introduction	86
2.2 Materials and Methods	89
2.2.1 Electrochemical Couette-Taylor Reactor (eCTR)	89
2.2.2 Solutions	91
2.2.3 Theoretical description	91
2.3 Results	95
2.3.1 Preliminary characterization of the reactor: Nernst layer thickness without rotation	95
2.3.2 Impact of hydrodynamics on the current produced by hexacyanoferrate (II) oxidation	96
2.3.3 Evolution of the diffusive layer thickness with hydrodynamics: evidencing the impact of wavy	

(WVF) and turbulent vortex flow (TVF)	100
2.4 Discussion	102
2.4.1 Flow characterization using micro-electrodes in CTR	102
2.4.2 Comparison between RCE and CTR with experimental and theoretical results from the literature	103
2.4.3 Characterization of coupled fluid dynamics and electrochemical modeling in Couette-Taylor vortex flows	105
2.5 Conclusion	106
<i>Chapitre 3 : Premier réacteur électrochimique de Couette-Taylor pour le développement d'un biofilm électroactif sous hydrodynamique contrôlée en eaux usées urbaines réelles</i>	
3. First microbial electrochemical Couette-Taylor reactor for biofilm development under controlled hydrodynamics in real urban wastewater	113
3.1 Introduction	114
3.2 Material and methods	116
3.2.1 Reactor and effluent	116
3.2.2 Electrochemical analysis	118
3.2.3 Microbial analysis	119
3.2.4 Principal component analysis (PCA)	119
3.3 Results and discussion	120
3.3.1 Effect of applied potential on electroactive biofilms under low shear stress	120
3.3.2 Characterization of the main microbial populations	125
3.3.3 Statistical coevolution of applied potential and microbial communities	130
3.4 Conclusion	135
<i>Chapitre 4 : Impact de l'évolution de la contrainte de cisaillement sur l'activité et la composition des biofilms électroactifs</i>	
4. Suivi long terme et en conditions hydrodynamiques contrôlées de biofilms anodiques alimentés à l'aide d'eaux usées	140
4.1 Introduction	140
4.2 Matériels et méthodes	141
4.2.1 Conditions opératoires appliquées	141
4.2.2 Analyse du fonctionnement du réacteur	144
4.2.3 Analyse statistique des données	146
4.3 Résultats	147
4.3.1 Description de la dynamique des conditions opératoires et des performances du réacteur sur la durée expérimentale totale (347 jours)	147
4.3.2 Evolution temporelle des propriétés physico-chimiques	148
4.3.3 Evolution temporelle de l'activité bio-électrochimique	154
4.3.4 Populations microbiennes présentes et actives	166
4.4 Discussions	173

4.4.1	Apport du réacteur de Couette-Taylor électrochimique et du contrôle de l'hydrodynamique à la répétabilité des bio-électrodes dans le cadre de suivi long-terme _____	173
4.4.2	Différences observées entre les courbes d'électrolyse et de voltammétrie _____	176
4.5	Conclusions et perspectives _____	181
	<i>Conclusion et perspectives</i> _____	184
	Conclusions _____	186
	Perspectives _____	188
	<i>Références bibliographiques</i> _____	192
	<i>Annexes</i> _____	212
	Influence de l'hydrodynamique sur les réactions électrochimiques en réacteur de Couette-Taylor _____	214
	Suivi long terme et en conditions hydrodynamique contrôlées de biofilms anodiques alimentés à l'aide d'eaux usées _____	222

Liste de publications et communications

PUBLIE

Bouchon F., Bergel A., Filali A., Bouchez T., Fayolle Y., 2023. First electrochemical Couette-Taylor reactor for studying the influence of transport phenomena on electrochemical kinetics (Chemical Engineering Science)

EN COURS DE PUBLICATION

First microbial electrochemical Couette-Taylor reactor for biofilm development under controlled hydrodynamics in real urban wastewater (Bioresource Technology)

EN PRÉPARATION

Impact of changing shear stress on mature electroactive biofilms activity and composition (Soumission prévue en 2024)

COMMUNICATION INTERNATIONALE (ORALE)

Bouchon F., Filali A., Bureau C., Bouchez T., Bergel A., Fayolle Y., 2022. Electroactive biofilm development under controlled hydrodynamic in a Couette-Taylor electrochemical reactor. 2022 MELiSSA Conference - 7th Edition

COMMUNICATION INTERNATIONALE (POSTER)

Bouchon F., Filali A., Bureau C., Bouchez T., Bergel A., Fayolle Y., 2022. Electroactive biofilm development under controlled hydrodynamic in a Couette-Taylor electrochemical reactor. ISMET8 - International Society for Microbial Electrochemistry and Technology - GLOBAL CONFERENCE

COMMUNICATIONS NATIONALES (ORALES)

Bouchon F., Filali A., Bureau C., Bouchez T., Bergel A., Fayolle Y., 2022. Performances de biofilms électroactifs pour l'abattement de la matière organique des eaux résiduaires en conditions hydrodynamiques contrôlées. Microbes 2022, 17th SFM National Conference.

Bouchon F., Filali A., Bureau C., Bouchez T., Bergel A., Fayolle Y., 2022. Performances de biofilms électroactifs pour l'abattement de la matière organique des eaux résiduaires en conditions hydrodynamiques contrôlées. 25ème édition des Journées Information Eaux

Liste des abréviations

Symboles latins	Français	Anglais	Unité
ACP/PCA	Analyse en composante principales	Principal component analysis	
ADN/DNA	Acide désoxyribonucléique	Deoxyribonucleic acid	
AR/RA	Abondance relative	Relative abundance	
ARN/RNA	Acide ribonucléique	Ribonucleic acid	
a_i	Activité de l'espèce i	Activity of species i	
B	Constante	Constant parameter	
b	Constante	Constant parameter	
C_i	Concentration de l'espèce i	Concentration of species i	mol.m ⁻³
CA	Chronoampérométrie	Chronoamperometry	
CEM/MEC	Cellule d'électrolyse microbienne	Microbial electrolysis cell	
CP/PC	Composante principale	Principal component	
CTR	Réacteur de Couette-Taylor	Couette-Taylor reactor	
CV	Voltampérométrie cyclique	Cyclic voltammetry	
CVar	Coefficient de variation	Coefficient of variation	%
D_i	Coefficient de diffusion de l'espèce i	Diffusive coefficient of species i	m ² .s ⁻¹
D_{turb}	Viscosité turbulente	Apparent eddy viscosity	m ² .s ⁻¹
DBO/BOD	Demande biologique en oxygène	Biological oxygen demand	gO ₂ .L ⁻¹
DCO/COD	Demande chimique en oxygène	Chemical oxygen demand	gO ₂ .L ⁻¹
E	Potentiel d'électrode	Electrode potential	V/référence
E^0	Potentiel redox standard	Redox standard potential	V/référence
E'_0	Potentiel d'équilibre thermodynamique	Thermodynamic equilibrium potential	V/référence
EC/CE	Efficacité coulombique	Coulombic efficiency	%
ECS/SCE	Electrode au calomel saturée	Saturated calomel electrode	
ESH/SHE	Electrode standard à hydrogène	Standard hydrogen electrode	
eCTR	Réacteur de Couette-Taylor électrochimique	Electrochemical Couette-Taylor reactor	
EPS	Substances polymériques extracellulaires	Extracellular polymeric substances	
F	Constante de Faraday	Faraday constant	C.mol ⁻¹

FISH	Hybridation <i>in situ</i> par fluorescence	Fluorescence <i>in situ</i> hybridization	
I	Courant	Current	A
I_0	Courant d'échange	Exchange current	A
I_L	Courant limite	Limiting current	A
j	Densité de courant	Current density	$A.m^{-2}$
j_a	Densité de courant attendue	Expected current density	$A.m^{-2}$
j_L	Densité de courant limite	Limiting current density	$A.m^{-2}$
j_m	Densité de courant moyenne	Mean current density	$A.m^{-2}$
K	Constante	Constant parameter	
K_L	Coefficient de transfert de masse convectif	Convective mass transfer coefficient	$m.s^{-1}$
L	Longueur caractéristique	Characteristic length	m
M	Largeur de l'électrode	Width of the electrode	m
M_i	Masse molaire de l'espèce i	Molar mass of species i	$g.mol^{-1}$
N	Densité de flux molaire	Molar flux density	$mol.s^{-1}.m^{-2}$
N_2	Diazote	Dinitrogen	
NC	Electrode non-connectée	Non-connected electrode	
n	Nombre de révolution par minute du cylindre interne	Number of revolutions per minute for the inner cylinder	RPM
n_e	Nombres d'électrons impliqués dans la réaction	Number of electrons involved in the reaction	
n_i	Nombre stœchiométrique de l'espèce i	Stoichiometric number of species i	
O_2	Dioxygène	Dioxygen	
OCP	Potentiel en circuit ouvert	Open circuit potential	
OTU	Unité taxonomique fonctionnelle	Operational taxonomic unit	
Ox	Composé oxydé	Oxidized species	
p	Exposant du taux de cisaillement	Exponent of the shear rate	
PCM/MFC	Pile microbienne à combustible	Microbial fuel cell	
PCR	Réaction de polymérase en chaîne	Polymerase chain reaction	
PVC	Polychlorure de Vinyle	Polyvinyl chloride	
Q_j	Débit journalier	Daily flow rate	$L.j^{-1}$
Q_{quot}	Quantité d'électricité journalière	Daily electric charge	$C.j^{-1}$

$Q_{\Delta t}$	Quantité d'électricité sur la période Δt	Electric charge on Δt	$C.s^{-1}$
R^2	Coefficient de détermination	Coefficient of determination	
R	Constante des gaz parfaits	Universal gas constant	$J.K^{-1}.mol^{-1}$
r	Distance depuis la surface du cylindre interne	Distance from the inner cylinder surface	m
RCE	Electrode à cylindre tournant	Rotating cylinder electrode	
R_e	Résistance de l'électrolyte	Electrolyte resistance	Ω
Re	Nombre de Reynolds	Reynolds number	
Red	Composé réduit	Reduced species	
R_{int}	Résistance interne	Internal resistance	Ω
R_i	Rayon du cylindre interne	Inner cylinder radius	m
R_o	Rayon du cylindre externe	Outer cylinder radius	m
RPM	Rotation par minute	Revolution per minute	
S	Surface caractéristique	Characteristic surface	m^2
Sc	Nombre de Schmidt	Schmidt number	
Sh	Nombre de Sherwood	Sherwood number	
T	Température	Temperature	K
VT/TVF	Vortex turbulent	Turbulent vortex flow	
Ta	Nombre de Taylor	Taylor number	
Ta_c	Nombre de Taylor critique	Taylor critical value	
U	Tension	Voltage	V
u	Vitesse du fluide	Flow velocity	$m.s^{-1}$
V_{rot}	Vitesse de rotation	Rotation Speed	RPM
VO/WVF	Vortex ondulés	Wavy vortex flow	
(x,y,z)	Coordonnées cartésiennes de l'espace	Cartesian coordinate system	

Symboles grecs	Français	Anglais	Unité
α	Exposant de la vitesse angulaire	Exponent of the angular velocity	
α_c	Coefficient de transfert de charges	Charge transfer factor	
Γ	Fonction gamma	Gamma function	
$\dot{\gamma}$	Taux de cisaillement	Shear rate	s^{-1}
ΔV	Intervalle en volt	Volt interval	$V.rot^{-1}$
δ_I, δ_{II}	Epaisseur de couche limite de diffusion	Diffusive layer thicknesses	m
δ_N	Epaisseur de couche de diffusion de Nernst	Nernst diffusion layer thickness	m
λ	Conductivité molaire ionique	Ionic molar conductivity	$S.m^2.mol^{-1}$
μ	Viscosité dynamique	Dynamic viscosity	Pa.s
ν	Viscosité cinématique	Cinematic viscosity	$m^2.s^{-1}$
ρ	Résistivité	Resistivity	$\Omega.m^{-1}$
σ	Vitesse de scan	Scan rate	$V.s^{-1}$
σ_e	Conductivité de l'électrolyte	Electrolyte conductivity	$S.m^{-1}$
σ_i	Ecart-type	Standard deviation	
τ	Contrainte de cisaillement	Shear stress	Pa
ω	Vitesse angulaire	Angular velocity	$rad.s^{-1}$
ω_c	Vitesse critique	Critical velocity	$rad.s^{-1}$

Listes des tables

Table 1-1 : Exemples de microorganismes électroactifs étudiés dans le cas des anodes microbiennes.	40
Table 1-2 : Exemples de différents réacteurs à hydrodynamique contrôlée utilisés pour l'étude de biofilms.....	57
Table 1-3 : Etat de l'art des études analysant le rôle de l'hydrodynamique sur les biofilms électroactifs.....	71
Table 2-1: Couette-Taylor flow regimes, and corresponding Ta , rotation speed equivalent boundaries and shear stress values	92
Table 2-2: Values of the experimental coefficient of the log correlation of the diffusive layer and the concentration of the electroactive species $\delta N = 10 - K T a - \alpha$	102
Table 2-3: Key parameters of the study	106
Table 4-1 : Caractéristiques des eaux usées alimentant le réacteur sur l'ensemble de la période de suivi (avant addition d'acétate).....	142
Table 4-2 : Conditions de cisaillement associées aux différentes phases de développement de biofilm au cours de la durée de l'essai	143
Table 4-3: Valeurs de DCO (mg.L^{-1}) en entrée (e) et en sortie (s), totale et soluble pour les jours de prélèvement de biofilm associés aux voltammétries cycliques.....	151
Table 4-4: Analyse qualitative des caractéristiques des particules contenues dans l'effluent en sortie du réacteur.....	153
Table 4-5: Variables explicatives prises en compte dans l'analyse multivariée.....	171
Table 4-6 : Valeurs de coefficients de variation (en %) associés aux densités de courants mesurées sur les chronoampérométrie (CA) et aux densités de courant limites observées sur les voltammétries cycliques (CV) pour chaque potentiel étudié.....	174

Liste des figures

Figure 1.1 : Représentation schématique d'un système électro-microbien comportant une bio-anode et une cathode abiotique (Pham et al., 2009).....	32
Figure 1.2 : Schéma d'un système à trois électrodes.....	36
Figure 1.3 : Diversité des microorganismes électroactifs A) exoélectrogènes et B) électro-trophiques (Logan et al., 2019).....	38
Figure 1.4 : Différents mécanismes de transfert d'électrons des microorganismes électroactifs dans le cas d'un biofilm anodique (Pham et al., 2009).....	42
Figure 1.5 : Mécanismes moléculaires membranaires du transfert direct d'électrons chez A) <i>Geobacter</i> et B) <i>Shewanella</i> (Kumar et al., 2017).	44
Figure 1.6 : Phénomènes électrochimiques révélés par l'allure des courbes intensité-potential.....	45
Figure 1.7 : Biofilms anodiques de <i>G. sulfurreducens</i> PCA.....	47
Figure 1.8 : Evolution de différentes caractéristiques de biofilms électroactifs développés à partir de schorre révélées par microscopie confocale.....	50
Figure 1.9 : Différents régimes d'écoulement de Couette-Taylor (Coufort, 2004).....	60
Figure 1.10 : Différents effets de l'hydrodynamique sur la structure d'un biofilm et son évolution. ..	62
Figure 1.11 : Schéma de l'organisation des canaux et des pores au sein du biofilm (Quan et al., 2022).	63
Figure 1.12 : Structure en champignon d'un biofilm (en gris) modélisée par Picioleanu et al., (1998).	64
Figure 1.13 : Comportement physique d'un biofilm en fonction de contraintes de cisaillement croissantes.....	65
Figure 1.14 : Schéma d'analyse de la littérature pour regrouper les études comparables à ce travail de thèse.	69
Figure 2.1: A) Diagram of electrochemical Couette-Taylor reactor and B) top view of the inner cylinder with the position of the electrodes.	90
Figure 2.2: Experimental relation between IL and the hexacyanoferrate (II) concentration without rotation of the inner cylinder.	95
Figure 2.3: Numerical processing of the CV records.	97
Figure 2.4: CVs recorded with various hexacyanoferrate (III/II) concentrations and various Taylor numbers.	99
Figure 2.5: A) Effect of the Taylor number on the IL value obtained on CV at various concentrations of hexacyanoferrate (II). B) Effect of the angular velocity on the diffusive layer thickness.	101
Figure 2.6: The Sherwood number (Sh) as a function of the Reynolds number (Re).....	105
Figure 3.1: Diagram of the experimental set-up.	118
Figure 3.2: Evolution of the current density during three months of CTR operation.	122

Figure 3.3: Cyclic voltammetry at different biofilm formation stage.....	125
Figure 3.4: Relative proportion of the 10 most abundant genera in the biofilm of the different electrodes, as viewed from A) 16S rDNA sequencing and B) 16S rRNA sequencing.	127
Figure 3.5: Graph of the microbial populations best described according to PC1 and PC2.	132
Figure 4.1: Evolution des paramètres du réacteur.....	148
Figure 4.2: Abattement journalier de la DCO totale (■) et soluble (■).....	150
Figure 4.3: Effluent de sortie du réacteur au sein de la bouteille tampon utilisée pour le prélèvement de solution.....	152
Figure 4.4: Evolution de la quantité d'électricité journalière (—) au cours du temps.	154
Figure 4.5: Evolution de la quantité d'électricité journalière moyenne pour chaque palier de contrainte de cisaillement.....	155
Figure 4.6: A) Quantité d'électricité journalière (—) et DCO _{totale} entrante (▲) des jours 78 à 347. B) Evolution de l'efficacité coulombique résultante (◆) (zoom sur 6%).	156
Figure 4.7: Evolution de la densité de courant au cours du temps, moyenne de trois triplicats pour chaque condition de potentiel imposé.	158
Figure 4.8: Evolution de la densité de courant au cours de la phase 2 – Palier de contrainte de cisaillement de 34 mPa.	159
Figure 4.9: Evolution de la densité de courant au cours de la phase 3 – Palier de contrainte de cisaillement de 130 mPa.	160
Figure 4.10 : Evolution de la densité de courant au cours des phases 4 et 5 – Palier de contrainte de cisaillement de 590 et 1200 Pa.	161
Figure 4.11 : Evolution de la densité de courant au cours des phases 6 et 7 – Palier de contrainte de cisaillement de 2,4 et 5 Pa.....	161
Figure 4.12 : Evolution de la densité de courant au cours de la phase 8 – Palier de contrainte de cisaillement de 8,3 mPa.....	162
Figure 4.13 : CV après prélèvements de biofilms des électrodes polarisées à — : -300 mV/ECS, — : -150 mV/ECS, — : 0 mV/ECS, — : 150 mV/ECS, — : OCP.	164
Figure 4.14 : Densités de courant moyennes entre 0,15 et 0,2 V/ECS	165
Figure 4.15 : Représentation des abondances relatives des dix genres bactériens les plus représentés	168
Figure 4.16 : Analyses en composantes principales des populations microbiennes obtenues des jours 77 à 313.....	172
Figure 4.17 : Distribution des densités de courant associées à chaque potentiel d'électrolyse, des jours 77 à 347.....	177
Figure 4.18 : Densités de courant attendues mesurées sur chaque voltammétrie au potentiel d'électrolyse en fonction des densités de courant moyennes mesurées par chronoampérométrie 24 heures avant le tracé des CV.	178

INTRODUCTION GENERALE

Les technologies électro-microbiennes constituent une alternative de plus en plus réaliste pour une intégration à moyen terme au sein des usines de traitement et de valorisation des eaux résiduaires urbaines, en remplacement des procédés conventionnels. En effet, celles-ci représentent un grand potentiel dans la récupération d'énergie contenue dans la matière organique en comparaison du traitement classique par boues activées. Néanmoins, la majorité des études actuelles sur les procédés électro-microbiens sont encore réalisées à l'échelle laboratoire sur des réacteurs de faible volume, et plusieurs limitations surviennent dans une optique de montée en échelle de ces technologies.

La principale limite évoquée en vue de leur implantation au sein des unités de traitement réside dans leur stabilité et fiabilité sur le long-terme, liée à la décroissance des performances des anodes microbiennes principalement (Martinez Ostormujof et al., 2023). A l'anode, où la réaction d'oxydation de la matière organique s'effectue, les densités de courant correspondantes deviennent relativement faibles avec le temps : des réductions allant de 20 à 90 % peuvent être constatées pour des opérations de réacteurs en continu. Ainsi, l'instabilité des densités de courants générés rend la technologie difficilement applicable à l'échelle industrielle et ce verrou doit être levé en priorité.

Cette chute des performances anodiques pour les systèmes alimentés en matrices réelles (eaux usées, bio-déchets) au cours du temps est généralement attribuée à l'évolution des biofilms et de leurs caractéristiques physiques (épaisseur, structure, impact sur les phénomènes de transfert, ...) et/ou de leurs compositions (Kumar et al., 2017; Logan et al., 2019). Parmi les voies de gestion évoquées dans la littérature, on retrouve généralement le potentiel d'électrode (Sánchez et al., 2020). Cependant, peu d'études proposent de gérer les biofilms *via* le contrôle de l'hydrodynamique et la gestion des écoulements appliqués au niveau des surfaces des électrodes, stratégie pourtant couramment appliquée aux systèmes non-électroactifs (Krsmanovic et al., 2021). En effet, le cisaillement est capable de modifier significativement les performances de biofilm et son rôle spécifique sur les biofilms électroactifs mérite d'être investigué.

L'objectif de ce travail de thèse est donc d'étudier l'effet de l'hydrodynamique sur les biofilms électroactifs, *via* la réalisation d'expérimentations visant à caractériser l'effet de contraintes hydrodynamiques sur les interactions microbiennes au sein des biofilms électroactifs et leurs performances sur le temps long (347 jours). Cette étude expérimentale s'est notamment reposée sur l'opération d'un réacteur de Couette-Taylor électrochimique innovant, développé spécifiquement pour cet objectif. De nouvelles méthodes dans le suivi des procédés bio-électrochimiques couplant plusieurs techniques d'analyses ont ainsi pu être développées pour identifier les différentes interactions entre les paramètres électrochimiques, hydrodynamiques et biologiques au cours du temps.

Ce travail s'inscrit dans le cadre du projet ANR BIOTUBA (2018 – 2024, ANR-17-CE06-0015, financé par l'Agence Nationale de la Recherche). Ce projet rassemble quatre partenaires : le SIAAP, le LGC, 6TMIC et l'INRAE. Il vise à développer un procédé de tuba électromicrobien pour diminuer la consommation énergétique des usines de traitement des eaux résiduaires urbaines. Cette technologie repose sur la mise en court-circuit d'une anode microbienne, positionnée en zone anaérobie d'un procédé et sur laquelle est réalisée l'oxydation de la matière organique, avec une (bio-)cathode pour la réduction de l'oxygène dans une zone sur laquelle celui-ci est facilement accessible. L'application de cette technologie devrait permettre à terme de réaliser l'oxydation de la matière organique tout en limitant de façon drastique les besoins en aération forcée des procédés traitement, celle-ci pouvant représenter 40 % de la consommation énergétique globale d'une usine de traitement des eaux (Mueller et al., 2002). Cependant, la montée en échelle de ce procédé se trouve confrontée aux mêmes objectifs de fiabilisation du traitement, afin de satisfaire les contraintes réglementaires concernant les rejets des usines de traitement. L'apport de connaissances relatives à l'effet de l'application de contraintes hydrodynamiques sur l'activité et les propriétés des biofilms au niveau des zones anodiques du tuba électromicrobien s'avère donc nécessaire pour le développement de ce procédé.

Le manuscrit s'organise en quatre chapitres :

- Le Chapitre 1 propose une présentation du contexte et des objectifs de la thèse en s'appuyant sur une synthèse bibliographique. Celle-ci vise notamment à mettre en évidence les limites de la littérature sur les interactions entre les biofilms électroactifs et l'hydrodynamique dans les technologies électromicrobiennes ;
- Le Chapitre 2 introduit le réacteur de Taylor-Couette électrochimique développé spécifiquement dans le cadre de ce travail, intégrant 20 anodes individualisées. Un travail préalable de caractérisation et de validation de celui-ci a été réalisé en conditions abiotiques (en l'absence de biofilm et en solution modèle), dont les résultats seront présentés au sein de ce même chapitre.
- Les Chapitres 3 et 4 se concentrent sur la présentation des résultats issus du suivi sur une période de 347 jours du pilote alimenté en continu en eaux usées réelles, et pour différents potentiels appliqués au niveau des bio-anodes. L'analyse du fonctionnement du réacteur repose sur les données relatives (i) aux caractérisations électrochimiques (chronoampérométrie et voltammétrie cyclique) de chacune des bio-anodes, (ii) à l'analyse des populations microbiennes et de leur activité et (iii) aux propriétés physico-chimiques des influents et effluents.

Le Chapitre 3 se concentre sur la phase de développement et de maturation du biofilm pour une contrainte de cisaillement de 8,3 mPa sur une période de 77 jours.

Le Chapitre 4 se focalise sur l'évolution des réponses du biofilm suite à

l'application de paliers successifs de contraintes de cisaillement sur une période de 257 jours.

CHAPITRE 1 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Le sujet de thèse traité dans ce manuscrit se situe à l'interface de deux domaines de recherche que sont les technologies électro-microbiennes d'une part, et l'étude de l'influence de l'hydrodynamique sur le développement des biofilms d'autre part. Ce travail a pour objectif de faire le lien entre ces deux domaines en développant un nouveau dispositif expérimental permettant de mieux contrôler les conditions hydrodynamiques lors du développement de biofilms électroactifs. En effet ce sujet est encore assez peu exploré.

La littérature a été synthétisée dans un premier temps pour donner les éléments nécessaires à la compréhension des systèmes électro-microbiens. Chaque constituant de ces systèmes est donc présenté avec un focus particulier sur le biofilm électroactif. Le transfert extra-cellulaire d'électrons, qui est le mécanisme au cœur de l'activité de ces biofilms, est détaillé plus particulièrement. Cette propriété a été découverte chez certains microorganismes dans les années 2000. Elle est en réalité largement répandue dans le vivant et un état de l'art est présenté sur ces espèces électroactives et leurs relations au sein de biofilms. Dans une seconde partie, l'étude bibliographique s'oriente plus particulièrement sur les conditions opératoires des systèmes électro-microbiens et leur influence sur le développement des biofilms électroactifs. Deux paramètres ont été utilisés dans le cadre de ces travaux et sont particulièrement développés : (i) le potentiel d'électrode et (ii) les conditions hydrodynamiques. Finalement, il apparaît que les travaux traitant du rôle de l'hydrodynamique sur le développement et l'activité des biofilms électroactifs sont peu nombreux et ce qui justifie l'intérêt de mes travaux de thèse.

1. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1 LES SYSTEMES ELECTRO-MICROBIENS

Un système électro-microbien est constitué de micro-organismes, généralement organisés en biofilms, en interaction électrochimique avec une électrode ou surface conductrice (Lovley, 2012; Schröder et al., 2015). Les systèmes électro-microbiens sont donc composés d'électrodes microbiennes, c'est-à-dire d'électrodes colonisées par des microorganismes (bio-anodes et bio-cathodes). Elles peuvent être associées entre elles ou avec des électrodes abiotiques (Figure 1.1).

Les principaux éléments constituant un système électro-microbien sont représentés sur la Figure 1.1 et sont détaillés dans cette section. Chaque encadré de couleur représente les différents paramètres caractéristiques susceptibles d'affecter ses performances. Ces derniers seront présentés dans cette synthèse bibliographique, à savoir :

- Les paramètres liés à la nature de l'électrode (ici, une anode sera principalement considérée) seront évoqués dans la section 1.1.1 ;
- La partie catalyse microbienne sera développée en section 1.1.3 ;
- Enfin, les conditions opératoires feront l'objet de la section 1.2. Le rôle du potentiel d'électrode et les conditions hydrodynamiques du milieu sont les deux principales conditions opératoires étudiées et seront détaillées dans les sections 1.2.1 et 1.2.2, respectivement.

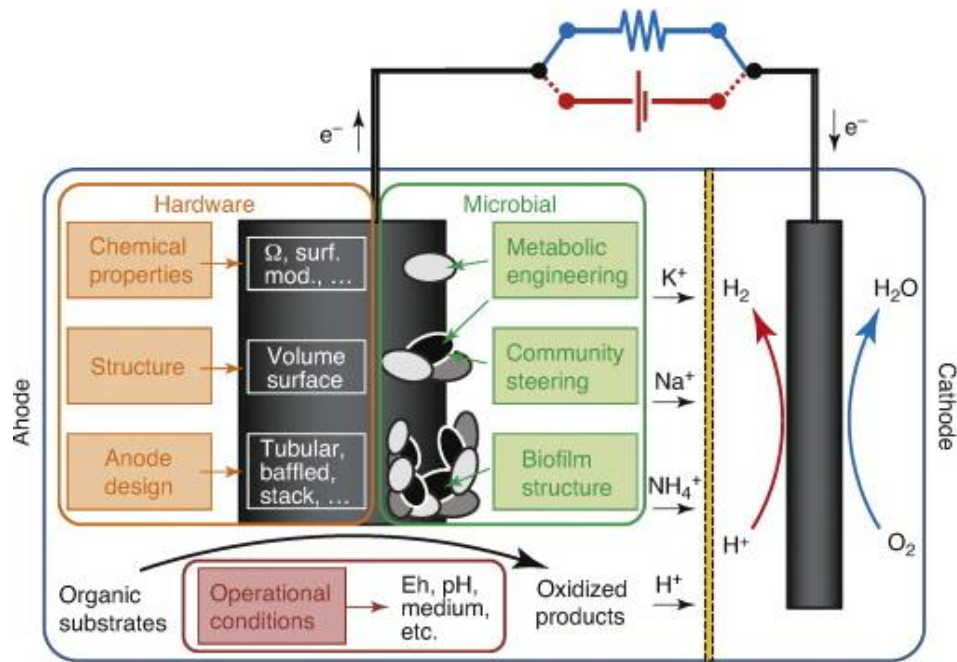


Figure 1.1 : Représentation schématique d'un système électro-microbien comportant une bio-anode et une cathode abiotique (Pham et al., 2009).

1.1.1 Éléments constitutifs d'un système électro-microbien

Une anode génère des électrons à partir de l'oxydation d'une espèce réduite, telle que la matière organique (Eq. (1.1)). L'anode microbienne est caractérisée par le développement d'un biofilm à la surface de l'électrode qui permet la catalyse des réactions d'oxydation :



Une cathode permet la réduction de composés en solution, c'est-à-dire, en termes empruntés au domaine de la biologie, qu'elle libère les électrons issus de l'anode vers un accepteur d'électrons en solution (Eq. (1.2)). Les cathodes microbiennes sont caractérisées par la colonisation d'un biofilm qui permet de catalyser ces réactions :

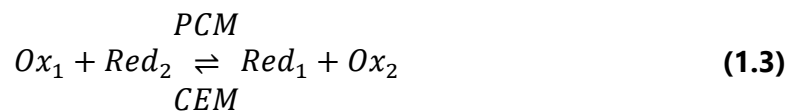


L'électrosynthèse est l'un des procédés principaux faisant intervenir des cathodes microbiennes. Elle permet d'obtenir des molécules d'intérêt comme du méthane ou de l'acétate grâce à la catalyse microbienne mais reste encore en voie de développement (Bian et al., 2020; PrévotEAU et al., 2020).

1.1.1.1 Connexion entre électrodes

Anode et cathode sont reliées électriquement de deux façons principales :

- *Via* une résistance dans le cas où la réaction d'oxydoréduction est thermodynamiquement favorable ce qui permet de convertir de l'énergie chimique en énergie électrique, notamment avec un accepteur d'électrons à haut potentiel redox comme représenté sur la Figure 1.1 avec l'oxygène à la cathode ($Ox_1 = O_2$ dans l'Eq. (1.3)). Il s'agit du fonctionnement en « pile à combustible microbienne » (PCM) (Santoro et al., 2017).
- *Via* un générateur, pour permettre de convertir de l'énergie électrique en énergie chimique comme dans le cas de la production d'hydrogène par réduction de l'eau représentée sur la Figure 1.1 ($Ox_1 = H_2O$ dans l'Eq. (1.3)). Il s'agit du fonctionnement dit de « cellule d'électrolyse microbienne » (CEM) (Raphaël Rousseau et al., 2020).



où Ox_1/Red_1 et Ox_2/Red_2 sont deux couples rédox distincts avec comme potentiels standards $E_{1/réf}^0 > E_{2/réf}^0$.

1.1.1.2 Electrolyte et grandeurs électrochimiques

Pour compléter le circuit, l'électrolyte joue un rôle de connexion ionique entre les deux électrodes. Il est composé notamment d'espèces chargées en solution permettant le transfert de charge par migration entre les électrodes, ce qui permet d'équilibrer le flux d'électrons du circuit électrique.

Dans le cas d'un système électro-microbien, l'électrolyte est directement au contact des biofilms et doit aussi apporter les nutriments nécessaires à sa croissance mais peut, en revanche, contenir d'éventuels inhibiteurs ou toxines (Mateo et al., 2018) ce qui peut complexifier l'étude de son influence.

L'électrolyte permet de définir une interface avec l'électrode sur laquelle se produit la réaction d'oxydoréduction. A cette interface, le potentiel de l'électrode s'exprime selon la loi de Nernst, il s'agit de l'une des trois grandeurs caractéristiques des systèmes électrochimiques :

$$E_{/réf} = E_{/réf}^0 + \frac{RT}{n_e F} \ln \prod_i a_i^{n_i} \quad (1.4)$$

où $E_{/réf}$ est le potentiel de l'électrode en présence du couple redox donné par rapport à une électrode de référence (V/réf), $E_{/réf}^0$ est le potentiel standard du couple redox par rapport à l'électrode de référence (V/réf), R la constante des gaz parfaits ($J.K^{-1}.mol^{-1}$), T la température (K), n_e le nombre algébrique d'électrons impliqué dans la réaction, F la constante de Faraday ($C.mol^{-1}$), a_i l'activité de l'espèce i , n_i le nombre stœchiométrique algébrique de l'espèce i .

Les paramètres physico-chimiques de l'électrolyte influent sur cette valeur de potentiel, notamment en ce qui concerne le pH, la température et les concentrations en espèces réactives dans le milieu (Figure 1.1). En effet, ces paramètres entrent en compte dans l'expression du potentiel de l'électrode à l'équilibre thermodynamique déterminé par la loi de Nernst (Eq. (1.4)) (Bard et al., 2022). Ils sont aussi connus pour influencer le développement du biofilm dans un système électro-microbien (Borole et al., 2011).

Le courant (ou la densité de courant, relative à la surface ou au volume étudié) peut être considérée comme la deuxième grandeur caractéristique d'un système électrochimique. Il représente le flux d'électrons à l'interface électrode/électrolyte et dépend du potentiel défini dans l'Eq. (1.4). Dans une cellule électrochimique abiotique, la cinétique de Butler-Volmer (Bard et al., 2022) permet de relier l'expression du courant à la valeur du potentiel d'électrode :

$$j = \frac{I}{S} = \frac{I_0}{S} \left(\exp \left[\frac{\alpha_c n_e F}{RT} (E - E'_0) \right] - \exp \left[\frac{(1 - \alpha_c) n_e F}{RT} (E - E'_0) \right] \right) \quad (1.5)$$

où j est la densité de courant ($A.m^{-2}$), I est le courant à l'interface (A), S la surface active de l'électrode, I_0 est le courant d'échange (A), α_c le coefficient de transfert de charges, E le potentiel de l'électrode en présence du couple redox (V) et E'_0 le potentiel d'équilibre thermodynamique au pH considéré (V).

Le rôle du biofilm électroactif est de catalyser le transfert d'électrons à l'électrode. La cinétique électro-microbienne est donc plus complexe qu'une cinétique abiotique et est représentée par plusieurs modèles de relation intensité/potentiel. Le plus commun est la cinétique de Butler-Volmer-Monod (Hamelers et al., 2011), qui permet d'exprimer le courant comme dépendant de la concentration et de l'affinité des microorganismes pour le substrat.

L'électrolyte se comporte aussi électriquement comme une résistance. Sa valeur est inversement proportionnelle à sa conductivité définie par la loi de Kohlrausch (Bard et al., 2022) :

$$\sigma_e = \frac{1}{\rho} = \frac{L}{R_e S} = \sum_i \lambda_i C_i \quad (1.6)$$

où σ_e est la conductivité de l'électrolyte ($S.m^{-1}$), ρ sa résistivité ($\Omega.m$), R_e sa résistance (Ω) en considérant la longueur L (m) et la section S (m^2), i les différents ions présents dans l'électrolyte, λ_i la conductivité molaire ionique de l'espèce i ($S.m^2.mol^{-1}$) et C_i sa concentration.

L'ensemble des éléments résistifs du système permettent de définir une résistance interne, étant la dernière grandeur caractéristique d'un système électrochimique. Dans le cas de systèmes électro-microbiens, le biofilm joue aussi un rôle de résistance (variable selon sa nature) à prendre en compte (ter Heijne et al., 2021).

La mesure de la tension U (V) d'une cellule électrochimique (Figure 1.2) sera alors réalisée en prenant en compte ces trois grandeurs et sera définie par :

$$U = E + R_{int}i \quad (1.7)$$

où E est la différence entre les potentiels de l'anode et de la cathode, R_{int} est la résistance interne (Ω) et $R_{int}i$ est la chute ohmique (V).

1.1.1.3 Électrode de référence

Il est possible de contrôler le potentiel d'une électrode en utilisant une référence dans un système à trois électrodes (Bard et al., 2022). Ces électrodes possèdent un potentiel fixe et connu qui n'évolue pas en fonction des réactions du système électrochimique. Il en existe trois principales : l'électrode standard à hydrogène théorique (ESH), fixée au potentiel de 0 V, l'électrode au calomel saturée, ECS (+0,24 V/ESH) et l'électrode au chlorure d'argent, Ag/AgCl (+0,22 V/ESH).

L'électrode de référence permet de contrôler le potentiel de l'électrode dite « de travail » *via* un potentiostat (Figure 1.2). Le circuit électrique est assuré entre l'électrode de travail et la troisième électrode appelée « contre-électrode ». L'électrode de référence n'intervient pas dans les flux d'électrons.

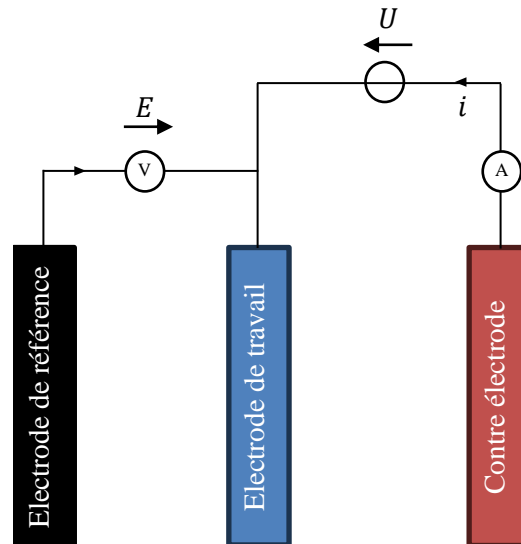


Figure 1.2 : Schéma d'un système à trois électrodes.

Le potentiostat permet de fixer le potentiel E de l'électrode de travail. La tension U est mesurée entre l'électrode de travail et la contre-électrode.

1.1.1.4 Membranes

Un séparateur peut être introduit pour limiter les échanges d'espèces au sein de l'électrolyte. Il s'agit souvent d'une membrane polymérique. Elle définit un compartiment anodique composé d'une anode dans un anolyte et le compartiment cathodique composé d'une cathode dans un catholyte. L'ajout de la membrane permet ne pas réduire des composés à la cathode venant d'être oxydés à l'anode et vice-versa (Ahmad and Ahmed, 2023; Luo et al., 2018). Elle doit permettre le passage de certains ions afin de maintenir une connexion ionique entre les deux compartiments tout en garantissant des conditions expérimentales différentes à l'anode et à la cathode (aérobie, pH, ...). En revanche, les membranes ont pour effet d'augmenter la chute ohmique des systèmes électrochimiques, en opposant une résistance plus ou moins importante au transfert des ions.

Les membranes présentent un fort intérêt dans le cas des applications biotiques, avec des communautés microbiennes à l'anode et à la cathode pouvant nécessiter des conditions opératoires différentes. Cependant, elles sont concernées par des phénomènes d'encrassement biologique au cours du temps qui peuvent introduire des augmentations de résistance au transfert de matière et donc limiter les performances du système (Koók et al., 2019). Des stratégies d'entretien, de nettoyage ou de renouvellement de membrane doivent alors être mises en place. Cependant, elles deviennent plus complexes à mettre en œuvre sur des systèmes à plus grande échelle et à long terme.

1.1.1.5 Nature des électrodes utilisées : surface active, structure et matériau

Plusieurs paramètres conditionnent les performances des électrodes. Leur taille, notamment, conditionne la surface d'échange avec l'électrolyte et est déterminante dans le calcul des densités de courant (Eq. (1.5)). Classiquement, plus la taille d'électrode est grande, plus le rendement des réactions est faible. Oliot et al. (2017) ont montré que l'augmentation de la taille d'électrode d'un facteur 5 conduisait à augmenter la chute ohmique et à obtenir une non-uniformité du potentiel local à la surface des électrodes. Ces hétérogénéités ont sensiblement réduit les performances des grandes électrodes testées (50 cm²).

Le volume d'électrolyte est tout aussi important, de même que le temps de rétention ou le mode d'alimentation (batch, continu, fed-batch,...). Des courants plus élevés sont généralement constatés lorsque le rapport surface d'électrode/volume d'électrolyte est grand. Penteado et al., (2018) ont montré qu'une multiplication par 5 de ce ratio conduisait à multiplier par 4 le courant obtenu. Cependant, en observant les densités de courant, le comportement inverse apparaît et de meilleures densités de courant sont obtenues pour de petites surfaces d'électrodes.

La structure des électrodes influence le rapport surface/volume ainsi que la conductivité du matériau, ce qui impacte directement la densité de courant obtenue (Heard and Lennox, 2020). Les électrodes à base de carbone sont principalement utilisées dans les applications microbiennes, grâce à leurs faibles coûts et leur absence de toxicité pour les microorganismes. Elles existent sous différentes formes comme en graphite, tissus de carbone, charbon actif, nanotubes de carbone ou graphène (Li et al., 2017). Ces différents matériaux permettent d'obtenir des propriétés de surface, de conductivité, des tenues mécaniques et des rapports surface/volume variés afin d'augmenter les densités de courant générées.

1.1.2 Diversités des biofilms anodiques impliqués dans les systèmes électro-microbiens

Il existe une grande diversité de microorganismes électroactifs, capables de transférer des électrons à une électrode (microorganismes dit exoélectrogènes) ou au contraire capables d'utiliser les électrons fournis par celle-ci (électro-trophiques). Certains de ces organismes, présentés en Figure 1.3, ont pu être obtenus en culture pures et ont été recensés par Logan et al., (2019). La diversité des espèces concernées est marquée par leur occurrence dans tous les règnes du vivant.

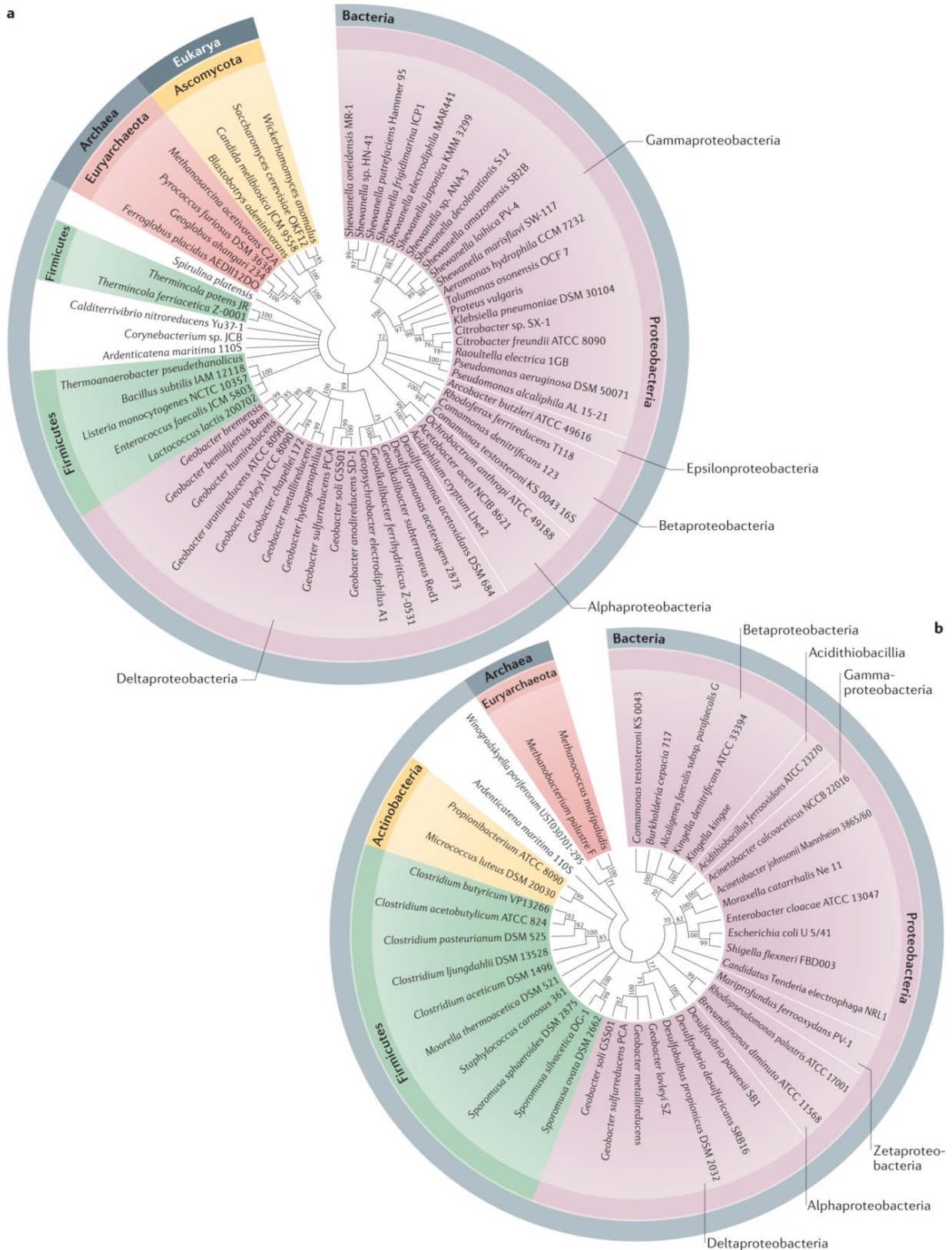


Figure 1.3 : Diversité des microorganismes électroactifs A) exoelectrogènes et B) électrotrophiques (Logan et al., 2019).

Les souches exoelectrogènes peuvent être responsables de plusieurs réactions d'oxydation, une liste non-exhaustive de celles-ci est présentée dans la Table 1-1. Elles sont la plupart du temps parmi les espèces les plus représentées au sein des biofilms

anodiques. Ces biofilms peuvent être développés à partir d'une souche pure ou d'un inoculum plus diversifié comportant des espèces connues ou non, et des bactéries non-électroactives. Les principaux inocula employés pour leur formation sont les boues activées, les sédiments et les eaux usées (Cao et al., 2019; de Fouchécour et al., 2022). Les biofilms électroactifs peuvent se former en monocouche ou sur plusieurs épaisseurs de bactéries, qui peuvent conduire au développement d'autres bactéries non-électroactives (Kiran and Patil, 2019).

Afin d'identifier les différentes populations microbiennes, le séquençage des ADN présents dans les échantillons peut être effectué. En caractérisant des régions hypervariables codant les ARN 16S notamment, les bactéries et les archées peuvent être regroupées selon leurs phyla, classes, ordres, familles, genres et espèces. Cette identification permet de quantifier les proportions des espèces microbiennes présentes dans un biofilm donné et de les associer à leurs fonctions usuelles pour déterminer leurs rôles et leurs interactions potentielles (Logan et al., 2019).

Des analyses complémentaires basées sur l'expression de leurs ARN, de leurs protéines ou de leurs métabolites peuvent être effectuées pour aller plus profondément dans la compréhension des mécanismes microbiens en œuvre au sein des biofilms (Henne et al., 2012; Wilhelm et al., 2014). Cependant, ces études n'ont pas été réalisées dans le cas des biofilms électroactifs et pourraient apporter des éléments de compréhension supplémentaires sur leurs performances.

Certains mécanismes comme le *quorum sensing* ne possèdent pas de protocoles d'études standardisés pour les biofilms (Li and Zhao, 2020; Miller and Bassler, 2001; Solano et al., 2014) et de futures avancées devront être nécessaires pour mieux les comprendre au sein des biofilms électroactifs (Cheng et al., 2022; Zhou et al., 2023).

Table 1-1 : Exemples de microorganismes électroactifs étudiés dans le cas des anodes microbiennes.

<i>Nom de la souche</i>	<i>Inoculum</i>	<i>Réaction catalysée</i>	<i>Référence</i>
Geobacter sulfurreducens	Culture pure	Oxydation de l'acétate	(Logan, 2009)
Geobacter metallireducens	Culture pure	Oxydation de l'acétate	(Logan, 2009)
Geobacter anodireducens	Culture pure	Oxydation de l'acétate	(Logan, 2009)
Geobacter sulfurreducens PCA	Culture pure	Oxydation du lactate	(Call and Logan, 2011)
Geothrix fermentans	Culture pure	Oxydation du propionate	(Bond and Lovley, 2005)
Paracoccus denitrificans PS-1	Souche isolée d'une PCM	Oxydation du formate	(Kiely et al., 2010)
Geoalkalibacter subterraneus	Culture pure	Oxydation de l'acétate	(Carmona-Martínez et al., 2013)
Shewanella oneidensis MR-1	Culture pure	Oxydation du lactate et pyruvate	(Ikeda et al., 2021)
Shewanella putrificiens	Culture pure	Oxydation du lactate	(Byung-Hong et al., 1999)
Shewanella loihica PV-4	Culture pure	Oxydation du lactate	(Jain et al., 2012)
Pseudomonas aeruginosa	Culture pure modifiée	Oxydation du glucose	(Rabaey et al., 2005)
Thermincola potens JR	Culture pure	Oxydation de l'acétate	(Costa et al., 2019)
Thermincola ferriacetica	Culture pure	Oxydation de l'acétate	(Parameswaran et al., 2013)
Rhodopseudomonas palustris DX-1	Souche isolée d'une PCM	Oxydation de l'acétate	(Xing et al., 2008)

1.1.3 Transferts d'électrons entre les microorganismes et l'électrode

1.1.3.1 Transfert direct et indirect d'électrons

Les microorganismes électroactifs jouent le rôle principal de catalyseurs des technologies électro-microbiennes grâce à leur capacité à transférer les électrons issus de leur métabolisme aux électrodes (Figure 1.4). Il existe deux mécanismes principaux (Choi and Sang, 2016) :

- Le transfert d'électrons direct (Figure 1.4) : il permet aux cellules électroactives de transférer les électrons issus de réactions d'oxydation directement par contact avec l'électrode (Figure 1.4, iii), et *via* des pili microbiens (Figure 1.4, iv) permettant d'assurer un contact électrique. Ils peuvent aussi faire intervenir d'autres composés conducteurs de la matrice du biofilm (Figure 1.4, iii').
- Le transfert indirect (Figure 1.4) : il fait intervenir des médiateurs redox (des composés facilement réductibles et oxydables) qui jouent le rôle de transporteurs d'électrons entre la cellule et l'électrode. Ces médiateurs sont sécrétés et utilisés par des microorganismes électroactifs la plupart du temps (Figure 1.4, ii) mais peuvent être utilisés par d'autres microorganismes planctoniques ou au sein du biofilm (Figure 1.4, i) afin de transmettre les électrons produits par leur métabolisme à une électrode. Ces médiateurs sont soumis aux phénomènes de transport de matière comme la diffusion et parfois la convection au sein du biofilm.

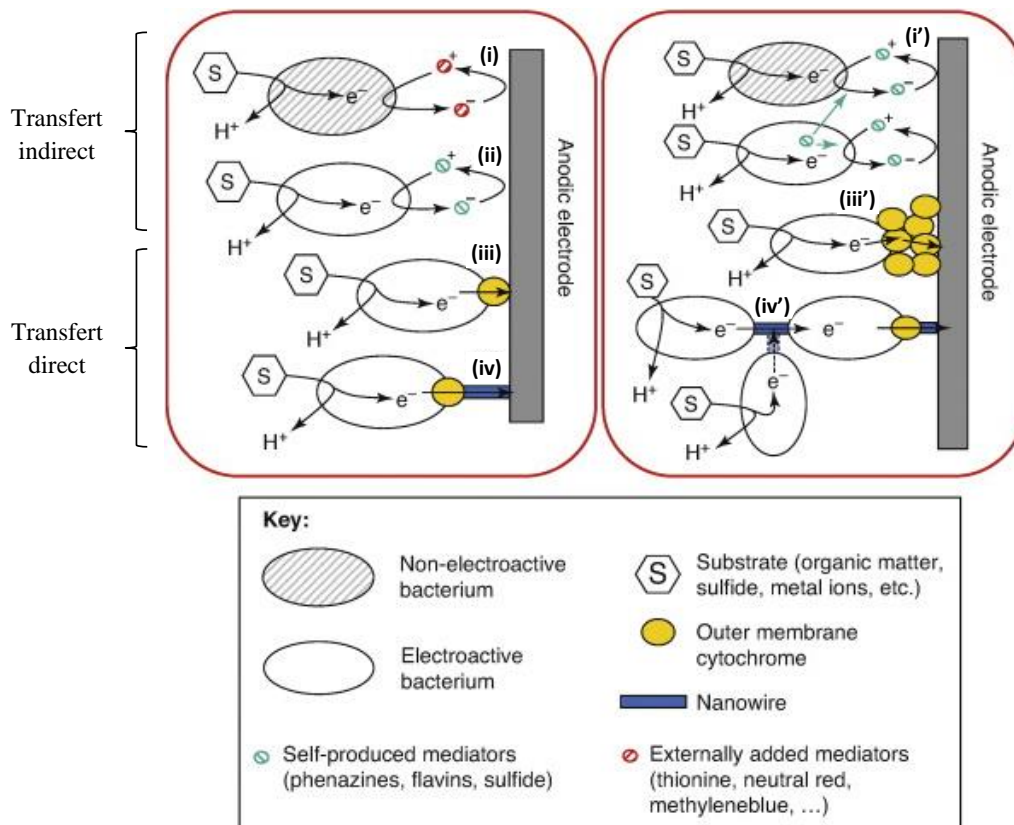


Figure 1.4 : Différents mécanismes de transfert d'électrons des microorganismes électroactifs dans le cas d'un biofilm anodique (Pham et al., 2009).

Dans les biofilms multi-espèces, une grande diversité de fonctions associées à l'oxydation de la matière organique peuvent émerger, et des espèces non-électroactives peuvent se développer. Par exemple, des méthanogènes, des fermentatrices, des sulfato-réductrices ou des nitrifiantes sont retrouvées dans différents biofilms électroactifs développés à partir d'inoculum complexes (dans des électro-fermenteurs, en électro-bio-remédiation ou pour les traitements électro-microbien des eaux usées). Or, leur métabolisme nécessite une source d'électrons et semble donc particulièrement compatible avec celui des microorganismes électroactifs exoélectrogènes capables d'en générer. Paquette et al., (2022) référencent des interactions spécifiques supposées entre ces différents microorganismes et les cellules électroactives telles que *Geobacter*. En effet, les interactions cellule-cellule n'ont pas été mises directement en évidence dans ces biofilms mais l'utilisation des médiateurs redox (Figure 1.4, i') ou le contact direct entre cellules (Figure 1.4, iv') ont déjà été identifiés chez les espèces microbiennes électroactives comme mécanisme pour la transmission d'électrons inter-espèces. Des molécules produites par les réactions d'oxydations des bactéries électroactives, tel que le dihydrogène, ont aussi été identifiées pour les méthanogènes comme source d'électrons. Cela permet donc d'envisager des interactions de type coopération ou syntrophiques entre ces populations. Néanmoins, les travaux de Paquette et al., (2022) sont encore récents et en

plein développement.

D'autres interactions pour l'optimisation de l'utilisation du substrat afin d'en récupérer le maximum d'énergie peuvent se mettre en place dans les biofilms multi-espèces, notamment au sein des biofilms électroactifs (Flayac et al., 2018). Dans ce cas, l'oxydation complète des composés organiques, comme celle du glucose par exemple, peut être permise ; ce qui n'aurait pas été possible dans un biofilm composé uniquement de *Geobacter*, qui est connue pour ne pas pouvoir l'oxyder directement (Sydow et al., 2014).

Enfin, les électrons peuvent ne pas être directement utilisés dans des réactions d'oxydoréduction ou transférés à l'électrode. Des phénomènes de stockage d'électrons chez certaines espèces peuvent aussi apparaître (notamment chez les sulfato-oxydantes) et jouer sur le comportement électroactif des biofilms (ter Heijne et al., 2021). Ce stockage d'électrons peut prendre deux formes majoritaires : les électrons sont convertis en substances polymériques ou sont utilisés pour former des composés cellulaires réduits, comme les cytochromes.

1.1.3.2 Mécanismes moléculaires de transferts d'électrons

Plusieurs microorganismes sont capables d'utiliser des médiateurs endogènes comme *Pseudomonas* (Pham et al., 2008) ou exogènes comme *Escherichia* (Ieropoulos et al., 2005), mais la capacité à transférer des électrons directement aux électrodes est plus rare et fait intervenir des mécanismes moléculaires plus complexes (Figure 1.5). Ils sont centrés autour de protéines disposant de structures de type hème permettant le transport d'électrons : les cytochromes de type c (Kumar et al., 2017).

Pour *Geobacter* (Figure 1.5A), les cytochromes de type c assurent le transfert extracellulaire d'électrons (Omc, OmcZ, OmcS). D'autres protéines multi-hèmes et impliquées dans la réduction des métaux (MtrA, MtrB et MtrC) jouent le rôle de transporteurs d'électrons chez *Shewanella* (Figure 1.5B). Elles peuvent être associées à des flavines qui servent de médiateurs redox (Coursolle et al., 2010). Le transport d'électron inter-membranaire dans une même cellule bactérienne fait intervenir des protéines du périplasma (PpcA, CymA). Les pili sont aussi responsables du transport direct des électrons depuis la membrane interne jusqu'à l'électrode et peuvent assurer le transport d'électrons sur de plus longues distances que celles couvertes par les cytochromes membranaires chez *Geobacter* (Lovley and Walker, 2019). Enfin, pour *Shewanella*, des excroissances membranaires permettent le transfert d'électrons à l'électrode grâce à des complexes multi-hèmes (MtrABC-OmcA) situés sur leur paroi.

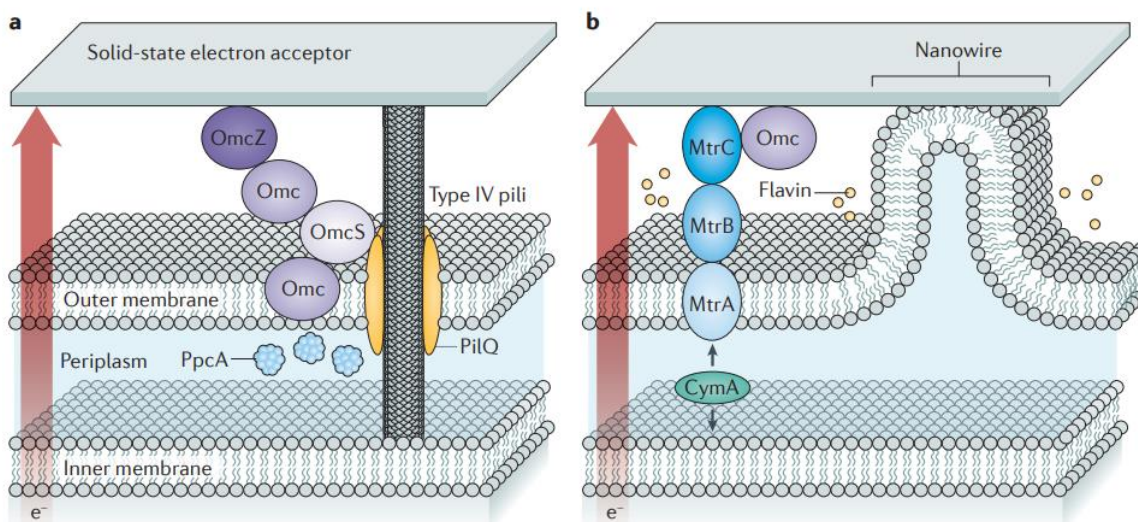


Figure 1.5 : Mécanismes moléculaires membranaires du transfert direct d'électrons chez A) *Geobacter* et B) *Shewanella* (Kumar et al., 2017).

1.1.3.3 Caractérisation macroscopique des transferts d'électrons

Les transferts d'électrons sont caractérisables *via* les courants mesurés aux électrodes. Les courbes intensité-potentiel, obtenues en faisant varier le potentiel de l'électrode de travail par rapport à une électrode de référence, permettent de décrire les différents phénomènes influençant les réactions électrochimiques (Figure 1.6). Cette méthode est plus connue sous le nom de voltampérométrie ou voltammétrie cyclique (CV). Les biofilms sont capables d'influencer chaque paramètre des courbes intensité-potentiel de façon plus ou moins intense en fonction des systèmes étudiés (Strycharz et al., 2011). Ils peuvent notamment augmenter la valeur des courants limites grâce à la catalyse de la réaction d'oxydation (Figure 1.6A), entraîner des phénomènes d'adsorption de molécules électroactives retenues dans la matrice du biofilm (Figure 1.6B), augmenter les phénomènes de limitation diffusionnelle (Figure 1.6C) et induire des comportements capacitifs en surface d'électrode *via* l'accumulation de charges dans certaines couches du biofilm dues à son organisation stratifiée (Figure 1.6D).

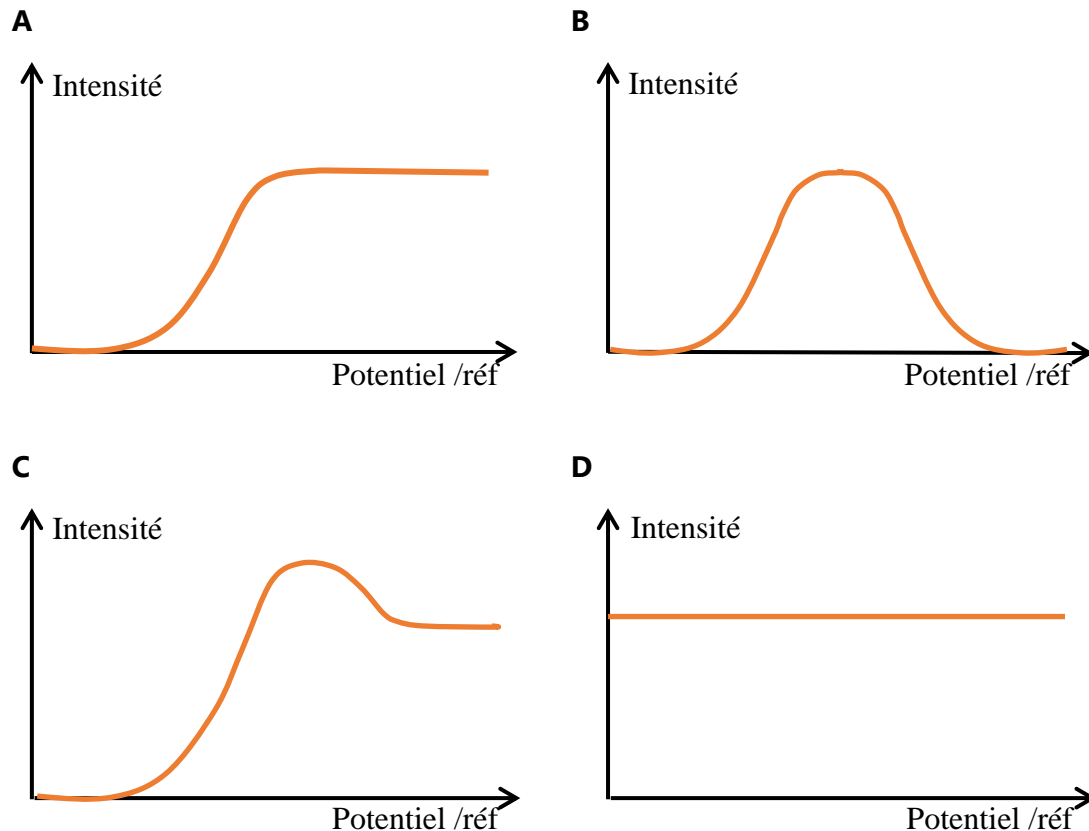


Figure 1.6 : Phénomènes électrochimiques révélés par l'allure des courbes intensité-potentiel.

Représentation de courbes d'oxydation avec des courants positifs. A) Courbe électrochimique stationnaire avec la valeur du plateau de courant limite (I_L) contrôlée par la concentration de réactifs. B) Phénomène d'adsorption de l'espèce réactive sur l'électrode. C) Vitesse de balayage des potentiels trop grande par rapport à la vitesse de diffusion du réactif. D) Courant capacitif.

1.1.4 Evolutions spatiale et temporelle des populations microbiennes au sein des biofilms électroactifs

L'organisation spatiale des biofilms électroactifs et leurs évolutions temporelles sont de plus en plus investiguées. Une recherche sur le portail d'information scientifique Web of Science couplant les aspects structuraux, l'électroactivité et les biofilms réfère plus de 50 publications par an depuis 2019 alors qu'il y en avait moins de 10 en moyenne jusqu'en 2010. Ces observations font intervenir des techniques d'imagerie (tomographie ou microscopie) qui permettent de localiser des espèces spécifiques d'un biofilm (par la technique d'hybridation fluorescente *in situ* « FISH ») ou d'identifier des caractéristiques particulières telle que la proportion de cellules viable/non-viable (test d'intégrité cellulaire « live/dead »).

Cette section 1.1.4 a pour but de résumer les différentes tendances observées dans la littérature concernant l'évolution structurale des biofilms électroactifs. Elle ne se veut

pas exhaustive en ce qui concerne les facteurs influençant l'organisation des biofilms électroactifs puisque le rôle du potentiel d'électrode et celui de l'hydrodynamique seront développés en section 1.2.

1.1.4.1 Organisation spatiale des biofilms électroactifs

Les biofilms électroactifs sont un cas particulier d'organisation de biofilms. En effet, contrairement aux biofilms classiques où le substrat (source d'énergie) et l'accepteur d'électron (souvent l'oxygène) proviennent de la phase liquide, dans le cas des biofilms électroactifs, seul le substrat est apporté par la phase liquide puisque le support (l'électrode) est celui qui joue le rôle d'accepteur d'électrons.

Un exemple d'observation du ratio de cellules actives et inactives dans un biofilm composé de la souche pure de *Geobacter sulfurreducens* PCA à différents stades de son développement en batch durant deux semaines en milieu synthétique est présenté en Figure 1.7 (mode d'agitation non-spécifié). Les différentes structures des tapis microbiens (Figure 1.7A et Figure 1.7B), et de celles dites « en champignons » (Figure 1.7C, Figure 1.7D, Figure 1.7E et Figure 1.7F) sont observées et rendent compte de la diversité des structures de biofilms électroactifs. Dans les phases d'adhésion et de croissance initiale, la répartition de cellules viables/non-viables reste relativement homogène alors que l'évolution dans le temps révèle une proportion grandissante de cellules non-viables dans les couches inférieures des biofilms. La mortalité cellulaire induite dans le temps par un accès plus réduit au substrat dans les couches internes (Renslow et al., 2013) semble rendre les microorganismes proches de l'électrode inactifs pour des écoulements laminaires en milieu synthétique. Il en résulte des activités électrochimiques plus faibles : moins de 50 % des courant initiaux sont enregistrés après l'apparition de cette mortalité cellulaire, comme renseigné par Martinez Ostormujof et al., (2023).

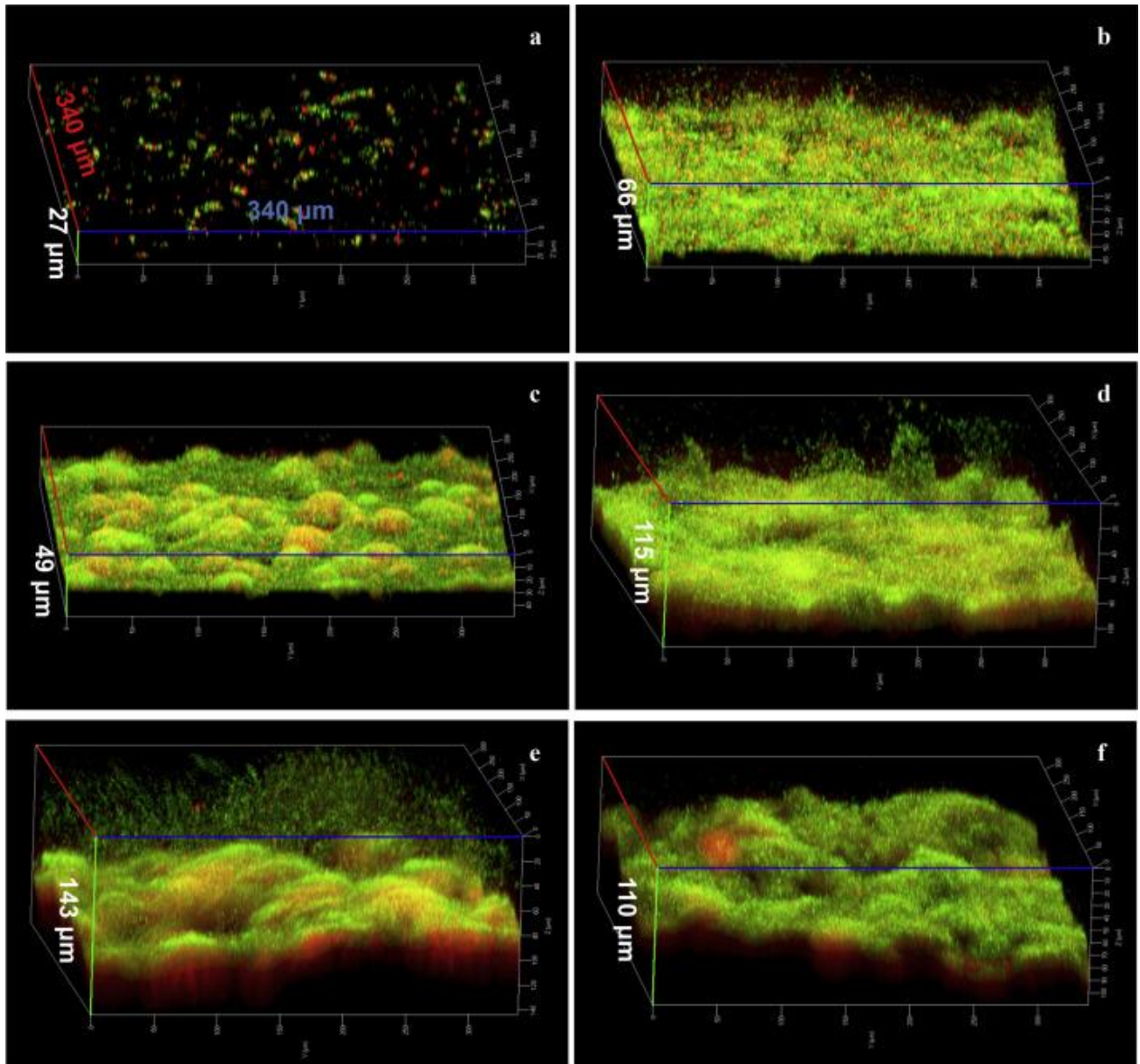


Figure 1.7 : Biofilms anodiques de *G. sulfurreducens* PCA

A) Dès qu'un courant de 0,1 mA est détecté, B) après 3 jours, C) 4 jours, D) 1 semaine, E) 2 semaines et F) 1 mois d'opération. Les biofilms ont été développés dans des réacteurs en batch avec une surface d'électrode de 4,5 cm² sous tension imposée de 0,7 V entre l'anode et la cathode (mode d'agitation non-spécifié). Les biofilms ont été colorés par test de viabilité « live/dead » et observés par microscopie confocale. Les cellules viables sont représentées en vert, et les cellules non-viables en rouge (Sun et al., 2016).

Des études dévoilent à l'inverse que les microorganismes électroactifs sont les plus actifs à l'interface avec l'électrode et non avec l'électrolyte. Schrott et al., (2014) montrent que dans des biofilms de *Geobacter* (développés durant 18 jours en batch en milieu synthétique) les microorganismes électroactifs favorisent le contact direct avec l'électrode pour le transfert d'électrons (mode d'agitation non-spécifié). A son contact, plus d'ARN sont produits qu'en surface, ce qui indique une meilleure activité

microbienne. Les couches supérieures du biofilm souffriraient de la limitation de leur respiration avec l'électrode à cause de la résistance induite au transfert d'électrons par la matrice du biofilm (Sun et al., 2016).

D'autres organisations ont été reportées dans le cas de biofilms développés à base de cultures mixtes. Yan et al., (2021) ont montré que les souches de *Geobacter* colonisent préférentiellement les couches internes du biofilm, proches de l'électrode, dans une PCM alimentée en eaux usées réelles supplémentés en acétate (mode d'agitation non-spécifié). D'autres microorganismes aérobies se développent alors dans les couches superficielles profitant de la présence d'oxygène dans la PCM comme *Arcobacter*. Il en résulte des proportions plus faibles de *Geobacter* dans les biofilms et de plus faibles performances électroactives. La composition spécifique des biofilms électroactifs semble donc déterminante pour analyser les performances des systèmes électro-microbiens.

1.1.4.2 Dynamique temporelle des populations microbiennes

L'étude de Martinez Ostormujof et al., (2023) présente la variation temporelle de biofilms électroactifs développés à partir d'inoculum multi-espèces de schorres sur près de deux mois d'opération. Un extrait des résultats concernant la composition des biofilms obtenus est présenté en Figure 1.8 (mode d'agitation non-spécifié). La chute des courants mesurés pour les stades III et IV (habituellement de l'ordre de 50%) est associée à des taux de croissance de biofilms plus faibles, à l'accumulation de cellules mortes et à l'augmentation de la sécrétion de substances polymériques extracellulaires (EPS), conduisant à l'obtention de biofilms plus denses.

La mort cellulaire des microorganismes électroactifs ou la diminution de leur activité entraîne logiquement une catalyse moins efficace. Schrott et al., (2014) montrent une perte d'activité de 70 % en terme d'expression de l'ARN entre 5 et 15 jours d'opération, liée à l'augmentation de la part de cellules mortes. Elle peut être couplée à des phénomènes d'augmentation de la résistance interne du biofilm dans le cas où ces organismes sont nécessaires dans le transfert d'électrons à l'électrode (Yang et al., 2019).

Le développement de microorganismes non-électroactifs, notamment aérobies et/ou capables d'utiliser des électrons issus de l'oxydation réalisée par les microorganismes électroactifs, a été associé par Yan et al., (2021) à des diminutions des performances des systèmes électro-microbiens multi-espèces. Ce développement apparaît plus souvent après des temps assez longs (plusieurs semaines) dans les biofilms mixtes et avec un substrat réel comme montré par Sleutels et al., (2011) dans une cellule électrochimique sous une alimentation continue.

Inversement, il a été démontré par Liu et al., (2015) que des biofilms multi-espèces étaient capables de générer des courants plus élevés en eaux usées synthétiques (mode d'agitation non-spécifié) qu'une souche pure de *Geobacter* (de près de 70 %). Ces résultats suggèrent un effet bénéfique des coopérations inter-espèces au sein d'un biofilm électroactif, mais qui n'a pas été expliqué dans cette étude.

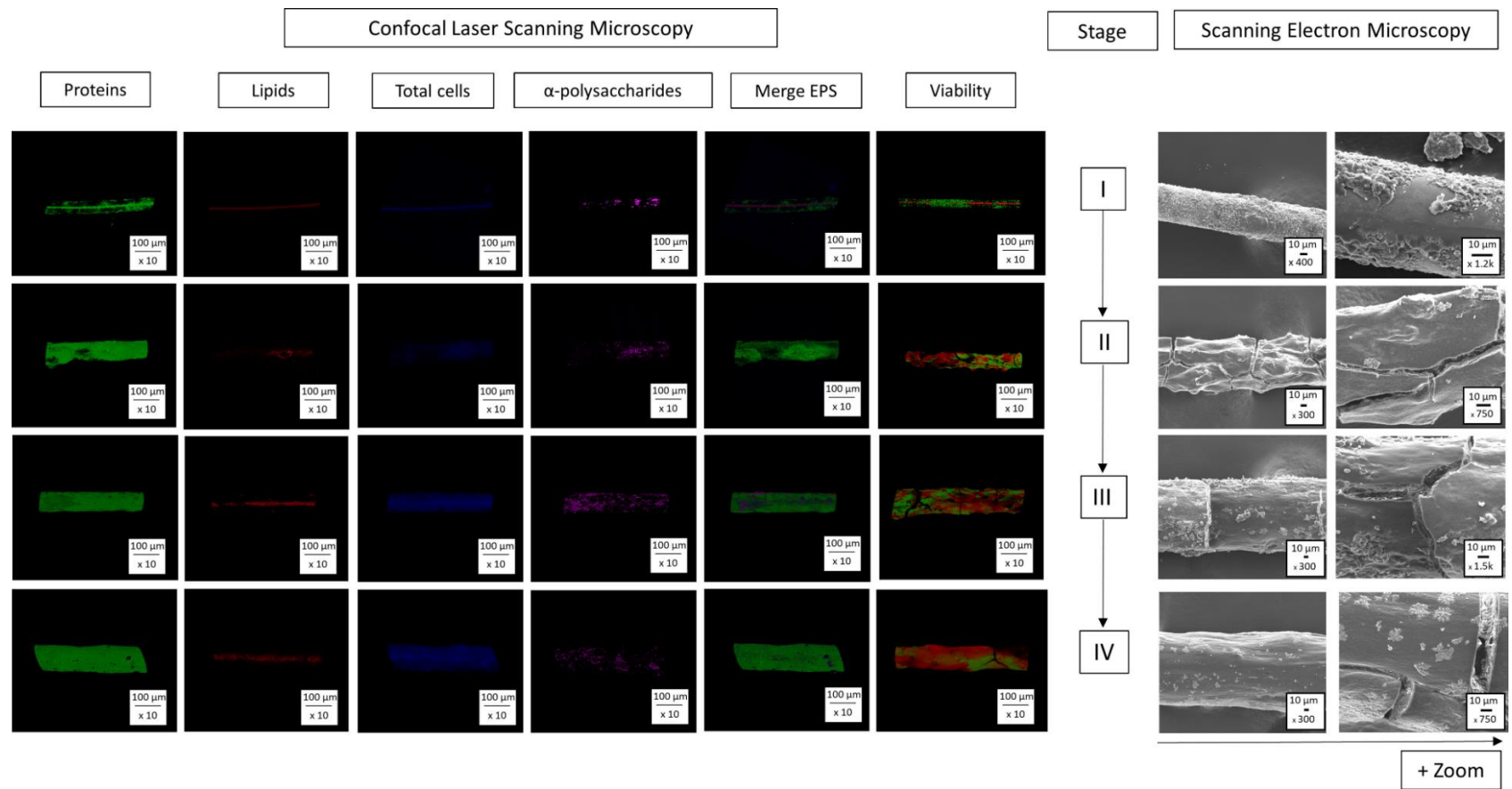


Figure 1.8 : Evolution de différentes caractéristiques de biofilms électroactifs développés à partir de schorre révélées par microscopie confocale

Après 5 jours (stade I), 11 jours (stade II), 31 jours (stade III) et 55 jours (stade IV) d'opération (mode d'agitation non-spécifié) (Martinez Ostormujof et al., 2023).

Le développement de stratégies pour lutter contre les pertes de performances des biofilms électroactifs permet d'assurer la stabilisation des courants au cours du temps. Bridier et al., (2015) ont montré notamment l'intérêt du repiquage de biofilm électroactif frais sur des vieilles électrodes afin de le maintenir efficace pour l'abattement électrochimique de déchets biologiques durant deux mois d'opération (mode d'agitation non-spécifié). Une ré-augmentation maximale de près de 500 % de l'efficacité coulombique après repiquage a pu être observée. L'obtention de courants stables dans le temps est donc aujourd'hui un défi dans la plupart des systèmes électro-microbiens.

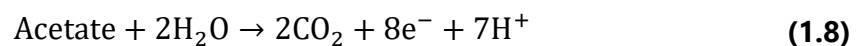
1.2 INFLUENCES DE L'ÉLECTRODE ET DE L'ÉLECTROLYTE SUR LES PERFORMANCES DU SYSTÈME ÉLECTRO-MICROBIEN

Le biofilm est situé entre deux interfaces, l'une avec l'électrode et l'autre avec l'électrolyte, la première apportant l'accepteur d'électrons et la seconde étant la source de substrat. La catalyse biologique assurée par le biofilm est influencée par les paramètres de ces deux interfaces, à savoir les propriétés de l'électrode et les caractéristiques de l'électrolyte (Connors et al., 2022).

Dans ce manuscrit, ces deux interfaces seront étudiées au-travers de deux paramètres opératoires : le potentiel d'électrode (interface biofilm/électrode) et le transport de l'électrolyte (interface biofilm/électrolyte). Ces aspects sont développés respectivement dans les sections 1.2.1 et 1.2.2.

1.2.1 Influence du potentiel d'électrode sur l'organisation fonctionnelle du biofilm électroactif

Le potentiel d'électrode peut être contrôlé grâce à l'introduction d'une électrode de référence dans le système électrochimique (Figure 1.2). Dans le cas d'une bio-anode pour laquelle la réaction principale est l'oxydation de l'acétate selon :



le potentiel redox standard du couple (Acétate/CO₂) mesuré à 25°C à 1 bar : $E_{\text{Acétate}}^0 = -520 \text{ mV}/\text{ECS}$ (R. K. Thauer et al., 1977) représente le potentiel au-delà duquel la réaction d'oxydation de l'acétate est thermodynamiquement possible (Babauta et al., 2012) à pH 0.

Dans un cas abiotique, plus le potentiel est élevé, plus l'intensité générée est grande jusqu'à atteindre une valeur limite due à la limitation de transport du réactif (Figure 1.6A). L'ajout du catalyseur sous forme de biofilm complexifie cette tendance générale, puisqu'il peut jouer sur les mécanismes du transfert d'électrons (Figure 1.6B, Figure 1.6C et Figure 1.6D). L'effet du potentiel doit donc aussi être analysé au regard de son

influence sur le biofilm. Aussi, la nature du biofilm, formé à partir d'une culture pure ou d'un échantillon plus complexe, peut aussi induire des variations significatives dans les résultats obtenus d'une étude à l'autre sur le rôle du potentiel imposé.

La capacité d'une bio-anode à générer des électrons peut être caractérisée par chronoampérométrie. Dans ce cas, le potentiel d'électrode (E) est contrôlé et fixe et la réponse en courant (I) est mesurée (Figure 1.2). L'activité électrochimique peut ainsi être quantifiée. Elle peut être associée à la consommation de substrat afin de mesurer l'efficacité coulombique (EC), qui quantifie le nombre d'électrons transférés à l'électrode depuis le substrat par rapport au nombre total d'électrons qui étaient disponibles dans la quantité de substrat consommée. En considérant la demande chimique en oxygène et avec une échelle de temps journalière, l'expression de l'EC est donnée par :

$$EC = \frac{n_i M_{O_2}}{n_e F} \frac{\Delta Q_{quot}}{Q_j \Delta DCO_{quot}} \quad (1.9)$$

où M_{O_2} est la masse molaire de l'oxygène (mg.mol^{-1}), n_i le coefficient stœchiométrique de l'oxygène (1), n_e le nombre d'électrons échangés par mole d'oxygène (4), F la constante de Faraday ($96\,485 \text{ C.mol}^{-1}$), Q_j le débit journalier du réacteur (L.j^{-1}), ΔQ_{quot} la quantité d'électricité produite par jour (C.j^{-1}) et ΔDCO_{quot} l'abattement de DCO quotidien ($\text{mgO}_2.\text{L}^{-1}.\text{j}^{-1}$).

Des biofilms électroactifs efficaces possèdent des EC élevés, c'est-à-dire, un bon taux de conversion de la matière organique en électrons libérés à l'électrode. Les valeurs médianes d'efficacité coulombique reportées dans la littérature se situent autour de 13 % pour des biofilms anodiques développés en eaux usées (de Fouchécour et al., 2022). Une part significative des électrons issus de l'oxydation du substrat n'est donc pas transférée à l'électrode.

Les biofilms multi-espèces formés à bas potentiel en utilisant de l'acétate comme substrat montrent généralement une croissance plus rapide en termes d'activité électrochimique (quelques jours pour l'obtention du plateau de courant contre parfois plus d'une semaine pour les plus hauts potentiels de 130 mV/ECS testés) et sont composés de plus fortes proportions de microorganismes électroactifs tels que *Geobacter* (>50 %) (Torres et al., 2009). A l'inverse, les biofilms développés à des potentiels plus éloignés du potentiel standard de l'acétate donnent classiquement des biofilms plus diversifiés (Torres et al., 2009). Ainsi, plus le potentiel de l'électrode est supérieur à -520 mV/ECS, moins le biofilm électroactif semble efficace, en particulier au-delà de 0 mV/ECS (Dennis et al., 2016; Yang et al., 2019; Torres et al., 2009). Néanmoins, l'utilisation du substrat préférentiel de *Geobacter* qu'est l'acétate peut constituer un biais dans l'obtention de ces biofilms particulièrement efficaces en milieu synthétique.

Dans leur étude consacrée à des biofilms multi-espèces développés en eau usée synthétique sur une durée de 67 jours, Chang et al., (2022) ont montré que le potentiel imposé avait tendance à avoir un impact de plus en plus négligeable avec le temps sur la composition des biofilms électroactifs. Les populations microbiennes semblent converger vers des biofilms de moins en moins efficaces et le potentiel ne semble pas avoir d'impact suffisant pour agir sur ce phénomène. Cependant, cette étude récente reste pour l'instant unique, ce qui ne permet pas d'avoir d'éléments de comparaison en considérant des substrats proches des conditions réelles sur des temps d'opération longs (>1 mois).

Au final, plusieurs études se sont donc intéressées à l'impact du potentiel d'électrode sur les performances électroactives des biofilms obtenus. Cependant, une faible reproductibilité existe concernant les conclusions de la littérature et parfois au sein des mêmes études. Dans ce contexte, Molderez et al., (2021) ont essayé de réduire la variabilité obtenue avec un système permettant d'opérer un grand nombre de répliques. Ils obtiennent des résultats plus significatifs en milieu synthétique riche en acétate en ce qui concerne l'effet du potentiel sur le développement de biofilm multi-espèces. Ils montrent ainsi qu'il existe un potentiel optimal proche de -340 mV/ECS pour l'obtention des densités de courant les plus élevées après une semaine de croissance des biofilms. En-dessous de cette valeur, les biofilms électroactifs voient les courants générés croître plus lentement mais avec des catalyses microbiennes plus efficaces (courants limites plus élevés sur la Figure 1.6A). Pour des potentiels plus élevés, les courants deviennent sensiblement de plus en plus faibles.

La cause de variabilité entre les différents répliques n'a pas été identifiée et corrigée dans l'étude de Molderez et al., (2021), malgré le nombre d'électrodes utilisées permettant de valider les tendances observées. Nous avons alors supposé dans ce travail de thèse que cette variabilité pouvait être due à l'hydrodynamique souvent peu caractérisée et non-contrôlée. En effet, la plupart du temps, un simple barreau aimanté est utilisé pour assurer le mélange de l'électrolyte pouvant conduire à des variations importantes de la contrainte hydrodynamique sur la surface des électrodes entre les répliques et au cours du temps et donc jouer sur les performances électrochimiques des anodes microbiennes.

1.2.2 Influence de l'électrolyte sur les biofilms électroactifs

La composition de l'électrolyte est déterminante pour l'activité électrochimique des biofilms. Le pH, la conductivité, la concentration du substrat et/ou du donneur d'électrons, influencent directement l'activité du biofilm. Il existe aussi une forte influence de l'hydrodynamique, jouant sur les phénomènes de convection et de cisaillement, particulièrement étudiée dans les biofilms non-électroactifs, qui fait l'objet de la section 1.2.2.2. Des généralités sur les écoulements dans les réacteurs biologiques sont présentées en section 1.2.2.1. La dernière section de cette partie (1.2.2.2.2) est

consacrée aux quelques études s'intéressant à la contrainte hydrodynamique dans les biofilms électroactifs.

1.2.2.1 Etude des biofilms sous hydrodynamique contrôlée

1.2.2.1.1 Grandeurs adimensionnelles et valeurs caractéristiques

Les régimes à écoulement contrôlés sont définis par des grandeurs adimensionnelles pour permettre la comparaison entre les différents systèmes expérimentaux.

- Le nombre de Reynolds, qui donne le rapport des forces d'inertie sur les forces de viscosité de l'écoulement :

$$Re = \frac{uL}{\nu} \quad (1.10)$$

où u est la vitesse du fluide ($\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$), L la longueur caractéristique du système (m) et ν la viscosité cinématique ($\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$).

Il permet de caractériser le régime d'écoulement (de laminaire à turbulent). Un écoulement laminaire peut être assimilé à des couches de fluides qui glissent les unes sur les autres sans se mélanger pour des faibles valeurs de Reynolds ($<10^1$ en cuve agitée). En régime laminaire stationnaire, la vitesse locale instantanée ne varie pas. Pour un nombre de Reynolds suffisamment grand ($>10^4$ en cuves agitées), le régime est turbulent. L'écoulement est alors irrégulier et tridimensionnel. Il est caractérisé par des structures tourbillonnaires d'échelles spatiales variées. Les vitesses locales dans ce régime présentent des fluctuations aléatoires.

- Le nombre de Sherwood permet de comparer les transferts de masse convectif et diffusif :

$$Sh = \frac{K_L L}{D_i} \quad (1.11)$$

où K_L est le coefficient de transfert de masse par convection ($\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$), L est la longueur caractéristique du système (m), et D_i le coefficient de diffusion ($\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$).

Il permet de caractériser les transferts de masse entre un fluide et une interface et peut notamment être appliqué en électrochimie en considérant l'interface électrode/électrolyte.

Le cisaillement d'un fluide correspond à la réponse d'un fluide soumis à une sollicitation mécanique. Ce phénomène est caractérisé par une contrainte de

cisaillement (τ en Pa) et un taux de cisaillement ($\dot{\gamma}$ en s^{-1}), correspondant respectivement à la mesure de la contrainte mécanique appliquée au fluide et la variation spatiale de la vitesse induite au sein du fluide (gradient de vitesse) :

$$\dot{\gamma} = \frac{du}{dy} \quad (1.12)$$

$$\tau = \mu \dot{\gamma} \quad (1.13)$$

où $\dot{\gamma}$ est le taux de cisaillement (s^{-1}), u la vitesse du fluide ($m.s^{-1}$), y la direction perpendiculaire au sens du fluide (m), τ est la contrainte de cisaillement (Pa) et μ la viscosité dynamique (Pa.s).

1.2.2.1.2 Systèmes à hydrodynamique contrôlée pour l'étude des biofilms

L'étude de la contrainte hydrodynamique est réalisée dans le cas des biofilms de deux façons principales :

- Type 1 : le déplacement du fluide est contrôlé dans une chambre d'écoulement grâce à son débit qui induit une contrainte de cisaillement connue sur la surface de développement du biofilm.
- Type 2 : le fluide est mis en mouvement par une pièce mobile du réacteur (agitateurs standards de type hélice marine ou pâles Rushton, disque ou cylindre rotatifs) ce qui induit des contraintes de cisaillement précises sur les surfaces de développement du biofilm (qui peuvent être des coupons parfois situés sur la pièce mobile du réacteur).

Les principaux réacteurs de la littérature sont regroupés dans la Table 1-2 dans une liste non-exhaustive, puisqu'il existe de nombreux réacteurs développés pour des expérimentations très spécifiques. Les deux premiers réacteurs sont de type 1 et les quatre derniers sont de type 2. La revue bibliographique de Gomes et al., (2014) présente la plupart de ces réacteurs à hydrodynamique contrôlée. Des réacteurs plus adaptés aux biofilms électroactifs qui permettent l'implémentation aisée d'électrodes connectées électriquement sont aussi présentés sous la forme de cellules d'écoulement.

Ces dernières permettent d'assurer des contraintes de cisaillement précises sur la surface de développement du biofilm dans des conditions d'alimentation en substrat contrôlées (concentration et débit principalement). Elles peuvent être facilement couplées à l'analyse *in situ* de paramètres physico-chimiques et structuraux du biofilm, notamment grâce à des outils d'imagerie (microscopie confocale par exemple). Néanmoins, pour conserver ces paramètres contrôlés sur les surfaces d'électrodes étudiées, les cellules d'écoulement doivent rester à petite échelle (classiquement

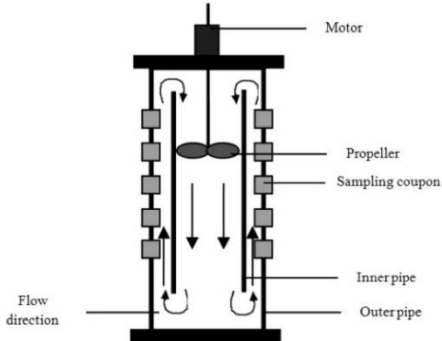
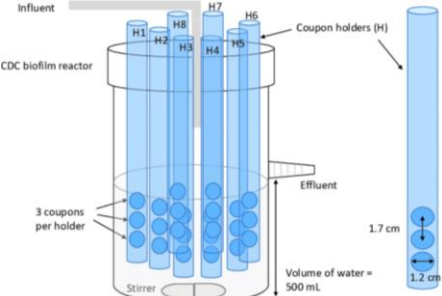
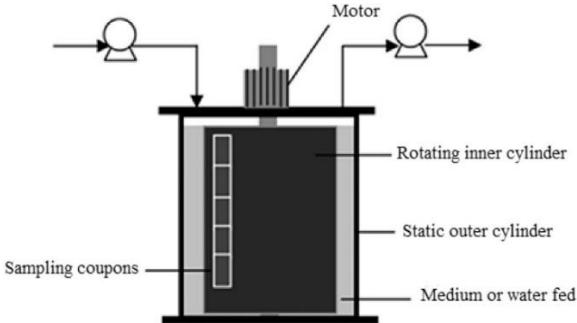
volume < 100 mL) et ne permettent donc pas d'augmenter significativement les volumes et surfaces étudiées, ce qui est un frein pour l'application industrielle des technologies développées dans ces cellules. Elles sont donc plus adaptées à une optique de réduction d'échelle et d'expérimentations centrées sur la compréhension des processus et mécanismes spécifiques au sein des biofilms (Pinck et al., 2020). Dans le cas des systèmes innovants électro-microbiens, il s'agit donc des réacteurs les plus utilisés pour la compréhension des effets de la contrainte hydrodynamique (voir section 1.2.2.2).

Les systèmes en cuve agitée (Type 2) sont bien décrits par les nombres adimensionnels et leur montée en échelle est bien maîtrisée, contrairement aux cellules d'écoulement (Type 1). Ils permettent principalement l'étude de biofilms situés sur des coupons immobiles de l'ordre de quelques cm² soumis à des conditions turbulentes. L'intensité du cisaillement peut être plus hétérogène que dans les systèmes de type 1 à cause de la géométrie du réacteur (par exemple plus faible proche de l'axe de rotation d'un disque tournant). Dans le cas d'une étude spécifique sur le cisaillement, des résultats moins homogènes qu'avec des cellules d'écoulements sont alors obtenus (Gomes et al., 2014), ce qui peut être un frein dans le cas des études appliquées aux biofilms peu connus, comme les biofilms électroactifs.

Ainsi, les systèmes actuels montrent des limitations pour l'étude de biofilms électroactifs sous hydrodynamique contrôlée. Les réacteurs de type 1 sont moins adaptés à des montées en échelle. Les réacteurs de type 2 ne permettent pas l'obtention de conditions contrôlées homogènes sur les surfaces de développement des biofilms et n'ont été que peu adaptés à l'étude de biofilms électroactifs.

Table 1-2 : Exemples de différents réacteurs à hydrodynamique contrôlée utilisés pour l'étude de biofilms.

Types de réacteurs	Illustrations	Caractéristiques principales	Sources
<p>Cellules d'écoulement (Type 1)</p>		<ul style="list-style-type: none"> - Prélèvement périodique et analyse <i>in situ</i> de biofilms possible - Contrainte de cisaillement déterminée par la géométrie de la cellule - Lien de la contrainte du cisaillement avec le débit 	<p>(Pinck et al., 2020)</p>
<p>Réacteurs goutte à goutte (Type 1)</p>		<ul style="list-style-type: none"> - Formation de biofilm proche de l'interface gaz-liquide - Très faibles cisaillements - Prélèvement périodique et analyse <i>in situ</i> de biofilm possibles - Faible temps de résidence du fluide 	<p>(Goeres et al., 2009)</p>
<p>Réacteurs à disque tournant (Type 2)</p>		<ul style="list-style-type: none"> - Formation de biofilm sous différentes contraintes de cisaillement - Indépendance entre débit et cisaillement 	<p>(Gomes et al., 2014)</p>

Types de réacteurs	Illustrations	Caractéristiques principales	Sources
<p>Cuves agitées (cas du réacteur Propella®) (Type 2)</p>		<ul style="list-style-type: none"> - Réacteur parfaitement mélangé - Caractéristiques hydrauliques dépendantes de la vitesse de rotation - Indépendance entre débit et cisaillement 	<p>(Gomes et al., 2014)</p>
<p>Réacteur CDC® (Type 2)</p>		<ul style="list-style-type: none"> - Coupons indépendants permettant des traitements spécifiques - Indépendance entre débit et cisaillement 	<p>(Yap et al., 2017)</p>
<p>Réacteurs annulaires (Type 2)</p>		<ul style="list-style-type: none"> - Grand nombre d'échantillons - Contrôle de la contrainte de cisaillement facile et homogène - Indépendance entre débit et cisaillement - Complexité des vortex formés 	<p>(Gomes et al., 2014)</p>

1.2.2.1.3 Cas spécifique du réacteur de Couette-Taylor pour les biofilms

Parmi les réacteurs de type 2 présentés ci-dessus, le réacteur annulaire de Couette-Taylor permet cependant l'obtention de conditions hydrodynamiques homogènes sur de grandes surfaces de développement pour le biofilm. Il est composé de deux cylindres concentriques entre lesquels l'écoulement est généré par la rotation du cylindre intérieur alors que le cylindre extérieur reste fixe. A notre connaissance, aucune étude n'a adapté un tel système expérimental pour le développement des biofilms électroactifs.

Le nombre adimensionnel de Taylor (Ta) est utilisé pour caractériser les régimes d'écoulements au sein de ce réacteur :

$$Ta = \frac{\omega \sqrt{R_i(R_o - R_i)^3}}{\nu} \quad (1.14)$$

où ω est la vitesse angulaire du cylindre interne (rad.s^{-1}), R_i et R_o les rayons des cylindres intérieur et extérieur du réacteur (m) et ν la viscosité cinématique ($\text{m}^2.\text{s}^{-1}$).

Il permet de discerner les différents régimes d'écoulements associés à une valeur critique (Ta_c) caractéristique (Figure 1.9) :

$$Ta_c = 20.65 \frac{R_o \left(1 + \frac{R_i}{R_o}\right)^2}{R_i \sqrt{\left(1 - \frac{R_i}{R_o}\right) \left(3 + \frac{R_i}{R_o}\right)}} \sqrt{\frac{R_o - R_i}{R_i}} \quad (1.15)$$

Ces différents écoulements de Couette-Taylor sont caractérisés par des régimes en vortex spécifiques en plus des régimes laminaires et turbulents typiques et sont représentés sur la Figure 1.9 :

- Le régime de Couette : il correspond au mouvement du fluide en conditions laminaires entre deux surfaces mobiles l'une par rapport à l'autre. Dans le cas du réacteur de Couette-Taylor, il s'agit le plus souvent de la rotation du cylindre intérieur par rapport au cylindre extérieur fixe qui induit des lignes de courants parallèles (Coufort, 2004).
- Le régime en vortex : l'apparition de vortex à partir du Taylor critique (Ta_c) conduit à un transfert entre les vortex individuels limité mais à un mélange au sein d'un même vortex plus fort (Schimpf et al., 2021).

- Le régime en vortex ondulés : ce régime est caractérisé par une ondulation des vortex, générant un mélange entre vortex et un mélange total plus important (Nemri et al., 2016).
- Le régime en vortex turbulents : l'amplitude des vagues créées par les vortex devient plus variable et des écoulements turbulents se développent au sein de chaque cellule, favorisant ainsi le transfert au sein d'un même vortex (Coufort, 2004).
- Le régime turbulent : il est caractérisé par des tourbillons et des mouvements chaotiques à différentes échelles spatiales et temporelles. Les particules de fluides se déplacent de manière irrégulière et chaotique, entraînant une forte agitation et des variations rapides de vitesse et de pression (Coufort, 2004).

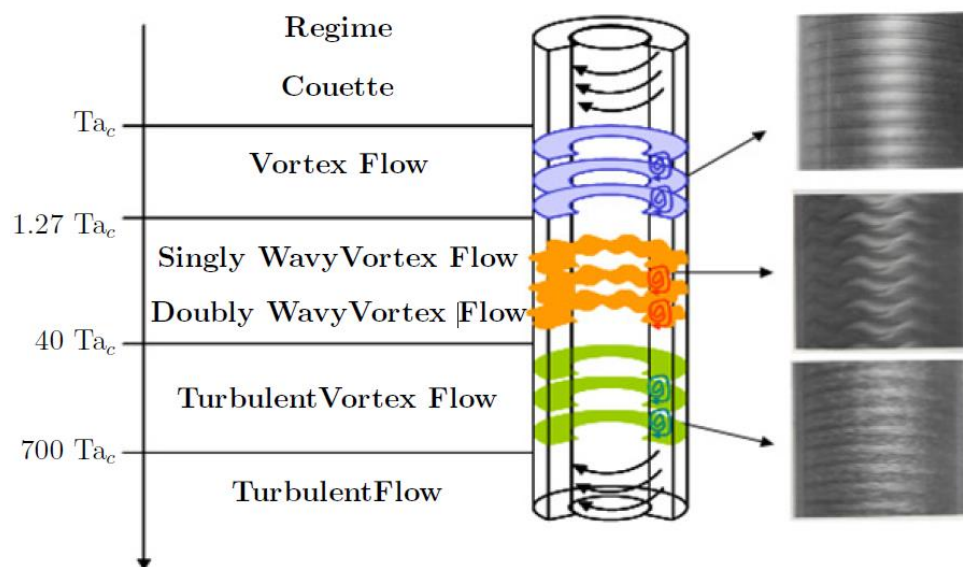


Figure 1.9 : Différents régimes d'écoulement de Couette-Taylor (Coufort, 2004).

Les études sur l'impact de l'hydrodynamique en réacteur de Couette-Taylor portent aussi bien sur les biofilms à impact positif, tels que les biofilms de l'épuration des eaux usées (Derlon et al., 2008; Rochex et al., 2008) ou phototrophiques (Paule et al., 2011), que sur des biofilms non-désirés conduisant au colmatage dans certaines applications industrielles (Pechaud et al., 2012) ou dans des installations d'irrigation (Hou et al., 2020). Les procédés étudiés sont appliqués à l'échelle industrielle, ce qui montre la pertinence du réacteur de Couette-Taylor pour l'étude de divers bio-procédés influencés par l'hydrodynamique. Les réacteurs de Couette-Taylor permettent ainsi l'étude de biofilms développés dans des conditions hydrodynamiques contrôlées variées (faibles cisaillement et études de la croissance de biofilm *versus* cisaillement élevé pour le détachement complet de biofilm) mais homogènes sur de grandes surfaces de développement ($>10 \text{ cm}^2$). Ils sont particulièrement utilisés pour déterminer l'évolution de la composition, de la structure, et de la diversité des

populations microbiennes en fonction des contraintes de cisaillement (Nemri et al., 2016; Schrimpf et al., 2021).

1.2.2.2 Rôle de l'hydrodynamique sur le développement des biofilms électroactifs

Cette section se consacre à l'étude de l'influence de l'hydrodynamique sur les propriétés des biofilms. La première partie traite des biofilms dans un contexte général et la seconde se focalisera sur les biofilms électroactifs.

1.2.2.2.1 Mécanismes d'action de l'hydrodynamique

L'hydrodynamique joue sur deux principaux mécanismes : (i) les phénomènes de transport de masse externe et interne au biofilm et (ii) les forces mécaniques appliquées au biofilm. Ils interviennent chacun aux différentes étapes du cycle de vie d'un biofilm, définies selon les processus mis en jeu (Hall-Stoodley et al., 2004), qui sont résumés ci-dessous en trois points. La Figure 1.10 illustre les mécanismes d'action de l'hydrodynamique et leur temps caractéristiques.

- **Le transport, l'adhésion réversible, puis irréversible des cellules :**

La formation initiale d'un biofilm débute avec le transport des cellules à la surface d'un support, qui peut se faire par diffusion (engendrée par des mouvements browniens et motilité des cellules), par convection (transport des cellules par l'écoulement du milieu jusqu'à proximité de la surface) ou par sédimentation des cellules (Purevdorj-Gage and Stoodley, 2004). L'attachement des cellules constitue le processus d'adhésion, il est régi par des interactions telles que des liaisons de Van der Waals, hydrophobe et électrostatique. La force de ces interactions étant faible, l'adhésion qui en résulte est réversible et peut conduire au détachement spontané des cellules et leur retour à l'état planctonique (Costerton, 1999). Néanmoins, les cellules synthétisent des protéines et des polysaccharides pour renforcer l'adhésion : il s'agit alors de l'adhésion irréversible (Berne et al., 2018). Cette étape possède une cinétique rapide et s'effectue en quelques minutes voire secondes (Beloin et al., 2008).

- **La croissance du biofilm :**

Une fois les cellules irréversiblement attachées à un support, la division cellulaire se met en place pour former des micro-colonies qui constituent la structure primaire du biofilm (Johnson, 2008). Cette étape est caractérisée par la sécrétion importante de substances polymériques extracellulaires (EPS) qui va donner au biofilm sa structure (Costerton et al., 1994). Les cellules sont capables de communiquer entre elles par des mécanismes auto-induits et réalisent des échanges de métabolites (Gupta et al., 2016; Thormann et al., 2004). L'étape de croissance prend des temps variables selon la

cinétique de croissance des microorganismes présents (Najafpour, 2007), dont le temps de génération peut varier de quelques minutes à plusieurs heures, voire quelques jours pour des microorganismes aux croissances très lentes, souvent anaérobies (Weissman et al., 2021).

- **La maturation et le déclin :**

Le biofilm mature possède une organisation structurale spécifique qui semble stable à l'échelle macroscopique. Il en est de même pour ses performances qui sont désormais relativement stables. Toutefois, il s'agit toujours d'un système dynamique dans lequel la croissance est contrebalancée par la lyse cellulaire et par le détachement créé par le cisaillement du fluide à l'interface biofilm et de la phase liquide (Donlan, 2002). Ainsi, à l'échelle microscopique, il est possible d'observer une évolution de sa structure morphologique et microbiologique. La maturation est l'étape la plus longue dans le cycle de vie d'un biofilm. Elle donne suite à une dernière étape de dispersion des cellules, qui entraîne le déclin du biofilm mature. Cette étape est souvent concomitante avec la dégradation de la matrice polymérique mais peut être due à d'autres facteurs (Kaplan, 2010).

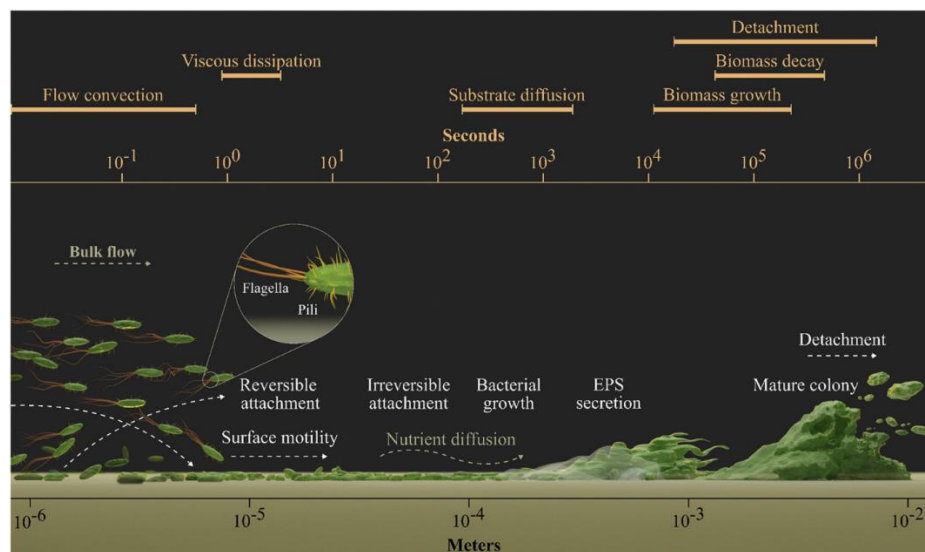


Figure 1.10 : Différents effets de l'hydrodynamique sur la structure d'un biofilm et son évolution.

Echelles temporelles et spatiales d'application de ces phénomènes (Krsmanovic et al., 2021).

1.2.2.2.1.1 Effets connus de l'hydrodynamique sur le transport et la structure des biofilms

L'influence de l'hydrodynamique sur les phénomènes d'adhésion des bactéries à la surface des supports de biofilm a fait l'objet de nombreux travaux (Beloin et al., 2008; Berne et al., 2018; Nejadnik et al., 2008). Les travaux de Saur et al., (2017) se distinguent

par l'étude de ces mécanismes dans des conditions expérimentales souvent rencontrées dans les procédés industriels : en régime turbulent (dans une gamme de cisaillement large de 0,09-7 Pa) et en culture mixte (bactéries issues de l'épuration des eaux). Les résultats obtenus soulignent que des contraintes hydrodynamiques élevées augmentent la quantité de bactéries attachées jusqu'à un certain seuil (3,7 Pa), au-delà duquel l'effet positif du mélange est contrebalancé par l'effet négatif du cisaillement qui provoque le détachement des cellules faiblement adhérentes au support. Différentes distributions spatiales ont également été observées en fonction des conditions hydrodynamiques imposées. Les faibles contraintes de cisaillement conduisent à une adhésion en monocouche cellulaire, alors que les fortes contraintes de cisaillement favorisent la formation de clusters.

L'attachement initial de biofilm est donc particulièrement impacté par les conditions hydrodynamiques mais le rôle de ce dernier semble encore plus influant lors de l'étape de maturation des biofilms car il influence de manière plus déterminante l'accès au substrat.

Il est généralement admis que la diffusion est le principal processus de transport des solutés au sein des biofilms. Toutefois, un transport par convection est également possible *via* des canaux et/ou pores (Figure 1.11), ce qui améliore l'accès des solutés à des couches profondes du biofilm et l'évacuation des métabolites depuis celles-ci (Wilking et al., 2013).

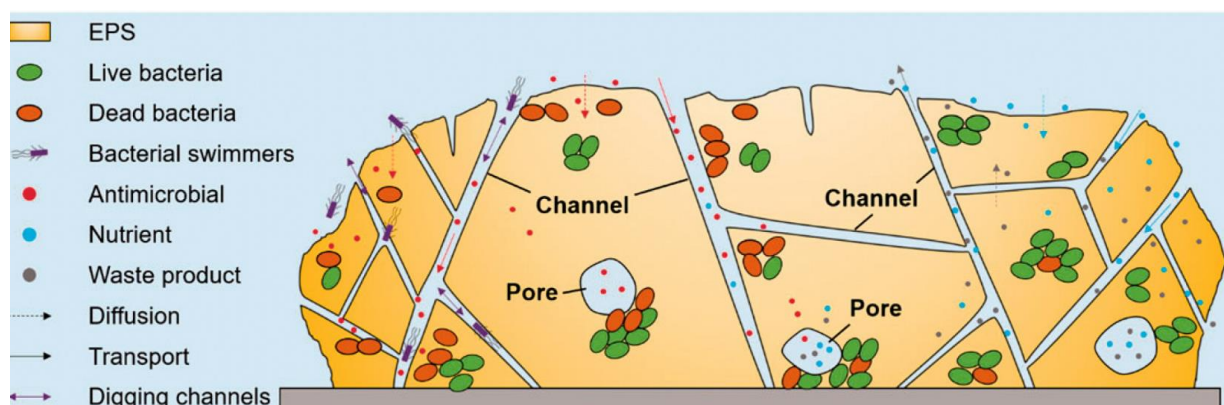


Figure 1.11 : Schéma de l'organisation des canaux et des pores au sein du biofilm (Quan et al., 2022).

Une limitation diffusionnelle peut être à l'origine de gradients de concentration des solutés qui favorisent une stratification spatiale des bactéries et exacerbent les phénomènes de compétition pour les donneurs et accepteurs d'électrons (Stewart, 2003).

Ces limitations diffusionnelles conditionnent aussi la structure morphologique des biofilms. Picioeanu et al., (1998) ont montré par simulation numérique que la forme

du biofilm est différente lorsque la croissance du biofilm est limitée par la diffusion du substrat ou par la croissance des espèces microbiennes. Lorsque le substrat est limitant, seuls les microorganismes situés dans les couches externes (généralement aux taux de croissance les plus élevés) y ont accès. Cela entrainera leur développement qui se fera naturellement vers le liquide. Un biofilm à la structure très hétérogène (en forme de champignon) en résultera (Figure 1.12). A l'inverse, un régime de croissance du biofilm, non-limité par la diffusion mais par la croissance des microorganismes, conduira au développement d'un biofilm plus homogène à la structure plus lisse.

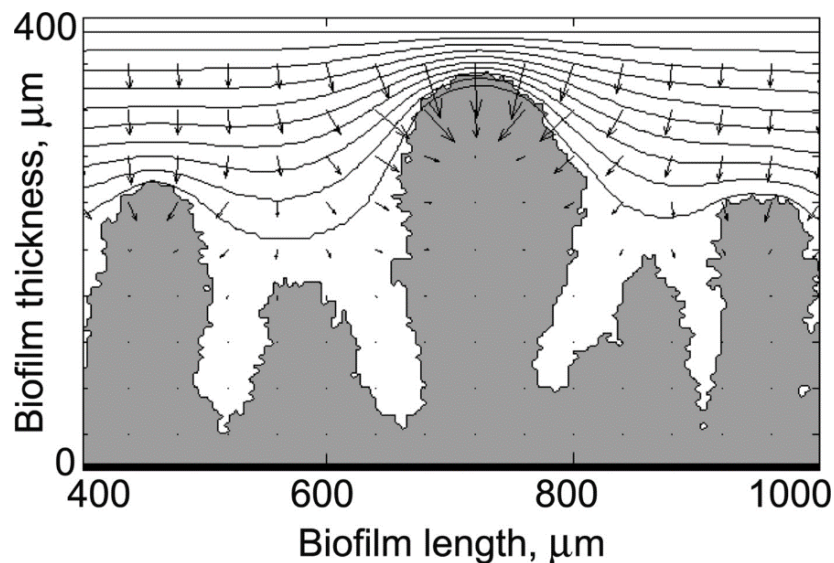


Figure 1.12 : Structure en champignon d'un biofilm (en gris) modélisée par Picioreanu et al., (1998).

La modélisation est effectuée pour un taux de croissance de la biomasse maximum 20 fois supérieur au taux de diffusion du substrat maximum. Les lignes représentent les isoclines de concentrations de substrat (à partir de la concentration maximale de la solution en haut, chaque ligne inférieure représente une chute de 10 %), et les flèches indiquent la direction et la valeur du flux local de substrat.

La structure des biofilms est également influencée par les contraintes mécaniques appliquées au biofilm et induite par l'hydrodynamique.

En effet, le biofilm se comporte comme un fluide viscoélastique et possède des propriétés de cohésion, de densité et de porosité propres (Peterson et al., 2015). Il a été observé que de fortes contraintes de cisaillement associées à des régimes d'écoulement turbulents permettent la densification du biofilm, le rendent ainsi plus cohésif (Paul et al., 2012). Les mécanismes associés à cette densification sont d'une part, la compression du biofilm augmentant sa densité (Figure 1.13A), et d'autre part le détachement de particules les moins cohésives. La sécrétion d'EPS augmentée dans le biofilm en réponse au stress provoqué par les forces de cisaillement a également pour effet de renforcer sa cohésion. Il en résulte un biofilm plus dense et plus fin par

rapport à un biofilm développé dans des conditions de plus faibles contraintes de cisaillement (Figure 1.13B).

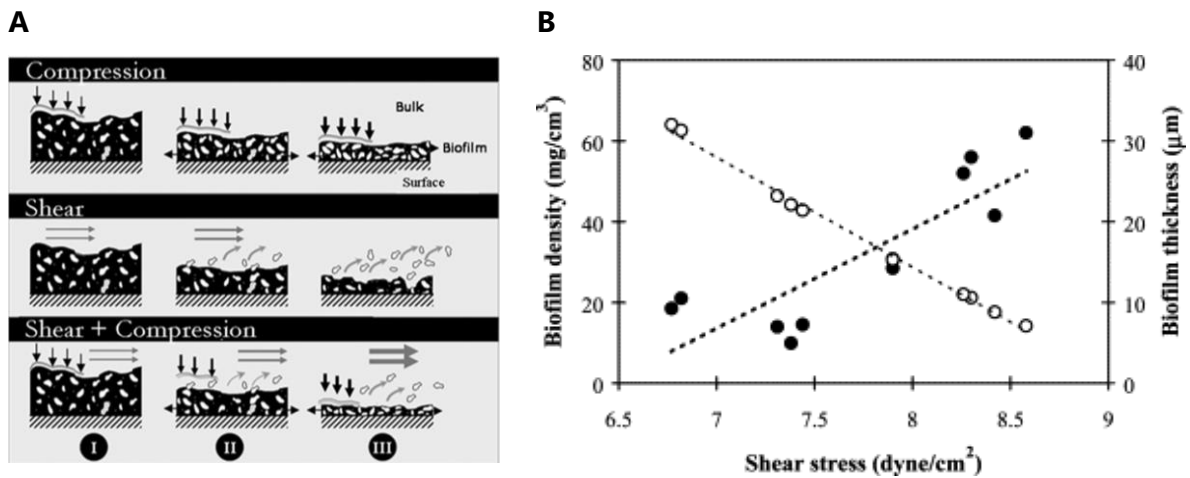


Figure 1.13 : Comportement physique d'un biofilm en fonction de contraintes de cisaillement croissantes.

A) Représentation schématique du biofilm au cours du temps : microorganismes (en blanc) et matrice (en noir). L'étape I caractérise le début de l'application des forces, l'étape II l'étape de transition et l'étape III la phase finale du biofilm obtenu. L'épaisseur des flèches traduit l'intensité de la force appliquée (Paul et al., 2012). B) Effets du cisaillement sur la densité (en noir) et l'épaisseur (en blanc) d'un biofilm développé en réacteur à lit fluidisé (Liu and Tay, 2002).

Le détachement de biofilm a lieu lorsque les contraintes de cisaillement locales dépassent les forces de cohésion du biofilm. La cohésion du biofilm est influencée par plusieurs facteurs dont la composition et la structure de la matrice d'EPS, elle-même influencée par les conditions de culture du biofilm et son histoire (Telgmann et al, 2004). Selon la taille et la fréquence des particules détachées, le détachement se divise en deux mécanismes : l'érosion et le détachement volumique (Stewart, 1993).

L'érosion est un phénomène continu de détachement superficiel de petites particules, qui contribue à éliminer les particules les moins cohésives, et à former des biofilms à la surface lisse.

Le détachement volumique est plus ponctuel et concerne de grosses sections de biofilm dont la taille est du même ordre de grandeur que l'épaisseur du biofilm (Petrova and Sauer, 2016). Il affecte la structure profonde du biofilm. Dans le cas de biofilms présentant des limitations diffusionnelles, le détachement volumique contribue à apporter les solutés (donneur ou accepteur d'électrons) à des couches internes de biofilm qui n'y avaient pas ou peu accès. Il peut aussi conduire à l'extension et/ou à la formation de canaux et pores dans la matrice. Ces modifications structurales

sont déterminantes dans les phénomènes de compétition microbienne pour le substrat et l'accepteur d'électrons (Flemming et al., 2016).

En résumé, l'hydrodynamique contrôle l'accès au substrat et la structure du biofilm, lesquels influencent la composition microbienne et les performances des biofilms.

1.2.2.2.1.2 Effet de l'hydrodynamique sur l'activité métabolique des biofilms.

De fortes contraintes de cisaillement induisent un stress sur les espèces microbiennes qui se traduit par des modifications structurales des biofilms. Ces modifications sont dues en partie à l'augmentation de la sécrétion d'EPS et de l'activité métabolique des microorganismes en réponse à ce stress (Jones and Buie, 2019; Yu Liu and Tay, 2002). Tsagkari et al., (2022) relèvent par exemple que la teneur en EPS des biofilms est 2 à 6 fois supérieure lorsque les contraintes de cisaillement passent de 2,4 à 12 mPa (en régimes de vortex). Ils attribuent cette variation significative à un phénomène de « mechanosensing », c'est-à-dire une détection par le biofilm de la contrainte mécanique apportée par le cisaillement (Rodesney et al., 2017). Le biofilm serait alors en mesure d'apporter une réponse biochimique à ce stress en produisant des molécules dites second messenger (di-guanosine monophosphate cyclique) capables d'induire l'expression des gènes responsables de la formation de biofilm et notamment de la production d'EPS.

En plus d'influencer l'expression de certains gènes, l'hydrodynamique exerce une forte pression de sélection sur les différentes populations microbiennes, ce qui peut avoir une influence déterminante sur la composition des biofilms multi-espèces en favorisant le développement de certaines espèces plus adaptées aux contraintes imposées. Rochex et al., (2008) observent grâce à la techniques de PCR–SSCP (« Polymerase chain reaction single-strand conformation polymorphism ») des populations plus diversifiées dans les biofilms développés à 0,07 Pa qu'à 0,24 Pa. Ils ont développé des biofilms à partir d'un inoculum complexe d'eaux usées industrielles (usine de papier) dans un effluent synthétique et sur une durée relativement longue (3 semaines). Ils observent alors une réduction sensible de la diversité microbienne dans les biofilms développés à forte contrainte de cisaillement, alors que les biofilms développés à faible contrainte présentent une diversité microbienne plus importante. Partant du postulat que la réduction de la diversité caractérise généralement les biofilms en croissance et que son augmentation est signe de maturation des biofilms, les auteurs concluent que le stress hydrodynamique retarde la maturation des biofilms.

La généralisation des outils de séquençage d'ADN a permis d'identifier plus précisément les différentes populations présentes dans les biofilms et leurs proportions relatives en fonction des contraintes de cisaillement. En couplant des approches de modélisation hydrodynamique et de séquençage d'ADN codant les ARN 16S, Zhou et al., (2021) ont mis en évidence des relations entre les contraintes hydrodynamiques et

la composition des biofilms, développés à partir d'inoculum de boues activées durant un mois d'opération avec des contraintes de cisaillement allant de 0,05 à 0,7 Pa. Ils rapportent une meilleure croissance de biofilm à un optimum de cisaillements intermédiaires (0,21 Pa). Les principaux phylla favorisés par l'augmentation des contraintes de cisaillement sont *Firmicutes* et *Proteobacteria*. Les auteurs suggèrent que des relations symbiotiques avec d'autres populations microbiennes pourraient également influencer le développement de ces microorganismes spécifiques, en plus des facteurs hydrodynamiques.

Des essais ont montré que le cisaillement pouvait être utilisé pour améliorer et optimiser l'activité métabolique d'un biofilm mature, constituant ainsi un paramètre de gestion de son activité. Hou et al., (2022) ont notamment réussi à optimiser la consommation du carbone par un biofilm mature développé en deux semaines dans des rivières pour un cisaillement intermédiaire de 50 mPa (sur une gamme testée de 4 à 120 mPa). Ils décrivent alors l'influence de l'hydrodynamique sur le mélange et sur gradients de solutés comme levier pour contrôler les performances des biofilms obtenus.

Dans le cas du traitement de la matière organique en station d'épuration, les contraintes de cisaillement sont présentées dans une revue d'Escudié et al., (2011) en tant qu'outil efficace de gestion des performances des procédés à base de biofilm (lits bactériens notamment). Lors de l'étape de démarrage des procédés, les auteurs conseillent d'appliquer de faibles contraintes de cisaillement pour permettre le développement du biofilm et l'atteinte de capacité de traitement ciblée. Il convient par la suite d'augmenter les contraintes de cisaillement appliquées pour conserver une fine épaisseur de biofilm permettant de favoriser des taux d'abattement élevés de la matière organique.

1.2.2.2.2 Impact de l'hydrodynamique sur les performances électro-microbiennes

1.2.2.2.2.1 Systèmes abiotiques

L'impact de l'hydrodynamique sur les réactions électrochimiques a été particulièrement bien investigué sur la base des électrodes tournantes, décrites initialement par Levich (Colli and Bisang, 2019; Perry et al., 2020). De fortes contraintes hydrodynamiques entraînent une diminution de l'épaisseur de la couche de diffusion électrochimique permettant donc d'augmenter les densités de courants obtenues. Il existe alors un lien entre la vitesse de rotation de ces électrodes et le courant généré. Le courant limite (I_L), qui correspond à une concentration en espèce réactive égale à 0 à la surface de l'électrode, est exprimé comme :

$$I_L = 0.62 S n_e F C D^{2/3} \nu^{-1/6} \omega^{1/2} \quad (1.16)$$

où S est la surface d'électrode (m^2), n_e le nombre algébrique d'électrons impliqué dans la réaction, F la constante de Faraday ($C.mol^{-1}$), C la concentration initiale de réactif ($mol.m^{-3}$), D le coefficient de diffusion ($m^2.s^{-1}$), ν la viscosité cinématique ($m^2.s^{-1}$) et ω la vitesse angulaire de l'électrode ($rad.s^{-1}$).

D'autres systèmes comme les réacteurs à cylindre tournant ont été utilisés pour des applications à plus grande échelle (Walsh et al., 2017). Néanmoins, les liens entre courants générés et vitesses de rotation d'électrode ont seulement été caractérisés pour ces réacteurs dans les régimes d'écoulement laminaires et turbulents (Gabe and Robinson, 1972a, 1972b) et seules des corrélations expérimentales existent pour décrire les régimes intermédiaires (Legrand et al., 1980).

Cependant, ces valeurs ne sont pas applicables directement dans le cas des systèmes électro-microbiens, en effet, le biofilm modifie les propriétés de surface des électrodes et le calcul de l'épaisseur de la couche de diffusion s'en trouve modifié. De plus, les valeurs de courants limite rendent compte de limitations dues au transfert du substrat vers les microorganismes, de la vitesse de production des électrons par les voies métaboliques microbiennes ou du transfert des électrons des cellules vers la surface de l'électrode (Fricke et al., 2008). Ces différents éléments rendent l'interprétation des effets de l'hydrodynamique plus complexe.

1.2.2.2.2 Systèmes biotiques

Les études sur l'influence de l'hydrodynamique sur les biofilms électroactifs sont encore assez rares mais commencent à émerger. En interrogeant le portail Web of Science selon le schéma d'analyse représenté en Figure 1.14, la littérature ne donne que 7 exemples d'études s'intéressant à l'effet de contraintes de cisaillement bien caractérisées sur les performances des biofilms électroactifs.

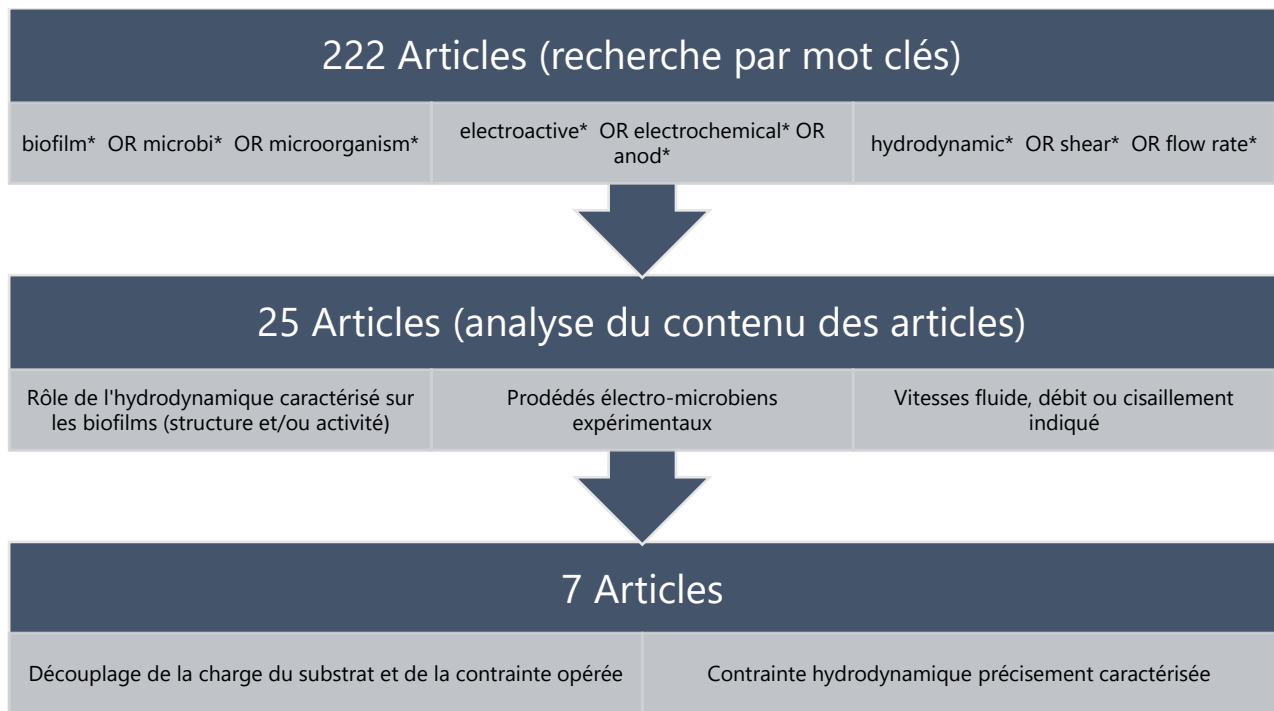


Figure 1.14 : Schéma d'analyse de la littérature pour regrouper les études comparables à ce travail de thèse.

Réalisé à partir du portail Web of Science (dernière analyse bibliographique le 27 juin 2023).

Sur toutes ces applications, aucune ne traite d'un développement de procédés à l'échelle industrielle. Parmi les 222 articles identifiés par l'équation de recherche reportée dans la Figure 1.14, la majorité traite de l'influence du « flow rate » ou débit d'alimentation des réacteurs. Il n'est d'ailleurs parfois pas donné explicitement mais simplement indiqué comme constant. Les résultats de ces travaux n'ont donc pas été conservés afin de ne garder que les 25 papiers centrés sur l'étude couplée de l'hydrodynamique et des biofilms électroactifs.

Parmi ces 25 articles sélectionnés, des données essentielles pour la caractérisation de l'effet de l'hydrodynamique sur l'activité des biofilms électroactifs manquent souvent, car l'analyse de l'hydrodynamique est centrée sur la mesure des performances des PCM. Dans ces cas de figure, les systèmes étudiés sont seulement décrits *via* la puissance générée et ne permettent pas de déterminer l'impact spécifique sur l'anode

microbienne ou la cathode.

Sur les 25 études sélectionnées, 18 n'ont donc pas été retenues à cause de données insuffisantes. L'une de ces 18 est présentée pour exemple dans la Table 1-3. Il s'agit de l'étude de Wang et al., (2017) et contient plusieurs informations utiles, malgré les écoulements à la surface d'électrode qui ne sont pas caractérisés directement (mais par analyse d'image) et donnés sous forme de vitesse du fluide dans le compartiment anodique. L'effet du débit de recirculation sur les performances de biofilms électroactifs dans une PCM y est quantifié en terme d'activité électrochimique et les compositions microbiennes des biofilms sont étudiées. Le courant le plus élevé est obtenu pour des vitesses moyennes de $4,5 \text{ mm.s}^{-1}$.

Table 1-3 : Etat de l'art des études analysant le rôle de l'hydrodynamique sur les biofilms électroactifs.

Réacteur – Expression du cisaillement	Electrode – Surface projetée	Volume du réacteur	Matériel biologique	Milieu de culture – Alimentation	Gamme de cisaillement	Durée de la contrainte	Intensité maximale	Références
PCM – Débit et analyse des écoulements	Feutre de carbone – 35 cm ²	450 mL	Culture Mixte	Synthétique – Recirculation	0,4-7,7 mm.s ⁻¹	3 jours	2,5 - 4 A.m ⁻²	(Wang et al., 2017)
Cellule d'écoulement – Débit et modèle	Barre de graphite – 3 cm ²	50 mL	Culture Pure/ Culture Mixte	Synthétique – Continu	0,01-1,6 Pa	6 mois	1,1 A.m ⁻²	(Amirdehi et al., 2022)
PCM – Débit et modèle	Feutre de carbone – 25 cm ²	20 mL	Culture Pure	Eaux usées industrielles – Batch	5-15 mPa	5 min	70 - 90 mA.m ⁻²	(Islam et al., 2019)
Disque rotatif – Rotation et théorie	Carbone vitreux – 0.2 cm ²	500 mL	Culture Pure	Synthétique – Recirculation	0,01-1 Pa	7 jours	2,7 - 6,8 A.m ⁻²	(Jones and Buie, 2019)
PCM – Agitateur et Reynolds calculé	Brosse de graphite – 25 et 42 cm ²	1000 mL	Culture Pure	Synthétique – Continu	Re=0-8397	4 semaines	20 - 36 mA.m ⁻²	(Vilas Boas et al., 2015)
CEM – Agitateurs magnétiques	Feutre de carbone – 12 cm ²	140 mL	Culture Mixte	Synthétique – Batch	Re=900-4900	12 h	2,1 - 2,9 A.m ⁻²	(Ajayi et al., 2010)
PCM tubulaire – Reynolds estimé	Feutre de carbone – 400 cm ²	800 mL	Culture Mixte	Synthétique – Continu	Re=0-2351	50 h	15 - 24 A.m ⁻³	(Pan et al., 2019)
Cellule d'écoulement – Débit et modèle	Graphite polycristallin – 0,8 cm ²	13 mL	Culture Mixte Enrichie	Synthétique – Continu	Re=10-80	1 mois	8,2 - 9,5 mA.m ⁻²	(Moss et al., 2020)

La mise en recirculation d'un réacteur en batch permet d'imposer des contraintes avec une grande facilité opératoire sans avoir à mettre en œuvre d'agitation mécanique (Ajayi et al., 2010; Islam et al., 2019). La recirculation permet d'homogénéiser rapidement le milieu et donc d'étudier de façon indépendante l'effet de la contrainte apportée par l'alimentation et celui de la charge du substrat (hypothèse d'un chemostat). En régime continu, cette stratégie de couplage de la contrainte de cisaillement au débit du fluide rencontre cependant la problématique de la co-variation de la contrainte de cisaillement avec la charge de l'alimentation. Cela peut limiter les interprétations sur l'effet de la contrainte hydrodynamique si elle est reliée à des modifications du milieu dans le cas d'un échantillon réel complexe et variable. Elle cantonne la méthode à l'utilisation d'effluents synthétiques pour les modes opératoires continus ou nécessite l'utilisation d'un agitateur (Gong et al., 2022; Juang et al., 2011; Vilas Boas et al., 2015).

La Table 1-3 (excepté la première ligne précédemment décrite) présente donc les 7 différentes études retenues comparables au travail effectué dans le cadre de la thèse. Ces études sont majoritairement réalisées dans des PCM ou des cellules d'écoulement, comme dans la plupart des 25 papiers retenus initialement. Elles disposent de petites surfaces d'électrodes pour garantir des contraintes de cisaillement homogènes sur la surface de développement du biofilm (Moss et al., 2020; Pinck et al., 2020). Par conséquent, les volumes d'électrolytes sont aussi relativement faibles et inférieurs au litre. Ces systèmes décrivent les effets de l'hydrodynamique sur l'activité électro-microbienne en conditions contrôlées, à petite échelle, et sont encore loin des applications industrielles.

Des dispositifs spécifiques avec des électrodes tournantes sont aussi reportés (Jones and Buie, 2019; Pan et al., 2019). Les surfaces de développement de ces électrodes ne sont pas particulièrement plus grandes que dans les PCM, et même significativement faibles en ce qui concerne l'électrode tournante de Jones and Buie, (2019). Ces résultats mettent en évidence la difficulté de développer plusieurs échantillons dans les mêmes conditions hydrodynamiques et le besoin d'électrodes de petite taille pour accomplir cette tâche, qui conduisent aussi à diminuer les possibilités d'extrapolation des résultats et le besoin de répétition des expérimentations effectuées. Ce point met en lumière le défi de l'obtention d'un système permettant de contrôler simultanément l'hydrodynamique sur plusieurs électrodes de façon homogène.

Les milieux utilisés sont majoritairement des milieux synthétiques (Table 1-3). Seule une étude a été reportée en milieu réel (Islam et al., 2019). Cela va dans le sens d'un domaine de recherche encore jeune et cherchant à comprendre des influences spécifiques de l'hydrodynamique en conditions contrôlées sans ajout d'autres facteurs de variabilité que le biofilm et son inoculum. Plusieurs cultures mixtes issues d'inocula complexes ont par contre été utilisées (Ajayi et al., 2010; Amirdehi et al., 2022; Moss et al., 2020; Pan et al., 2019). Il existe un réel enjeu à développer l'étude de l'influence de

l'hydrodynamique sur des biofilms électroactifs en milieu réel pour se rapprocher de conditions industrielles.

Les contraintes de cisaillement ont été imposées sur des durées assez courtes (Table 1-3) et le seul exemple ayant dépassé la durée d'un mois de contrainte présente des résultats dans un système à petite échelle avec une culture pure de *Geobacter* (Amirdehi et al., 2022). Ces durées d'opération semblent limitantes pour l'observation des phénomènes de maturation des biofilms électroactifs sur le long terme et l'effet de l'hydrodynamique sur cette évolution. Des durées d'opération plus longues permettant d'observer la stabilisation de l'activité électrochimique sur le long terme seraient nécessaires pour aller vers le développement de ces technologies à l'échelle industrielle.

Les cisaillements étudiés recouvrent une gamme assez large, de 5 à 1 600 mPa. Les nombres de Reynolds allant de 10 à 8 397 recouvrent des régimes laminaires jusqu'à des écoulements quasi-turbulents ($Re > 10\,000$). Les études sélectionnées montrent des courants générés par les biofilms plus élevés pour les contraintes hydrodynamiques les plus fortes dans les gammes testées. Cela contraste avec les observations en biofilms classiques qui suggéraient un optimum d'activité métabolique pour des contraintes intermédiaires, de même que certaines études sur les biofilms électroactifs reliant cisaillement et apport de substrat (Wang et al., 2017). Des investigations supplémentaires semblent nécessaires pour comprendre cette différence. Des contraintes de cisaillement associées à des régimes d'écoulements turbulents plus intenses devraient donc être étudiées pour observer si l'effet positif sur les courants peut être maintenu, voire amélioré et s'il se maintient sur de longues périodes.

La variabilité des mesures de courants est assez peu renseignée dans ces études. Cette observation est souvent le signe qu'une seule électrode a été analysée dans ces études, sans répétition. Cependant, lorsque les données sont représentées avec les erreurs standards associées (Islam et al., 2019; Jones and Buie, 2019), les performances semblent assez reproductibles. Les différences entre répliques vont de moins de 1 % à 13 %, ce qui correspond à des valeurs inférieures ou égales aux variations mesurées sur les systèmes sans contrôle de l'hydrodynamique (Molderez et al., 2021). L'effet de l'hydrodynamique sur la reproductibilité des résultats est donc pressenti mais pas encore validé compte tenu du manque d'études présentant des répliques.

1.3 CONCLUSIONS : VERS UN SYSTEME A HYDRODYNAMIQUE CONTROLEE POUR L'ETUDE DE BIOFILMS ELECTROACTIFS

Le développement et le maintien dans le temps de biofilms électroactifs efficaces sont les deux conditions nécessaires à l'obtention de systèmes électro-microbiens fonctionnels. La structure et la composition des biofilms électroactifs est un paramètre clé pour la compréhension des systèmes électro-microbiens, et leur gestion est indispensable pour le contrôle des procédés. Le potentiel imposé aux électrodes a été révélé comme un des paramètres opératoires majeurs jouant sur les performances de ces systèmes. La contrainte de cisaillement appliquée aux biofilms électroactifs pourrait également être un paramètre opératoire majeur, mais cette hypothèse reste à valider.

1.3.1 Problématiques des systèmes actuels

Les systèmes usuels pour l'étude de biofilms électroactifs sous hydrodynamique contrôlée sont majoritairement des cellules d'écoulement et/ou des PCM sous différentes formes. Quelques systèmes issus des études électrochimiques abiotiques comme les électrodes à disque tournant ont également été appliqués à l'étude du développement de biofilms électroactifs. Cependant, ces systèmes montrent des limites lorsqu'il s'agit de générer des résultats visant la montée en échelle, notamment :

- Les surfaces d'électrodes et les volumes des réacteurs sont faibles
- Les substrats sont principalement synthétiques
- Les études portent sur de courtes durées d'opération
- Les contraintes de cisaillement étudiées ne couvrent pas une gamme suffisamment large
- Peu d'études de la variabilité et faible nombre d'études.

Tous ces éléments éloignent les études d'une application aisée pour le développement des procédés électro-microbiens à une échelle industrielle.

1.3.2 Besoin d'un réacteur à hydrodynamique contrôlée pour l'étude de biofilms électroactifs à long terme

L'absence de résultats intégrant les aspects cités ci-dessus est certainement due à l'absence de réacteur d'étude adéquat. En effet, avec les technologies reportées dans la littérature, Il n'est pas possible d'étudier des biofilms électroactifs en répliqués dans un même réacteur, dans des conditions hydrodynamiques uniformes et contrôlées (conditions physico-chimiques de développement identiques pour tous les biofilms) sur de grandes surfaces d'électrodes. Ces conditions paraissent nécessaires pour lever

certaines des verrous liés à l'hydrodynamique qui freinent l'industrialisation de procédés électro-microbiens.

La stratégie adoptée dans les travaux qui font l'objet de cette thèse a consisté à adapter à l'étude des biofilms électroactifs un système classique d'étude de l'impact de l'hydrodynamique sur les biofilms conventionnels. Les travaux ont donc visé à transformer un réacteur de Couette-Taylor en l'équipant de plusieurs électrodes de grande taille (plusieurs cm^2 de surface) avec des connexions électriques indépendantes. Il sera ainsi possible de développer des biofilms électroactifs sur des électrodes auxquelles seront appliqués des potentiels différents alors qu'elles seront exposées exactement aux mêmes contraintes hydrodynamiques, homogènes sur la totalité de la surface des électrodes, avec exactement le même flux d'alimentation. Il sera en outre possible de réaliser des prélèvements de biofilm *in situ* au cours du temps pour l'analyse de leurs populations microbiennes.

PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS DE THESE

Les éléments bibliographiques ont permis de mettre en évidence les limites de nos connaissances sur l'impact de l'hydrodynamique sur le développement et l'activité des biofilms électroactifs. Ce manque de connaissances est particulièrement dommageable au moment où un certain nombre de technologies électro-microbiennes ont atteint une maturité qui permet de commencer leur évaluation à des échelles préindustrielles. Ce manque de connaissance tient en partie à des limitations d'ordre expérimental. D'un point de vue matériel, les systèmes expérimentaux bio-électrochimiques ne permettent souvent pas de contrôler l'hydrodynamique sur de grandes surfaces et sur le long terme. Inversement, les systèmes d'étude de biofilm sous hydrodynamique contrôlée ne sont pas adaptés au suivi de performances de biofilms électroactifs.

Dans ce contexte, le développement d'un système d'étude de biofilm sous hydrodynamique contrôlée capable de suivre le développement de biofilms électroactifs constitue le premier objectif de cette thèse. Une première étape de validation de cette technologie dans des conditions abiotiques plus finement contrôlées a été réalisée. Pour cela, une analyse des données acquises sur le réacteur conçu dans le cadre de cette thèse a été réalisée dans le cadre d'une analyse théorique utilisant les équations issues de la littérature.

Un deuxième objectif de thèse a porté sur la compréhension des phénomènes de formation et de croissance des biofilms électroactifs en milieu complexe. En effet, grâce au réacteur électrochimique de Couette-Taylor, des conditions opératoires contrôlées à la fois d'un point de vue électrochimique et hydrodynamique ont pu être appliquées pour mieux caractériser l'effet du potentiel et du cisaillement sur le développement des biofilms électroactifs. Ces analyses ont été réalisées en milieu complexe, puisque des eaux usées prélevées régulièrement en station d'épuration, et supplémentées en acétate, ont été utilisées pour alimenter le réacteur. Les caractérisations électrochimiques (chronoampérométrie, voltammétrie cyclique) ont été couplées à une caractérisation biologique pour renseigner au mieux sur les processus à l'œuvre au sein des biofilms électroactifs soumis à différentes contraintes de cisaillement.

Le dernier objectif de ce travail a été d'intégrer ces différents résultats afin d'être en mesure de mieux comprendre l'effet de contraintes hydrodynamiques croissantes sur les biofilms électroactifs déjà développés dans notre réacteur de Couette Taylor électrochimique.

**CHAPITRE 2 : INFLUENCE DE
L'HYDRODYNAMIQUE SUR LES REACTIONS
ELECTROCHIMIQUES EN REACTEUR DE
COUETTE-TAYLOR**

Pour donner suite au développement du réacteur électrochimique de Couette-Taylor durant la phase initiale du projet de thèse, la caractérisation de l'effet des écoulements sur les réactions électrochimiques a été réalisée. Il s'agit d'une première étape de caractérisation dans un électrolyte bien défini, préalable à l'utilisation du réacteur pour suivre le développement de biofilms électroactifs. Pour cela, nous nous sommes appuyés sur deux articles de la littérature (Gabe and Robinson, 1972a, 1972b) qui avaient proposé une analyse théorique de l'influence de régimes de Couette-Taylor laminaires et turbulents sur les cinétiques électrochimiques. En revanche, aucune caractérisation n'a été donnée pour les régimes de transition marqués par la présence de vortex de Taylor. L'objectif principal de ce chapitre est donc de mesurer expérimentalement l'impact des différents écoulements sur la cinétique des phénomènes électrochimiques au sein de ce réacteur, et de confronter ces observations par rapport à théorie en apportant en particulier un éclairage complémentaire sur les phénomènes en jeu dans les régimes de transition.

Des réactifs modèles, le ferrocyanure et ferricyanure en présence de tampon phosphate ont ainsi été utilisés en différentes concentrations pour pouvoir caractériser plus précisément la réaction d'oxydation aux anodes. Des voltammétries cycliques ont permis notamment de déterminer les courants limites de la réaction d'oxydation et de s'assurer que chaque électrode répondait de façon similaire. Les résultats de ce Chapitre 2 sont présentés sous forme d'un article soumis dans « Chemical Engineering Science » sous l'intitulé « First electrochemical Couette-Taylor reactor for studying the influence of transport phenomena on electrochemical kinetics ». L'analyse réalisée pour un grand nombre d'électrodes (20 disponibles) témoigne d'une bonne répétabilité expérimentale. Les faibles variations obtenues ont été attribuées principalement aux modifications périodiques des courants mesurés engendrées par la rotation du cylindre intérieur et corrigées dans ce chapitre. Les données de courants limites extraits des voltammétries ont aussi permis de déterminer l'épaisseur de la couche de diffusion électrochimique aux différents régimes hydrodynamiques dans le cas de couple redox ferri/ferrocyanure. Une relation adimensionnelle a pu être exprimée pour les différents régimes de Couette-Taylor entre la contrainte hydrodynamique représentée par le nombre de Taylor et les phénomènes de transferts matérialisés par le nombre de Sherwood. Ces observations expérimentales en réacteur de Couette-Taylor ont ensuite été comparées avec les autres résultats obtenus avec des électrodes à cylindres tournants et les modèles théoriques de la littérature. Nos résultats sont cohérents avec les modèles théoriques et permettent de les préciser pour les écoulements à vortex turbulents.

2. FIRST ELECTROCHEMICAL COUETTE-TAYLOR REACTOR FOR STUDYING THE INFLUENCE OF TRANSPORT PHENOMENA ON ELECTROCHEMICAL KINETICS

Author names and affiliations

Florent Bouchon¹, Alain Bergel², Ahlem Filali¹, Théodore Bouchez¹ and Yannick Fayolle¹

¹Université Paris-Saclay, INRAE, PRocédés biOtechnologiques au Service de l'Environnement, 92761 Antony, France

²Laboratoire de Génie Chimique, Université de Toulouse, CNRS, INP, UPS, Toulouse, France

Corresponding author email yannick.fayolle@inrae.fr

Highlights

- The first electrochemical multi-electrode Couette-Taylor reactor was developed
- Electrochemical responses to flow regimes were experimentally characterized
- Transition from a turbulent vortex to turbulent flow is not shown electrochemically
- Vortices and turbulence are the main driving forces of electrochemical reactions

Abstract

This study presents the first electrochemical Couette-Taylor reactor (eCTR). It was implemented with 20 large electrodes exposed to the same hydrodynamics from Taylor numbers (Ta) of 144 to 28,800. The limiting currents (I_L) recorded with hexacyanoferrate (III/II) at different concentrations and at different Ta were used to calculate the Nernst diffusive layer thickness (δ_N , ranged from 14.6 to 423 μm). Two hydrodynamic regimes were identified: the wavy (Ta from 144 to 1,440) and the turbulent ($Ta > 2,200$) vortex flows which corresponded to the correlations $\delta_N \propto Ta^{-0.44}$ and $\delta_N \propto Ta^{-0.70}$, respectively. The second correlation confirmed the theoretical equation established by Gabe & Robinson for turbulent flow. In contrast, the wavy vortex flow cannot be approached by the laminar or turbulent hypothesis. Dimensionless correlations gave comparable results between the eCTR and rotating cylinder electrodes under turbulent vortex flow and confirmed the specific behavior of the Couette-Taylor wavy vortex flow.

Keywords

Nernst model – Turbulent flow – Vortex flow – Microbial electrochemical technology – Dimensionless characterization

Acknowledgements

The support of the French ANR for the PhD grant of Florent Bouchon within BIOTUBA project (ANR-17-CE06-0015-01, 2018-2023) and of the DRRT Île-de-France for the financing of the reactor and the experiment are greatly appreciated. The company STIM participated in the design of the reactor. The partners of the BIOTUBA project (6TMIC and SIAAP) are also gratefully acknowledged.

2.1 INTRODUCTION

Electrochemical systems are used in many industrial applications (Kumar et al., 2021; Larcher and Tarascon, 2015; Santhosh et al., 2016; Seh et al., 2017) and microbial electrochemical technologies constitute an emerging field with multiple promising applications for power generation, resource recovery, chemicals production and sensing (Al-Mamun et al., 2018; Dau et al., 2010; Dessi et al., 2021; Li et al., 2018; Logan and Rabaey, 2012; Modin and Aulenta, 2017; Santoro et al., 2017; Wang and Ren, 2013). In such bio-electrochemical systems, multi-species biofilms play the role of the catalyst since they are able to exchange electrons with electrodes on which they develop (Kumar et al., 2016; Zhao et al., 2021). The influence of electrolytes, electrode materials (Guo et al., 2017) and electrochemical parameters (applied current density and voltage or potential (Molderez et al., 2021)) on the reaction associated with different physical parameters such as temperature, conductivity, pH and hydrodynamics are often studied to optimize these technologies (Lusk et al., 2016; Raphael Rousseau et al., 2020). However, the impact of fluid dynamics on electroactive biofilms has been poorly investigated despite its major influence on their growth (Islam et al., 2019; Jones and Buie, 2019; Moss et al., 2020) and current density generation (Amirdehi et al., 2022; Krieg et al., 2018).

The experimental requirements to adequately study the influence of hydrodynamics on biofilm growth and long-term maturation are indeed numerous: (i) the electrode size needs to be large enough to allow recovery of biofilm samples in sufficient quantity for complete microbial characterization, (ii) the set-up should allow continuous feeding and a homogeneous distribution of substrate along the entire surface of the electrodes, (iii) multiple electrodes exposed to the same controlled hydrodynamic conditions need to be present to allow a sufficient level of measurement replication, which is mandatory considering the intrinsic experimental variability of biological systems under complex and variable media conditions during long-term experiments.

Experimental systems have been designed to study the impact of hydrodynamics on

biofilms in continuous flow such as flow cells (Adesokan et al., 2016; Amirdehi et al., 2022; Krieg et al., 2018; Noël et al., 2019). These flow cells were used to study precise hydrodynamics in microfluidic channels where the shear stress is induced by the flow rate (Ren et al., 2014). In the specific case of electroactive biofilms, flow cells allowed their development on small electrodes implemented in the cell (generally up to 1 cm²) so that the same shear stress could be applied over the entire surface. Experiments were run at daily and weekly scales (Bazant et al., 2004). They were often combined with noninvasive imaging technologies such as microscopy to analyze a biofilm's structural parameters (thickness, density, porosity, etc. (Böl et al., 2009; Picioreanu et al., 2009)) over time making it possible to characterize the biofilm. However, several limitations appeared due to their small size, which makes it impossible to sample the biofilm over time or have replicates under identical operating conditions.

Other systems have been employed to study the impact of fluid dynamics on electrochemical technologies (Colli and Bisang, 2019; Perry et al., 2020). The best-known systems are the rotating disk electrodes described by Levich, (1962). Electrochemical reactions take place on the surface of a small rotating electrode ($\leq 1\text{cm}^2$) and the current is expressed as a function of the rotation speed. Nonetheless, only a few studies have shown biofilm development on rotating disk electrodes (Herbert-Guillou et al., 2001). Some variants such as rotating cylinder electrodes (RCEs) implement a cylinder-electrode immersed in the electrolyte, as described by Eisenberg et al., (1954). They were adapted to larger surfaces of electrodes ($> 10\text{ cm}^2$) (Gabe et al., 1998; Silverman, 2004; Walsh et al., 2017), but RCEs have mainly been described considering abiotic mass transfer and not for the study of electroactive biofilms (Eisenberg et al., 1954).

Couette-Taylor reactors (CTRs) have a perfectly described hydrodynamic profile and have often been used for the study of biofilm development for scale-up purposes (Paul et al., 2012; Rochex et al., 2008; Schrimpf et al., 2021). They are composed of two concentric cylinders, with a rotating inner cylinder and a fixed outer cylinder (respectively characterized by the radii R_i and R_o). The main differences of CTRs in comparison to RCEs are the various hydrodynamic conditions from well-known Couette flow to 3D typical vortex flows or turbulent flows induced by the specific influence of the stationary outer wall (Schrimpf et al., 2021). CTRs may apply a higher range of shear stress values induced on the surface of the inner cylinder, classically from 0.1 to 10 Pa in aqueous media (Paul et al., 2012; Simões et al., 2022), compared to rotating electrodes under high shear stress and turbulent flows (Ige et al., 2013; Labraga et al., 2002). In previous studies, CTRs were used to study the influence of hydrodynamics on physical biofilm properties and allowed characterization and sampling of biofilm over time (density, thickness, porosity, etc.) (Derlon et al., 2008; Hou et al., 2020; Paule et al., 2011; Rizk et al., 2021). However, these reactors have not been adapted to integrating electrodes into the set-up in order to study electroactive biofilms.

Actually, some work has been done to couple electrochemistry analysis with CTR hydrodynamics. Sobolík et al., (1995) introduced a single three-segment electrodiffusion probe in two different CTRs with a radius ratio R_i/R_o of 0.84 and 0.7, respectively. They thus characterized components of the shear rate on the outer wall under wavy vortex flows. Berrich et al., (2016) characterized Couette-Taylor-Poiseuille flows (for vortex and wavy vortex regimes) in a larger CTR (radius ratio, 0.86), implementing 39 microelectrodes distributed along the circumference and a vertical segment of the outer cylinder. Legrand et al., (1980) provided one of the first characterizations of the mass transfer occurring in Couette-Taylor-Poiseuille flows for wavy vortex flows using electrochemical measurement in the CTR (radius ratio, 0.78). Their reactor integrated a three-segment inner cylinder (composed of the cathode framed in the anode). Nevertheless, these methodologies were developed to study hydrodynamics and mass transfer in CTRs and did not investigate electrodes allowing biofilm development: (i) microelectrodes for Sobolík et al., (1995) and Berrich et al., (2016) and (ii) a nickel cathode covered with platinum and gold for Legrand et al., (1980), which are not the preferred materials for biofilm growth (Song et al., 2015).

This study presents the first electrochemical CTR. The main specificities of this reactor are (i) 20 graphite electrodes included in the inner rotating cylinder providing replicates in exactly the same hydrodynamic conditions, with (ii) a large surface (20 cm²) under uniform well-known hydrodynamics, allowing (iii) spontaneous biofilm development in real conditions including complex effluents but with (iv) independent electrical connections for each electrode. This design offers a study system that has the potential to facilitate the scaling up of microbial electrochemical technologies (MET) by enabling specific investigations into biofilm behavior, which is not feasible with existing systems. The study of MET necessitates the use large-surface electrodes to address spatial heterogeneity of biofilms and facilitate sampling of significant biofilm volumes (for microbial analysis or structural characterization). In our opinion, the eCTR is currently the most suitable option available, as large rotating electrode cannot ensure the required homogeneous distribution of velocity from the center to the circumference of the electrode. Therefore, the scale-up of MET now presents a chemical engineering challenge due to the inadequate reproducibility of the large-scale electrodes in systems with poorly controlled or characterized hydrodynamics. In contrast to rotating electrodes, the eCTR has the capability to overcome these limitations.

The reactor is characterized experimentally for various operating conditions under wavy and turbulent vortex flows without biofilm development considering (i) the electrochemical parameters, (ii) the small ascendant flow rate, (iii) the concentration of the electroactive species and (iv) the effect of the rotation speed of the inner cylinder. Then the results are interpreted in light of Gabe & Robinson's theoretical analysis (Gabe and Robinson, 1972a, 1972b), which describes the relation between current intensity and the flow velocity in laminar (Gabe and Robinson, 1972a) and turbulent flow regimes (Gabe and Robinson, 1972b). Finally, the results are compared to previous studies on

different hydrodynamic regimes (Eisenberg et al., 1954; Legrand et al., 1980), and the potential application of the electrochemical CTR for future studies is discussed.

2.2 MATERIALS AND METHODS

2.2.1 Electrochemical Couette-Taylor Reactor (eCTR)

The Couette-Taylor reactor was composed of two 25-cm-high coaxial cylinders (Figure 2.1A). The rotating inner cylinder, 7 cm in radius, included 20 graphite-plate (Sigaform HLM, Graphitech) working electrodes inlaid in the PVC cylindrical core. Each working electrode had a surface of $20 \times 1 \text{ cm}^2$; 18 cm of each graphite plate was immersed in the solution (see Figure 2.1A). The active projected area of each working electrode was thus 18 cm^2 . Each electrode was individually connected to the external electrical circuit using a rotating collector (SVTS C 03-S-A-00/18). The central axis of the inner cylinder was mechanically connected to a motor (APM-SA01) by means of a speed reducer (PLGE12/1 $i=9$) and could thus be rotated at speeds from 1 to 200 RPM. The non-mobile outer cylinder, made of stainless steel (316L), 10 cm in radius, was used as the auxiliary electrode. A calomel reference electrode (SCE, BioLogic, $+0.244 \text{ V/SHE}$) was positioned between the two cylinders about 1.5 cm from the outer cylinder. In this reactor, each working electrode was set in a 3-electrode channel of the potentiostat. The potentiostat continuously controls the potential of each working electrode and records the current produced by this electrode without any limitation from the auxiliary electrode (Bard and Faulkner, 2000).

The lid and the base of the reactor were made of PVC. The reactor was set in a solution circulation loop equipped with a peristaltic pump (Gilson), which provided a flow rate of 700 mL.h^{-1} (axial solution velocity in the reactor, 4.38 cm/h). The effect of this imposed axial flow on mass transport was verified and could be considered as insignificant (see Supplementary 2A). The flow inlet was at the reactor bottom and the outlet ensured a water level of 20 cm, i.e. 3.6 L of solution in the reactor. All experiments were conducted in a 25°C temperature-regulated room.

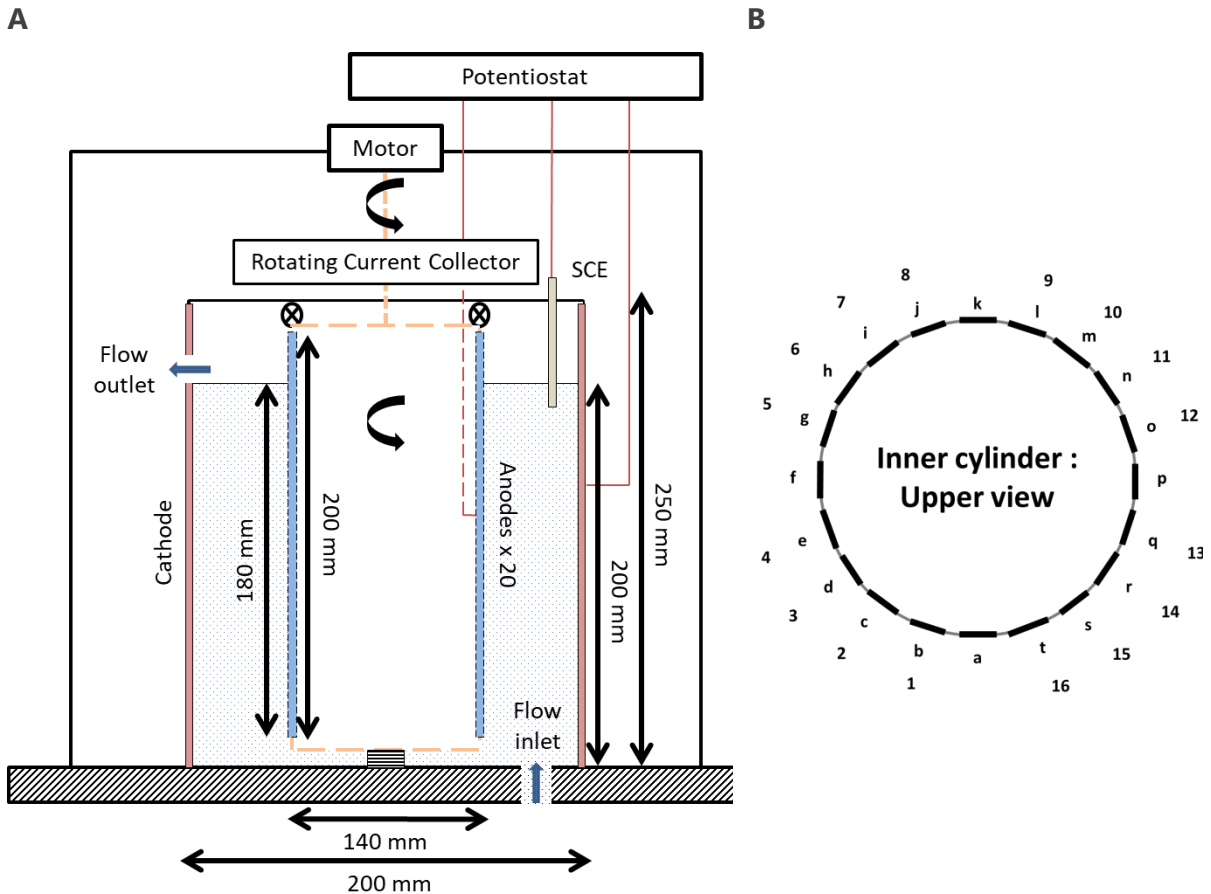


Figure 2.1: A) Diagram of electrochemical Couette-Taylor reactor and B) top view of the inner cylinder with the position of the electrodes.

Up to 16 working electrodes could be individually addressed with a multi-channel potentiostat (VMP-3, Biologic) equipped with two Nstat boxes (Biologic). Eight working electrodes were connected to each Nstat box. Each working electrode was identified by a letter from *a* to *t* (Figure 2.1B). Electrodes *b* to *j*, excluding electrode *f*, were connected *via* an Nstat to tracks 1-8 of the potentiostat. The other group, from *l* to *t*, excluding electrode *p*, were connected to tracks 9-16 *via* the other Nstat. This set-up allowed each working electrode to be individually monitored as a single three-electrode set-up, while only one auxiliary electrode and one reference electrode were used for the entire system. The outer cylinder was used as the common auxiliary electrode. Four electrodes (*a*, *f*, *k* and *p*) were not electrochemically connected. They will serve as controls in future experiments investigating microbial electroactive biofilms.

Cyclic Voltammetry (CV) was performed with scan rates from 1 to 100 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ within the range of -0.35 to $+0.65$ V/SCE. Three successive cycles were systematically performed. The first cycle was sometimes slightly different from the second and third cycles, which were always identical. All the data reported in the present study were extracted from

the second CV cycles.

2.2.2 Solutions

Solutions of equimolar potassium hexacyanoferrate (III) and hexacyanoferrate (II) ($\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$) were used at different concentrations, from 1 mM to 20 mM. Hexacyanoferrate was chosen as the model electroactive species because it has commonly been used as a probe electrochemical molecule to check the electrochemical characteristics of all types of carbon-based electrodes (Valentini et al., 2003; Zhou et al., 2009). The solution was supplemented with mono-basic and di-basic phosphate (NaH_2PO_4 and Na_2HPO_4) 100 mM. The potassium, sodium and phosphate ions provided the main part of ion migration in solution and the migration contribution can be ignored in the mass transport of hexacyanoferrate.

The diffusive coefficient of hexacyanoferrate (II) is given by the Stokes-Einstein relation at 25°C and is equal to $5.09 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$.

2.2.3 Theoretical description

2.2.3.1 Hydrodynamic modeling

The flow regimes in CTR are described according to the dimensionless Taylor number (Ta) (Racina and Kind, 2006) which characterizes the centrifugal force applied to the liquid in relation to the viscous force the liquid opposes to motion:

$$Ta = \frac{\omega \sqrt{R_i (R_o - R_i)^3}}{\nu} \quad (2.1)$$

where ω is the angular velocity ($\text{rad} \cdot \text{s}^{-1}$), R_i and R_o the radii of the inner and the outer cylinder (m) and ν the cinematic viscosity ($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$).

The Ta number describes the different flow regimes according to the value it takes regarding a critical value Ta_c (Esser and Grossmann, 1996; Mehel et al., 2005):

$$Ta_c = 20.65 \frac{R_o \left(1 + \frac{R_i}{R_o}\right)^2}{R_i \sqrt{\left(1 - \frac{R_i}{R_o}\right) \left(3 + \frac{R_i}{R_o}\right)}} \sqrt{\frac{R_o - R_i}{R_i}} \quad (2.2)$$

For the eCTR designed in this study, $R_o = 0.10 \text{ m}$, $R_i = 0.07 \text{ m}$ (corresponding to a radius ratio of 0.7) and $\nu = 10^{-6} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ give $Ta_c = 53.0 [-]$, which corresponds to the critical velocity value ω_c of $0.039 \text{ rad} \cdot \text{s}^{-1}$ ($n_c = 0.37 \text{ RPM}$). The reactor was operated with different values of n from 1 to 200 RPM (respectively, 1, 3, 5, 6.5, 8, 10, 15, 25, 50,

100, 150 and 200). The correspondences between Ta values, the flow regimes ω values are given in Table 2-1. This choice was made considering the capacity of the motor to ensure stable rotating velocity values and in order to cover the largest velocity ranges and associated flow regimes (from vortex to turbulent vortex regimes, according to Table 2-1).

The Sherwood number (Sh) characterizes the ratio of the convective and diffusive mass transport (Bird et al., 2006):

$$Sh = \frac{K_L L}{D_i} \quad (2.3)$$

where K_L is the convective mass transfer coefficient ($\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$), $L = R_o - R_i$ the characteristic length in Couette-Taylor reactors, which is the gap between the inner and the outer cylinder (m), and D_i is the effective diffusive coefficient ($\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$).

The Sherwood number is generally expressed as a function of the Reynolds number (Re) and the Schmidt (Sc) number defined by $Sc = \nu/D_i$, according to experimental correlations.

Table 2-1: Couette-Taylor flow regimes, and corresponding Ta , rotation speed equivalent boundaries and shear stress values

Regime	Ta range	Ta values	ω ($\text{rad}\cdot\text{s}^{-1}$)	n (RPM)	τ (mPa)
Couette Laminar	$Ta < Ta_c$	$Ta < 53$	$\omega < 0.039$	$n < 0.37$	$\tau < 0.09$
Vortex	$Ta_c < Ta < 1.27 Ta_c$	$53 < Ta < 67$	$0.039 < \omega < 0.049$	$0.37 < n < 0.47$	$0.09 < \tau < 0.11$
Wavy vortex	$1.27 Ta_c < Ta < 40 Ta_c$	$67 < Ta < 2120$	$0.049 < \omega < 1.55$	$0.47 < n < 14.8$	$0.11 < \tau < 27$
Turbulent vortex	$40 Ta_c < Ta < 700 Ta_c$	$2120 < Ta < 37100$	$1.55 < \omega < 27$	$14.8 < n < 258$	$27 < \tau < 4300$
Turbulent	$Ta > 700 Ta_c$	$Ta > 37100$	$\omega > 27$	$n > 258$	$\tau > 4300$

Under laminar flow conditions (Table 2-1), the velocity of a Couette-Taylor flow U ($\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) depends only on the distance from inner cylinder r and is given by Labraga et al., (2002):

$$u = \omega R_i^2 \frac{\left(\frac{1}{r} - \frac{r}{R_o^2}\right)}{\left(1 - \frac{R_i^2}{R_o^2}\right)} \quad (2.4)$$

Under laminar flow conditions, the fluid shear stress is a function of the fluid velocity and the dynamic viscosity according to:

$$\tau = \mu \frac{du}{dy} \quad (2.5)$$

where τ is the shear stress applied on the cylinder wall (Pa), μ is the dynamic viscosity (Pa.s) and u the fluid velocity (m.s⁻¹), y the perpendicular direction according to the inner cylinder surface (m).

Earlier work in the literature (Racina and Kind, 2006) describes the expression of the shear forces applied to the rotating inner wall as a function of the Reynolds number under Couette-Taylor flows:

$$\tau = 2.13 \frac{(R_i/R_o)^{3/2}}{[(R_o-R_i)/R_o]^{7/4}} Re^{1.445} \frac{\rho v^2}{2\pi R_i^2} \quad \text{For } Ta > 530 \quad (2.6)$$

$$\tau = 0.113 \frac{(R_i/R_o)^{3/2}}{[(R_o-R_i)/R_o]^{7/4}} Re^{1.764} \frac{\rho v^2}{2\pi R_i^2} \quad \text{For } Ta > 6,800 \quad (2.7)$$

where ρ is the fluid density (kg.m⁻³).

2.2.3.2 Gabe & Robinson model for laminar flow

In Couette-Taylor laminar flows, Gabe and Robinson, (1972a) have expressed the relation between the current density on the electrode surface and the angular velocity of the rotating cylinder, at steady state. The detailed demonstration is recalled in Supplementary 2B, in which all the hypotheses for the application are developed and constant values are recalculated. The final equation is:

$$I = \frac{3^{4/3}}{2\Gamma(1/3)} n_e F S D_i^{2/3} (c_b - c_s) M^{-1/3} \left(\frac{1 + R_i^2 / R_o^2}{1 - R_i^2 / R_o^2} \right)^{1/3} \omega^{1/3} \quad (2.8)$$

where Γ is the Gamma function, n_e is the number of electrons produced per molecule of electroactive species, F is the Faraday constant (96 485 C.mol⁻¹), S is the surface area of the electrode (m²), D_i is the effective diffusive coefficient (m².s⁻¹), c_b and c_s the concentrations of the electroactive species in the bulk and at the electrode surface, respectively (mol.m⁻³), and M the width of the electrode (m).

The limiting current I_L is defined as the maximum value of the current that can be

reached when only the diffusion transport is rate-limiting, i.e., when the electrochemical reaction is so fast in relation to mass transport that the electroactive species reacts at the electrode surface as soon as it reaches it. Using Eq. (2.8) gave the expression of I_L :

$$I_L = \frac{3^{4/3}}{2\Gamma(1/3)} n_e F S D_i^{2/3} C_b M^{-1/3} \left(\frac{1 + R_i^2 / R_o^2}{1 - R_i^2 / R_o^2} \right)^{1/3} \omega^{1/3} \quad (2.9)$$

Comparison with the Nernst model expression (see Supplementary 2B) allows extracting an expression of an equivalent Nernst layer in the laminar condition ($\delta_{N-Gabe\ lam}$):

$$\delta_{N-Gabe\ lam} = \frac{2\Gamma(1/3)}{3^{4/3}} D_i^{1/3} M^{1/3} \left(\frac{1 + R_i^2 / R_o^2}{1 - R_i^2 / R_o^2} \right)^{-1/3} \omega^{-1/3} \quad (2.10)$$

The Sherwood number could then be expressed according to Eq. (2.3) and (2.10), with $K_L = \frac{D_i}{\delta}$ as:

$$Sh = Re^{1/3} Sc^{1/3} \frac{3^{4/3}}{2\Gamma(1/3)} \left[\frac{(R_i - R_o)^2 (1 + R_i^2 / R_o^2)}{R_i M (1 - R_i^2 / R_o^2)} \right]^{1/3} \quad (2.11)$$

2.2.3.3 Gabe & Robinson model for turbulent flow

Gabe and Robinson, (1972b) have also established a relationship between the current density and the velocity of the rotating cylinder for turbulent conditions. The Supplementary 2B includes the complete demonstration explaining, most particularly, Prandtl-von Karman's three-zone model used to establish the equations (Figure S2B), with minor clarifications. It led to expressing I_L as:

$$I_L = n_e F S \left(\frac{B R_i}{\nu} \right)^{1/3} D_i^{2/3} C_b \omega^{2/3} \quad (2.12)$$

where B is a constant that was recalculated in the Supplementary 2B adding more precision to the work of Gabe and Robinson, (1972b).

Comparison with the Nernst expression (see Supplementary 2B) allows extracting an equivalent Nernst layer in the turbulent condition ($\delta_{N-Gabe\ turb}$) as:

$$\delta_{N-Gabe\ turb} = \left(\frac{D_i \nu}{B R_i} \right)^{1/3} \omega^{-2/3} \quad (2.13)$$

which gives the Sherwood number according to Eq. (2.3) and (2.13):

$$Sh = Re^{2/3} Sc^{1/3} \left(\frac{B(R_o - R_i)}{R_i} \right)^{1/3} \quad (2.14)$$

2.3 RESULTS

2.3.1 Preliminary characterization of the reactor: Nernst layer thickness without rotation

Cyclic voltammetry (CV) was performed at $1 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ in phosphate solution that contained hexacyanoferrate (III) and hexacyanoferrate (II) at equal concentrations ranging from 0 to 20 mM. Figure 2.2 shows a correct linear relationship between the I_L values extracted from the CV curves and the hexacyanoferrate (II) concentrations, with a slope of $0.21 \text{ A}\cdot\text{m}^3\cdot\text{mol}^{-1}$. According to the Nernst hypothesis, this slope value corresponds to a Nernst diffusion layer thickness δ_N of $423 \text{ }\mu\text{m}$ (Eq. (2.13) with $5.09 \times 10^{-10} \text{ m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ for the hexacyanoferrate (II) diffusion coefficient and 18 cm^2 for the electrode surface area).

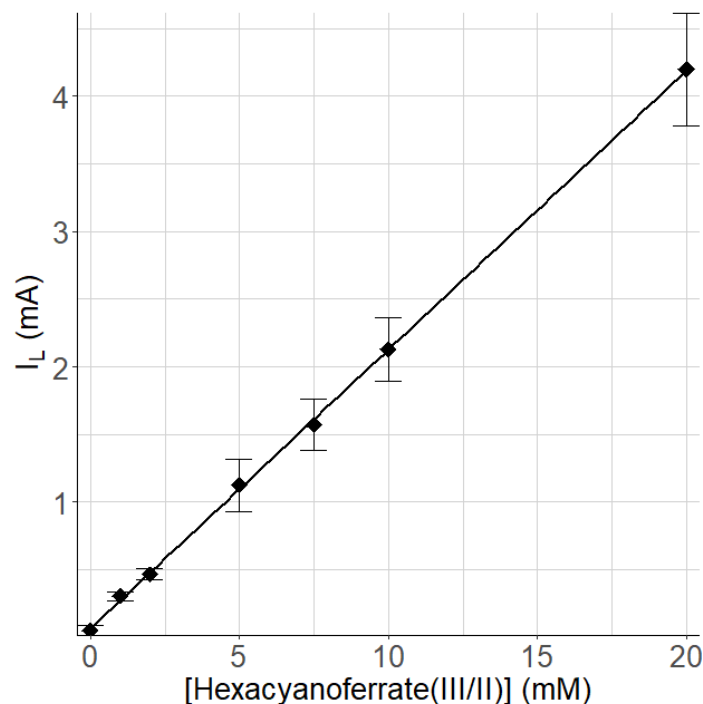


Figure 2.2: Experimental relation between I_L and the hexacyanoferrate (II) concentration without rotation of the inner cylinder.

I_L values were obtained from the CV recorded at $1 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$; average values and standard deviations resulted from CV performed on 15 electrodes (except electrode t on Figure 2.1B). The regression line corresponds to $I_L = 0.07 + 0.21C_b$ with $R^2 = 0.9995$.

In fact, from a fully rigorous theoretical standpoint, the Nernst hypothesis should not

be used in the absence of stirring, as was the case here, but the equation of semi-infinite linear diffusion should be applied. Nevertheless, the estimation of a Nernst layer thickness is a relevant criterion for evaluating possible hydrodynamic disturbance at the electrode surface. In quiescent solution, parasite stirring may occur due to natural convection or parasitic motion, vibrations transmitted to the reactor for example. In quiescent condition, the thickness of the Nernst layer is typically within the range of a few hundred μm ; values ranging from 100 to 500 μm have been reported in the literature (Bagot'skii, 2006; Dexter and Lin, 1992; Zelinsky and Pirogov, 2008). The high value of 423 μm obtained here confirmed that the continuous solution flow did not induce parasitic motion of the solution near the electrode surface.

2.3.2 Impact of hydrodynamics on the current produced by hexacyanoferrate (II) oxidation

2.3.2.1 *Correction of the effect of electrode rotation on the current measured*

With the rotation of the inner cylinder, the CV records were of extremely poor quality because of large discrepancy in the values of the current measured. By increasing the measurement frequency in order to monitor the rapid current variations, it was observed that the current was disturbed in a regular periodic way, with a period corresponding to the time for a complete rotation of the cylinder. The reference electrode was located at a fixed point in the crown between the inner and outer cylinders (Figure 2.1). Each working electrode, 1 cm wide, represented a small section of the inner cylinder. As the cylinder rotated, the distance of each working electrode from the reference varied from about 2 cm, when facing the reference, to half a circumference (around 24 cm) when facing the opposite direction. The periodic variation of the distance of the working electrode from the reference induced the periodic variation of the potential of the working electrode, which was responsible for the periodic variation of the current measured. The current value measured was thus overestimated when the working electrode was moving toward the reference electrode and underestimated when moving away; it causes the perturbation shown in Figure 2.3.

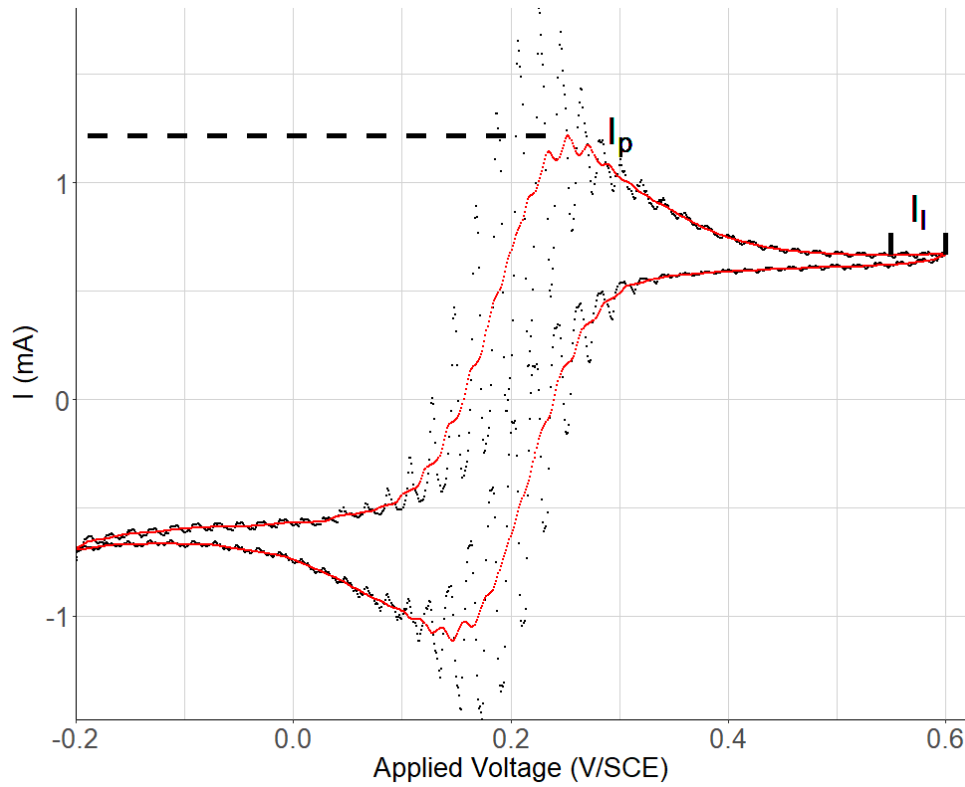


Figure 2.3: Numerical processing of the CV records.

Raw data (black) obtained from the second CV cycle of the anode i immersed in hexacyanoferrate (III/II) 1 mM with the supporting electrolyte, with a flow rate of 700 mL.h⁻¹. CV was performed using a scan rate of 1 mV.s⁻¹ for $Ta = 432$, the fitted curve (red) after applying a moving average on $\Delta V = 20 \text{ mV.rot}^{-1}$. The values of I_p and I_L are represented.

This periodic perturbation of the current was corrected by numerically processing the raw data. In Figure 2.3, an example of raw data is given (black points) and the same curve is represented after applying a moving average correction (red curve). The correction according to the moving mean was applied to the Volt interval ΔV , which corresponded to the potential range that was scanned during one rotation of the inner cylinder. ΔV expressed in V.rot⁻¹ corresponded to the ratio of the scan rate σ (V.s⁻¹) to the rotation speed of the inner cylinder n (RPM):

$$\Delta V = \frac{\sigma \times 60}{n} \quad (2.15)$$

This correction was systematically used to interpret the CV records and extract the characteristic values of I_p and I_L . It was mainly used to determine a more precise value for I_p for which periodic variations would have overestimated its value.

2.3.2.2 Determination of the limiting currents as a function of rotation speed

CVs were recorded at 1 mV.s⁻¹ in phosphate solutions that contained equal

concentrations of hexacyanoferrate (II) and hexacyanoferrate (III) ranging from 0 to 20 mM. The eCTR was continuously fed with the solution at 700 mL.h⁻¹. The Taylor numbers described by the experiments ranged from 144 to 28,800, which gave a complete picture of the wavy vortex and turbulent vortex flow regimes (Table 2-1). CV the records were exploited by using the limiting current values because, when the limiting current plateau is reached, hydrodynamics has the highest possible impact. The electrochemical reaction is so fast in relation to mass transport that only the mass transport rate affects the current value. It is thus not necessary to introduce a specific electrochemical kinetics model, as the concentration of the reactive species is assumed to be zero at the electrode surface. Moreover, this condition corresponds to the common theoretical approaches (Eq. (2.9) and (2.12) e.g.). The limiting current I_L was measured as the mean value of the oxidative plateau of the CV records observed at the upper values of the potential. I_L was represented as a function of the concentration of hexacyanoferrate (II) in the bulk for different rotation speeds (Figure 2.4A). The average values and standard deviations were calculated from the measurements obtained from the 15 individually addressed electrodes, which were implemented for each experimental condition.

In most cases, the CV records presented the well-known current peaks (in both oxidation and reduction parts of the CV), which showed the transient rate-limiting effect of mass transfer during the potential scan (Figure 2.4B). Considering the oxidation part ($I > 0$ A), during the scan in the positive direction, when the potential applied to the working electrode became higher than the equilibrium potential, oxidation at the electrode surface consumed the electroactive species, leading to the formation of the diffusive layer. When the applied potential increased quickly, high transient currents were produced, but mass transfer was not able to provide a sufficiently high flow of electroactive species to balance the electrochemical consumption, and consequently the current decreased. This is the reason for the current peak observed at low hexacyanoferrate (II) concentrations and low rotating speeds. In contrast, at high hexacyanoferrate (II) concentrations and high rotating speeds, mass transport was more efficient and able to compensate the consumption of the electroactive species, so that a stationary state was reached in a wide range of the potential scan. The transient peak vanished as the concentration and the rotating speed increased (Figure 2.4C).

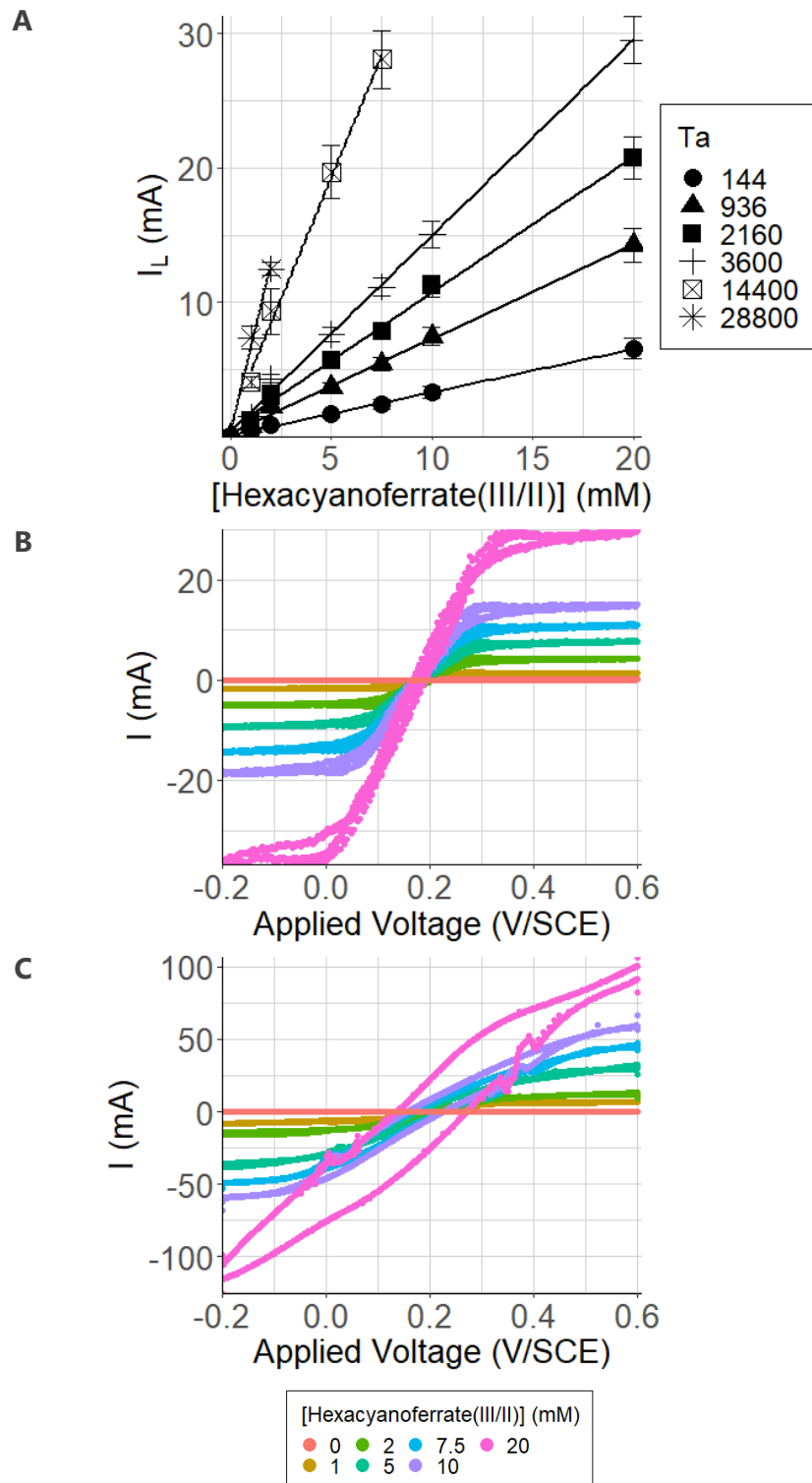


Figure 2.4: CVs recorded with various hexacyanoferrate (III/II) concentrations and various Taylor numbers.

Only six conditions are plotted among the 13 tested the six other conditions (without $Ta = 0$ already plotted in Figure 2.2), the equations of the regression lines and the R^2 values are given in Figure S2 1 and Table S2 1 respectively. A) I_L values as a function of the hexacyanoferrate (II) concentration, mean and standard deviations resulted from the measurements of 15 electrodes (except electrode t in Figure 2.1B). B) CV curves from electrode c at $Ta = 3600$ and

C) $Ta = 28,800$.

When the potential was high enough, only the mass transfer was rate-limiting and the value of the current no longer depended on the value of the potential; the current displayed a horizontal plateau on the CV records. Obtaining the I_L value was not straightforward for the highest concentration (10 and 20 mM) and at Taylor numbers ($Ta \geq 7,200$) because, in these conditions, mass transport tended to be less rate-limiting. The potential of the upper limit of the CV scan was not high enough to rigorously reach the horizontal plateau that characterizes the limiting current (Figure 2.4C). Nevertheless, it was not possible to use higher potential values without reaching the water oxidation range. In this case, I_L was not determined and the associated values were excluded from further analysis (as 20 mM for $Ta = 7200$ in Figure 2.4A).

2.3.3 Evolution of the diffusive layer thickness with hydrodynamics: evidencing the impact of wavy (WVF) and turbulent vortex flow (TVF)

The eCTR was operated in the rotation speed range from 1 to 200 RPM, corresponding to Taylor numbers from 144 to 28,800 (i.e., $2.7Ta_c < Ta < 544Ta_c$), so that different hydrodynamic regimes, from the wavy vortex to turbulent vortex flows, could be covered (see Table 2-1). To analyze the impact of the hydrodynamic regime on the electrochemical reactions, the limiting current I_L was represented as a function of Ta using a log scale for the different concentrations of hexacyanoferrate (II) selected (Figure 2.5A).

With no electroactive species, the velocity had no significant effect on the limiting current ($I_{L0mM} \approx 70 \mu A$ for each Ta), showing that the residual currents were likely due to adsorbed species rather than soluble species contained in the solution. For each concentration from 1 to 20 mM, a log-linear increase of the limiting current with the rotation speed was observed, highlighting the decrease in the limitation due to mass transfer. To illustrate the influence of hydrodynamics independently of the concentration of the reactive species, the Nernst-diffusive layer thickness (δ_N) was calculated using Eq. S6 (Figure 2.5B) and by considering $I_L - I_{L0mM}$ for the calculation. Figure 2.5B presents the diffusion layer thickness δ_N calculated from the experimental data as a function of Ta using a log scale. A significant difference is observed between the curve for a 2-mM concentration of hexacyanoferrate (II) and the other concentrations. This difference may be related to an experimental bias for intermediate values of Ta from 720 to 7,200. Consequently, this concentration is no longer considered for further data exploitation.

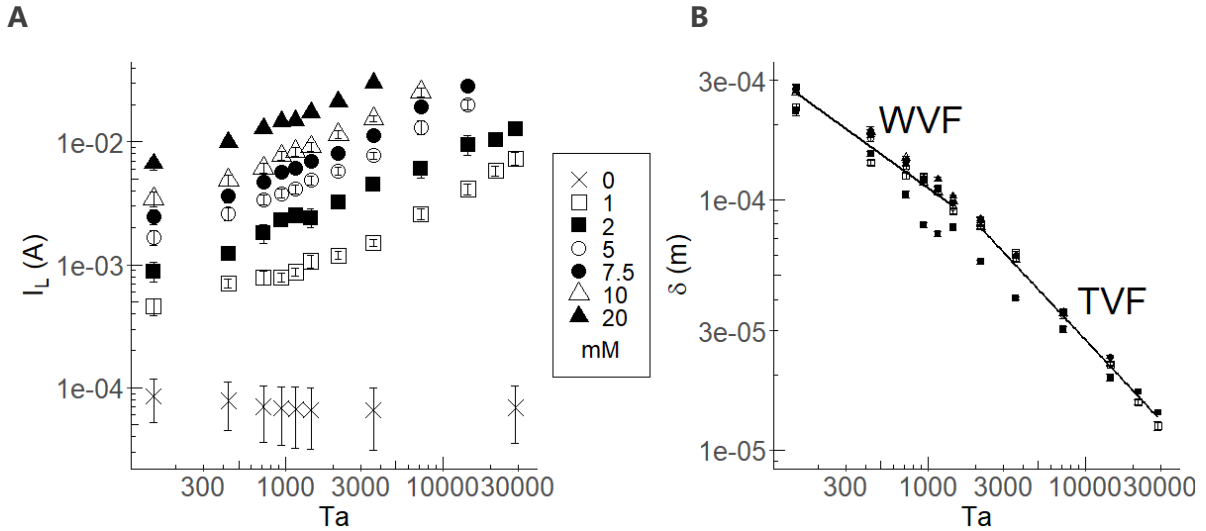


Figure 2.5: A) Effect of the Taylor number on the I_L value obtained on CV at various concentrations of hexacyanoferrate (II). B) Effect of the angular velocity on the diffusive layer thickness.

Data recorded at 2 mM are represented in the graph, but they were excluded from the regressions. WVF: wavy vortex flow; TVF: turbulent vortex flow. Data are represented on a log scale; each point is the average value obtained from 15 electrodes (except electrode t in Figure 2.1B). Error bars are shown to be representative of the standard deviation, but they are small considering the point size (except for the 0-mM condition).

The increase in the rotation speed of the inner cylinder induced a velocity profile gradient along the gap between the two cylinders with a maximum velocity near the inner cylinder where the anodic reaction was located. As expected, δ_N decreased with higher rotation speed.

Moreover, by considering the experimental points for all concentrations, two distinct linear evolutions are observed, with a modification of the slope for a Taylor number within the range from 1,440 to 2,200. This slope break showed the transition between the wavy vortex and the turbulent vortex flows, and confirms the boundary of $40 Ta_c$.

For each flow regime identified (WVF and TVF for $Ta < 1,440$ and $Ta > 2,200$, respectively), the Nernst-diffusive layer thickness (and the associated limited current I_L) varied with the Taylor number according to a power law, as expected from the theory for laminar and turbulent flows in Eq. (2.10) and (2.13):

$$\delta_N = 10^{-K} Ta^{-\alpha} \quad (2.16)$$

Values of K and α resulting from numerical fitting of the experimental data are provided in Table 2-2. The value of the α coefficient (0.44 and 0.70 for WVF and TVF, respectively) is sensitive to the modification of the flow regime as the coefficient K (2.6 and 1.7 for WVF and TVF, respectively). Their dependency on the flow regime is linked to the

difference in the physical nature of the flows, from a more structured one for the WVF to a more heterogeneous and chaotic flow for the TVF. These results help describe the two different Couette-Taylor vortex flows by estimating the Nernst-diffusive layer thickness using electrochemical tools and confirmed the boundary value between these two regimes.

Table 2-2: Values of the experimental coefficient of the log correlation of the diffusive layer and the concentration of the electroactive species $\delta_N = 10^{-K} Ta^{-\alpha}$.

Values are given for each concentration and for the total dataset.

Hexacyanoferrate (III/II) (mM)	Wavy vortex flow			Turbulent vortex flow		
	K_{WVF}	α_{WVF}	R^2	K_{TVF}	α_{TVF}	R^2
1	2.8	0.38	0.96	1.7	0.73	1.00
5	2.5	0.47	1.00	1.9	0.67	1.00
7.5	2.5	0.47	0.99	1.8	0.68	1.00
10	2.6	0.45	0.98	1.9	0.66	1.00
20	2.6	0.42	0.99	1.8	0.69	-
Total set	2.6	0.44	0.96	1.7	0.70	0.99

2.4 DISCUSSION

2.4.1 Flow characterization using micro-electrodes in CTR

Couette-Taylor hydrodynamics has already been investigated using microelectrodes integrated into the outer cylinder. Kristiawan et al., (2019) according to Sobolík et al., (1995) characterized axial and azimuthal components of the shear rate on the wall of the outer cylinder of a CTR using a microelectrode. They measured the limiting current I_L with the three-segment microelectrodes on the surface of the outer cylinder and deduced the shear rate ($\dot{\gamma}$) and the associated shear stress ($\tau = \mu\dot{\gamma}$) from the rotation speed of the inner cylinder. Under the laminar condition, their results confirmed the theoretical evolution of the limiting current according to shear rate $I_L \propto \dot{\gamma}^p$ (Eq. (2.9) for shear rate within the range $4 - 80 \text{ s}^{-1}$) with an experimentally determined value $p = 0.31$ (close to the theoretical value of 0.33).

As the fluid velocity is directly related to shear rate τ in Couette-Taylor flows (Eq. (2.6) or (2.7) depending on the flow regime), it is possible to express the limiting current obtained by Kristiawan et al., (2019) according to Sobolík et al., (1995) as a function of the rotation speed for wavy vortex flows, as $I_L \propto \omega^\alpha$. This gave $\alpha = 0.45$ considering Eq. (2.6) for the shear rate range tested. The same approach has been considered by Berrich et al., (2016) with the same parameter values p for the calculation of the shear rates giving the components of the vortices on the outer wall using more electrodes.

Those results obtained under wavy vortex conditions showed α values (0.45) that were similar to the results presented here on the rotating inner cylinder (0.44). Considering non-laminar conditions by comparison of the theoretical value of Gabe and Robinson, (1972a), this tends to show the major effect of vortices on the electrochemical reactions next to the CTR walls, even next to the outer wall due to the divergence with laminar theoretical behavior.

The approach used in the present study with large and numerous electrodes also shows reliable and reproducible results such as those obtained with much more precise electrodes used for an accurate understanding of hydrodynamics in a CTR.

2.4.2 Comparison between RCE and CTR with experimental and theoretical results from the literature

Rotating cylinder electrodes (RCEs) are reactors in which a cylinder is rotating in the electrolyte with no influence of the reactor's outer wall on the flow (Eisenberg et al., 1954). A RCE could thus be considered a CTR with a radius ratio (R_i/R_o) so small that the impact of the outer cylinder can be ignored. In comparison, CTRs are characterized by the major influence of the outer wall on the flow and with conversely a high radius ratio. It is generally observed in the literature that Couette-Taylor flows appear from a radius ratio of 0.5, giving typical RCEs with a radius ratio below this value (Monico et al., 2014; Schimpf et al., 2021).

It is still necessary to investigate those flow differences on electrochemical reactions. To help compare these reactors, the Ta number can be considered a form of the Reynolds number Re adapted to the specific geometry of the CTR:

$$Ta = Re \sqrt{\frac{(R_o - R_i)}{R_i}} \quad (2.17)$$

where $Re = \frac{\omega R_i (R_o - R_i)}{\nu}$

Correlations have been established on different devices between the Sherwood numbers and the Reynolds numbers, as shown in Figure 2.6. For comparison, Sherwood numbers were calculated from the present work (Eq. (2.3)) using the average value of the Nernst-diffusive layer for each rotation speed.

Earlier studies have characterized the influence of mass transfer in RCEs (Walsh et al., 2017). One of the main studies focusing on hydrodynamics in RCEs was reported by Eisenberg et al., (1954). They considered the effect of various geometries (with a radius ratio from 0.2 to 0.4) and a Reynolds number from 1,000 to 100,000 (corresponding to

the range of the Taylor number from 660 to 6,600 for the eCTR presented in this study). They characterized mass transfer on the rotating cylinder-electrode surface. Eisenberg et al., (1954) gave an α value that differed by only 6% from the data under turbulent vortex flow from the present study, as shown in Figure 2.6 (from Eq. (2.16)). Thus, the present work gave similar results to those in RCEs for turbulent flows due to the lower influence of the fixed outer cylinder on hydrodynamics at the inner cylinder wall under a turbulent regime.

A mass transfer analysis of a CTR was also made electrochemically by Legrand et al., (1980) with an inner cylinder containing both a cathode and an anode in a device with a radius ratio of 0.8 (gap between the two cylinders, 5 mm) with Ta values from 200 to 1,600. They followed the impact of vortices and axial flow on the reduction reaction that occurred on the inner cylinder rotating electrode by measuring the Sherwood number. Without axial flow, i.e., for operating conditions equivalent to those in the present study, the Sherwood expression reveals similar behavior in the Re range corresponding to wavy vortex flow ($Re < 2,400$). There was a mean 13% difference in Sherwood numbers between the empirical correlation of Legrand et al., (1980) and the experimental points (with a maximum 15% difference for $Ta = 1,150$), related to experimental measurement accuracy and reproducibility.

The Sh versus Re correlations calculated from the theoretical models of Gabe and Robinson, (1972a, 1972b) (Eq. (2.9) and (2.12)) are also presented in Figure 2.6. Parameter B from Eq. (2.12) was estimated at $B = 5.71 \times 10^{-3}$ [–] using the experimental data under turbulent vortex flows. The correlations are represented with dotted lines for a wide range in terms of the Reynolds number even if they are only applicable in strictly laminar and turbulent flow, respectively.

The theoretical model of Gabe and Robinson, (1972a, 1972b) states two different behaviors. Figure 2.6 shows an excellent correspondence between the experimental points for turbulent vortex flows and this theoretical model. The hypothesis made by Gabe and Robinson, (1972a, 1972b) to establish their equations for the turbulent flows could therefore be applied to data obtained in turbulent vortex flow. In this regime, the main part of the mass transport is due to turbulence. Likewise, results from Eisenberg et al., (1954) follow this tendency and could corroborate the negligible part of the vortex transport in turbulent vortex flow.

A different behavior appears for wavy vortex flow, which was not described theoretically (Gabe and Robinson, 1972a). The data recorded at this regime match neither the theoretical curves for the laminar flow nor those for the turbulent flow. It emphasizes the impact of another phenomenon than those described theoretically for Re values, which may be due to vortices. Sherwood numbers are also slightly higher in the experimental approach under wavy vortex flows than in laminar theory, which corroborates the role of the vortex in increasing the transfer close to the electrode

surface for such rotation speeds (Figure 2.6).

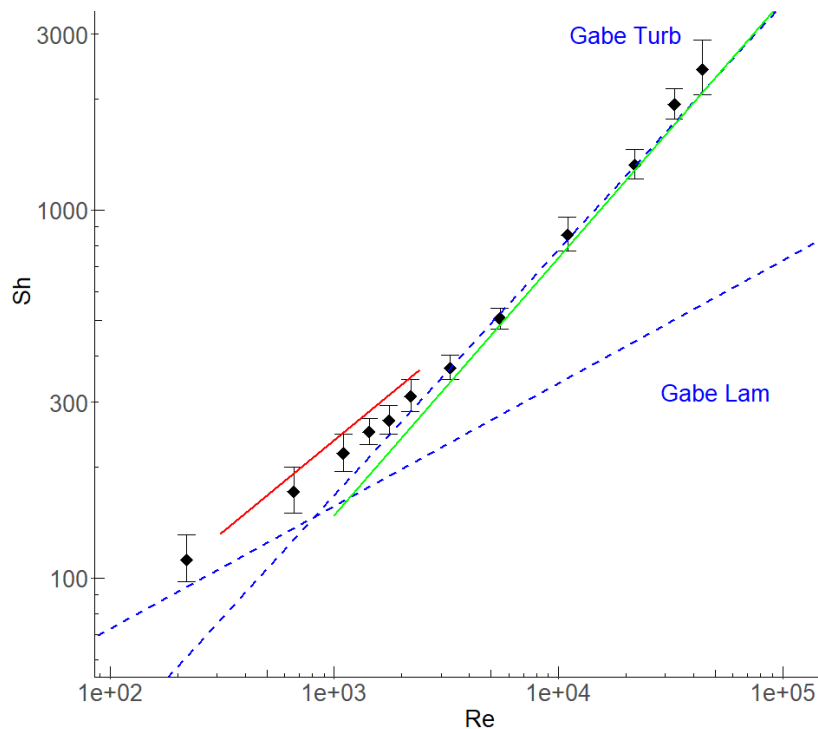


Figure 2.6: The Sherwood number (Sh) as a function of the Reynolds number (Re).

Comparison of correlations from Eisenberg et al., (1954) in green, in the CTR of Legrand et al., (1980) in red and with the theoretical equations of Gabe and Robinson, (1972a, 1972b) represented by the dashed blue line using $B = 5.71 \times 10^{-3}[-]$, versus the experimental data (\blacklozenge obtained with the five concentrations for the 15 electrodes except electrode t in Figure 2.1B).

The eCTR developed here gave results that matched the experimental and theoretical results reported in the literature for identical flow regimes. Moreover, it enriches the former results by characterizing the wavy vortex regimes, which were clearly distinct from the turbulent vortex flows.

2.4.3 Characterization of coupled fluid dynamics and electrochemical modeling in Couette-Taylor vortex flows

The range of Couette-Taylor flows is described in Table 2-3, providing a new point of view on the transition between vortices and turbulence besides their impact on electrochemical reactions.

The present eCTR made it possible to control diffusive layer thickness ranging from 15 to 423 μm (Table 2-3). For microbial electrochemical processes, this thickness range is interesting regarding the thickness of electroactive biofilms, which commonly ranges from 20 to 250 μm (Lusk et al., 2016; Pereira et al., 2022; Tejedor-Sanz et al., 2018). Indeed, shear stress is a promising way to control biofilm development (Paul et al.,

2012; Stoodley et al., 1999), coupled with the control of mass transfer close to the electrode. The shear stress is also known as an important factor that influences biofilm structural properties (Ige et al., 2013; Rochex et al., 2008; Simões et al., 2022). In non-electroactive biofilms, increased shear is known to enhance particle detachment at the surface of the biofilm, which often leads to the formation of a thin and dense biofilm (Paul et al., 2012; Stoodley et al., 1999). Nevertheless, such investigations are rarely done on electroactive biofilms. The eCTR developed herein allowed applying a range of shear stress from 10^{-4} to 10 Pa (from Eq. (2.6) and (2.7)) versus 10^{-1} to 10^2 for the RCE (Silverman, 2004). These shear stress values can be applied to up to 20 biofilm duplicates developed in exactly the same hydrodynamic condition. This should be a powerful tool to explore the influence of shear stress on the formation, maturation, electrochemical efficiency and, possibly, regeneration of electroactive biofilms (Bridier et al., 2015).

Table 2-3: Key parameters of the study

Flow characteristics	Taylor range	n (RPM)	Nernst diffusive layer thickness (μm)	Shear stress (mPa)	α value
No rotation	Ta=0, Axial flow ≈ 0	0	423	$\tau \approx 0$	NA
WVF	$140 \leq Ta \leq 2100$	$1 \leq n \leq 14.8$	$274 \geq \delta_N \geq 84.5$	$0.1 \leq \tau \leq 40$	0.44
TVF	$2100 \leq Ta \leq 29000$	$14.8 \leq n \leq 200$	$94.3 \geq \delta_N \geq 14.6$	$40 \leq \tau \leq 2700$	0.70

2.5 CONCLUSION

The proposed eCTR is able to describe electrochemical kinetics in controlled hydrodynamic conditions decoupled from the flow input for low axial flow rates. The results are repeatable on the 16 electrodes connected.

The characterization of the electrochemical response was made as a function of the flow regime. The electrochemical diffusive layer thickness (δ_N) on the surface of the inner cylinder was extracted from the limiting current values (I_L) and correlated with the rotation speed of the inner cylinder. These relations are given as function of the Couette-Taylor flow regime and are then linked to the shear stress resulting from hydrodynamics. This characterization is necessary to further understand how biofilm development can affect the electrochemical response.

The CTR vortices profoundly influence the electrochemical behavior for lower fluid dynamics. The vortices are responsible for the main part of the mass transport under the wavy vortex flow while turbulence is responsible for most of the mass transport in

the turbulent vortex flow. The results of this study contribute to better understanding the role of fluid dynamics on electrochemical reactions in Couette-Taylor reactors.

The current study can be regarded as a validation of the proposed technology using an abiotic model. Beyond electrode response characterization in abiotic electrolytes, the use of the eCTR would be particularly suitable for the study of the influence of hydrodynamics on biofilm growth on large electrode surfaces with convenient replicates. The eCTR would provide a better understanding of the relations between the activity of biofilms and hydrodynamic conditions and would give keys for better control of biofilms in microbial electrochemical technologies.

**CHAPITRE 3 : PREMIER REACTEUR
ELECTROCHIMIQUE DE COUETTE-TAYLOR
POUR LE DEVELOPPEMENT D'UN BIOFILM
ELECTROACTIF SOUS HYDRODYNAMIQUE
CONTROLEE EN EAUX USEES URBAINES
REELLES**

La caractérisation de l'influence de l'hydrodynamique sur les réactions électrochimiques au sein du réacteur de Couette-Taylor a permis d'identifier l'effet particulier des vortex et de la turbulence. L'objectif de ces expérimentations était aussi de donner les éléments de compréhension et de lever les verrous pour permettre la mise en œuvre d'une expérimentation biotique plus long terme dans le réacteur de Couette-Taylor électrochimique. Ainsi, la reproductibilité des courants générés par les différentes électrodes a été validée en conditions abiotiques. La gamme de contraintes hydrodynamiques envisagées dans l'étude biotique a aussi été testée et validée. Les différentes contraintes opérationnelles associées à la mise en œuvre du réacteur, comme l'effet de la vitesse de rotation sur la mesure du courant ou l'effet du débit axial sur l'hydrodynamique ont aussi été étudiées et ont pu être respectivement corrigées et négligées.

Ainsi, pour les expérimentations biotiques, une contrainte hydrodynamique a été choisie pour limiter l'influence de la turbulence tout en maximisant l'apport de substrat du fait d'une fine couche de diffusion. Un cisaillement de 8,3 mPa (correspondant à une vitesse de rotation de 5 RPM) a ainsi été choisi pour développer un biofilm électroactif à partir d'un inoculum provenant d'eaux usées décantées. Ce chapitre 3 présente les résultats de croissance de ce biofilm sur 77 jours d'opération à cisaillement contrôlé. L'objectif principal de ce chapitre est de montrer l'influence d'une hydrodynamique contrôlée pour obtenir des biofilms électroactifs de façon répétable et fiable. Cette expérimentation a aussi permis de mieux comprendre la phase de développement de biofilms et l'évolution de leur activité et de leur composition au cours du temps. Les résultats principaux de ce chapitre sont présentés sous forme d'un article intitulé «First microbial electrochemical Couette-Taylor reactor for biofilm development under controlled hydrodynamics in real urban wastewater » en cours de soumission à Bioressource Technology. Dans cet article, le fonctionnement en conditions biotiques du réacteur est décrit en conditions hydrodynamiques contrôlées. Des potentiels différents ont pu être appliqués et testés grâce au grand nombre d'électrodes disponibles.

3. FIRST MICROBIAL ELECTROCHEMICAL COUETTE-TAYLOR REACTOR FOR BIOFILM DEVELOPMENT UNDER CONTROLLED HYDRODYNAMICS IN REAL URBAN WASTEWATER

Author names and affiliations

Florent Bouchon¹, Ahlem Filali¹, Chrystelle Bureau¹, Théodore Bouchez¹, Alain Bergel² and Yannick Fayolle¹

¹Université Paris-Saclay, INRAE, PRocédés biOtechnologiques au Service de l'Environnement, 92761 Antony, France

² Laboratoire de Génie Chimique, Université de Toulouse, CNRS, INP, UPS, Toulouse, France

Corresponding author email yannick.fayolle@inrae.fr

Acknowledgements

The support of the French ANR for the PhD grant of Florent Bouchon in the framework of the project BIOTUBA (ANR-17-CE06-0015-01, 2018-2023) and of the DRRT Île-de-France for the financing of the reactor and the experiment are greatly appreciated. The STIM Company has participated to the design of the reactor. The partners of the project BIOTUBA (6TMIC and SIAAP) are also gratefully acknowledged.

Abstract

Geobacter has been identified as a main bacterium responsible for the electroactivity in microbial anodes. However, many studies have displayed decreasing activity overtime associated with high variability between replicates. This work demonstrates in real urban wastewater that jointly controlling hydrodynamics (8.3 mPa) and applied potential (in the range of -300 to 0 mV/SCE) is sufficient to obtain repeatable biofilm performances and composition for a three-month experiment. Microbial species diversity and activity were jointly assed by 16S rDNA and rRNA sequencing. Relative abundance of rRNA exhibited clear and consistent variations over time. At lower potential, *Geobacter*-related populations were very active over the whole experiment. Strikingly, the long-term decrease of current density on all electrodes was consistently associated with increasing activity of putative methanogenic and sulfidogenic autotrophic populations. Our results suggests that the development over time of direct interspecies electron transfer between *Geobacter* and the autotrophic microbial community members is mainly responsible of the long term decrease of current densities in electroactive biofilms.

Highlights

- Electroactive biofilms developed under controlled hydrodynamics at low shear stress
- Reproducible biofilms obtained on triplicated electrodes at various potentials
- Microbial communities diversity and activity dynamics monitored during 77 days
- *Geobacter* activity remains stable despite decreasing current density
- Development of autotrophic activity suggests interspecies electron transfer overtime

Keywords

Couette-Taylor reactor – Electroactive biofilm – Applied potential – Hydrodynamics – Sequencing – Microbial populations

3.1 INTRODUCTION

A research interest on electroactive biofilms has been developed to understand the complex mechanisms occurring during their growth and maturation in microbial electrochemical technologies (Babauta et al., 2012; Logan, 2010; Santoro et al., 2017). A mature biofilm was often characterized with low performances, high variability and decreasing activity overtime, which especially limited electrochemical performances of the systems at larger scales (Asensio *et al.*, 2017; Babanova *et al.*, 2020; Kamali *et al.*, 2023).

To overcome limitations associated with biofilm maturation, electroactive biofilms have been developed in different experimental systems, on many electrode materials, from diverse inocula, under synthetic or real media. The applied potential was shown to have strong effect on biofilm composition and performance, but results are often scattered between replicates and among studies. Torres *et al.* (2009) used wastewater activated sludge as inoculum to develop electroactive biofilm on graphite electrodes under pure acetate continuous feed. They reported a faster growth of electroactive biofilm at low potential (-0.15 and -0.09 V/standard hydrogen electrode [SHE]), which produced the higher current densities with *Geobacter* as the main genus. Conversely, high-applied potential (0.37 V/SHE) formed biofilms with higher microbial diversity, in which *Geobacter* remained the most abundant species. Nevertheless, the repetition of the experiment showed variability (not quantified by the authors) of current density generated over a 30-day period and of microbial communities developed at high potential, especially for 0.37 V/SHE. This variability was confirmed in Ying *et al.* (2017), who quantified a variation of the maximal current density from 4 to 18% between two runs under pure acetate feeding.

In longer experiments, Chang *et al.*, (2022) reported high variability of current generation overtime (67 days) in microbial fuel cells operated at different potentials and with synthetic wastewater. The variability of the current ranged from 38 to 148% depending on the potential. Significant variations was also reported by Yu *et al.* (2022) in microbial fuel cells operated with domestic wastewater. The electroactive biofilms were developed under applied potential, for 50 days, and then let at open circuit. The variability of the potential measured at the end of the experiment ranged from 18 to 61% between electrode duplicates.

To assess the extent of the intrinsic variability observed between the replicates, some work has been made to develop high-throughput experiments, increasing the number of replicates using a 128-electrode array (Molderez *et al.*, 2021). This work has also demonstrated some current density variability between the electrode replicates (from 4 to 19% with seven replicates, for each condition tested).

In these studies, hydrodynamics has been poorly investigated or controlled. A magnetic stirrer is often used and usually provides good mixing in small volume water-like solutions but it does not allow a precise control of the hydrodynamics and most likely generates a heterogeneous distribution of shear stress on the electrodes surface (Li *et al.*, 2015). This may explain the high variability between the replicates and possibly over the course of the experiments. Indeed, in the general context of biofilm studies, hydrodynamics has been shown to be an important factor controlling substrate transport and mechanical stress. Therefore, it influences both biofilm composition and structure. In general, low shear stress (under 300 mPa) prevents excessive biofilm detachment and lead to the formation of a thick and relatively loose biofilm. Conversely, biofilms developed at high shear stress are often thinner and denser (Coufort - Saudejaud *et al.*, 2007). Their microbial catalytic role are maximal for an optimal value of shear stress depending on the biofilm function targeted (Escudié *et al.*, 2011; Hou *et al.*, 2022). Hydrodynamics impact has started being investigated in electroactive biofilms only very recently (Jones and Buie, 2019; Moss *et al.*, 2020; Pinck *et al.*, 2020). The main experimental devices used to characterize its effect were often flow cells, which are more adapted to small electrodes and limit the extrapolation of the results to larger systems. In short, the high variability between the replicates shown in electroactive biofilms studies may be related to the absence of electrochemical reactor suitable for both the precise control of hydrodynamics and long-term culture of biofilms giving results appropriate for extrapolations.

To understand the complex behavior of multi-species electroactive biofilm, coupled electrochemical and microbial characterizations are often realized. Microbial species relative abundance has been quantified using 16S rRNA gene sequencing (16S rDNA), to identify the main electroactive species (Logan *et al.*, 2019). Nevertheless, exclusive 16S rDNA analysis could lead to different interpretations when taking into account abundant inactive microorganisms (inhibited or dead cells) or non-detecting rare

species that have high activity. Consequently, sequencing the complementary DNA of the 16S rDNA transcript (16S rRNA) was shown in other fields (drinking water biofilms or benthic biofilms) to be a powerful tool to understand biofilm behavior (Henne *et al.*, 2012; Wilhelm *et al.*, 2014). Nonetheless, to the best of our knowledge, microbial activity has still not been quantified in electroactive biofilms.

To overcome the lack of experimental device able to control hydrodynamics accurately, an electrochemical Couette-Taylor reactor (eCTR) has been developed recently (Chapter 2). The reactor has up to twenty electrodes with large surface areas (active surface of 18 cm²), allowing a representative quantity of biofilm to be sampled. All the twenty electrodes were operated under the identical hydrodynamic conditions and were independently electrically connected. This device allows following the impact of the applied potential on biofilm growth using several replicates for each potential value, all exposed to strictly identical hydrodynamic conditions.

In this study, the eCTR was used to develop electroactive biofilms at different applied potential values under identical well-controlled hydrodynamics and using primary wastewater supplemented with acetate to promote electroactive biofilm formation (Chang *et al.*, 2022; Yu *et al.*, 2022). Biofilms were monitored over 77 days at low shear stress. The value of 8.3 mPa was chosen, it was significantly lower than the theoretical value of 300 mPa where detachment could appear (Coufort - Saudejaud *et al.*, 2007) and similar value was taken in the literature when studying low hydrodynamics impact on electroactive biofilms (Jones and Buie, 2019). These conditions were applied to promote stable growth and maturation (Moss *et al.*, 2020). Current was continuously measured throughout the experiment. The electrochemical behavior of the biofilms was described by cyclic voltammetry. The characterization of both microbial composition and activity (through 16S rDNA and 16S rRNA sequencing) was carried out at two specific operation periods of the reactor: right after the end of the current density increase phase (day 13) and on mature biofilms (day 62 and 77).

3.2 MATERIAL AND METHODS

3.2.1 Reactor and effluent

The electrochemical Couette-Taylor reactor (eCTR) was composed of two coaxial cylinders of 25 cm height. Twenty graphite-plate (Sigraform HLM, Graphitech) working electrodes were inlaid in the rotating inner cylinder made of PVC (7 cm radius). The outer cylinder (10 cm radius), made of stainless steel (316L), was used as the auxiliary electrode. Each working electrode had an active projected area of 18 cm². The motor connected to the rotating inner cylinder was controlled with a speed variator (BAS-5/230-4). A saturated calomel reference electrode (SCE, BioLogic, +0.244 V/SHE) was positioned between the two cylinders about 1.5 cm from the outer cylinder. More details on the eCTR design can be found in Chapter 2. Figure 3.1 provides a diagram

of the experimental set-up.

The shear stress applied on the electrodes surface was controlled and kept at a constant value of 8.3 mPa, with the inner cylinder rotating at 5 RPM, according to former characterization (Bouchon *et al.*, 2023).

Wastewater was collected weekly after a primary settler from an urban wastewater treatment plant (Saint-Cyr-l'École and Bailly in the Parisian area) to feed the eCTR. It had a total and soluble chemical oxygen demand (COD) concentrations of 340 ± 60 mg.L⁻¹ and 170 ± 20 mg.L⁻¹, respectively. The primary wastewater was supplemented with 1 g.L⁻¹ of sodium acetate (CH₃COONa). The supplemented wastewater was stored at 4°C in a feed tank and replaced weekly (Figure 3.1). The feed flow rate was set at 120 mL.h⁻¹ to have a hydraulic retention time of 31 h in the eCTR.

A 150-mL bottle was used to collect the effluent of the eCTR to measure COD and monitor pH/temperature (InPro 4010/120/Pt100). Samples were collected from the bottle to measure total COD and soluble COD after filtration at 0.2 µm with HACH LCK 514 kits. The amount of COD removed was calculated according to:

$$COD_r = COD_i - COD_o \quad (3.1)$$

where COD_i and COD_o are the COD measured in the reactor entrance and in the outlet sampling bottle respectively (mg.L⁻¹).

They were measured every day.

The feed tank and the eCTR were flushed with N₂ every day during 1 h for sample collection, respectively in the bulk liquid and in the reactor gas headspace to avoid air introduction into the reactor in order to guaranty anaerobic conditions. Experiments were conducted in a 25°C temperature-regulated room.

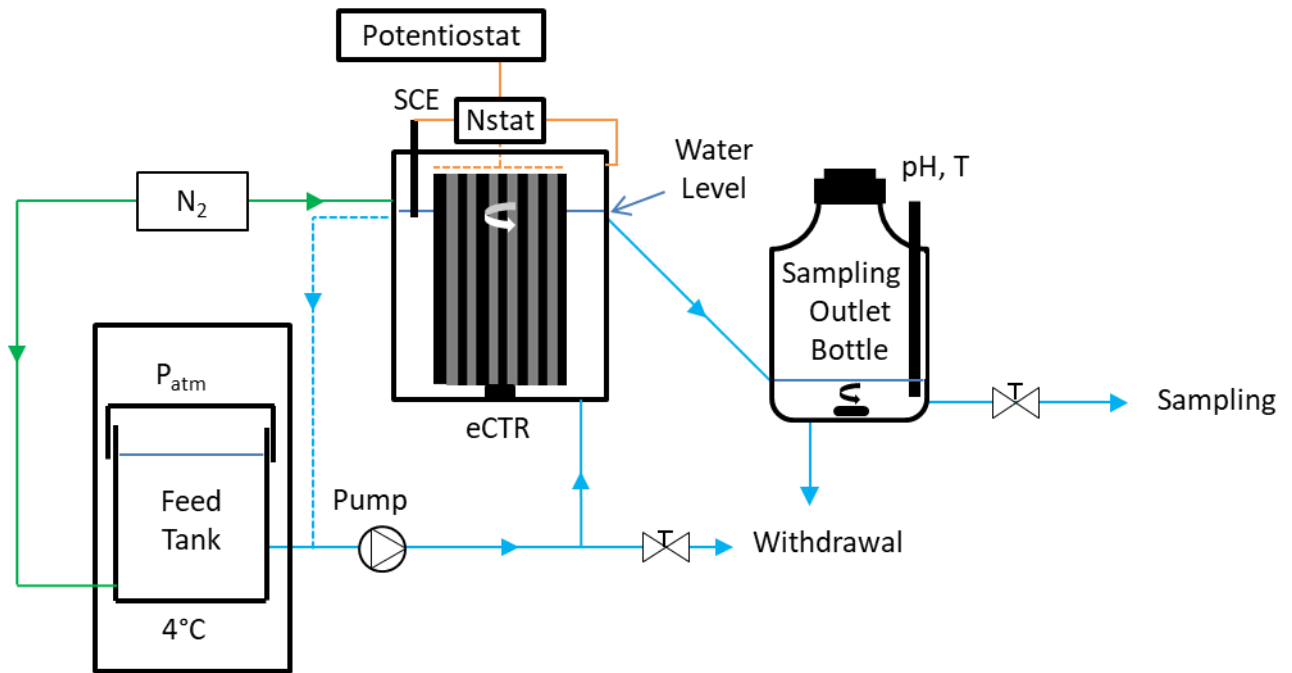


Figure 3.1: Diagram of the experimental set-up.

Color code: blue for liquid flows, green for nitrogen gas circulation and orange for electrical connections. The dotted blue line represents the recirculation mode of the eCTR.

3.2.2 Electrochemical analysis

Sixteen working electrodes (out of twenty) were individually addressed with a multi-channel potentiostat (VMP-3, Biologic). Two Nstat boxes (Biologic) were used to integrate each working electrode in a three-electrode set-up with the SCE as the reference electrode and the outer cylinder as the auxiliary electrode (Figure 3.1).

Four different potential values (-300, -150, 0 and 150 mV/SCE) were applied to twelve of these sixteen working electrodes, each potential being applied to three electrodes (triplicates) and the current produced by each electrode was measured every minute. Four electrodes were let at open circuit potential (OCP). The four remaining electrodes were electrochemically not connected (NC). Both OCP and NC electrodes were used as negative controls.

Cyclic Voltammeteries (CV) were performed at scan rates of $1 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. They were carried out four times (dotted lines in Figure 3.2): A) on day 0, before biofilm growth, B) when the maximum currents were reached on day 13, C) on day 62 and D) on day 77, close to the end of the experiment. Three successive cycles were systematically performed. The first cycle was sometimes slightly different from the second and third cycles, which were always identical. All the data reported in the present study were extracted from the second CV cycles. The limiting current density value (j_L) was extracted from the oxidative plateau of the CV curves. The rotation speed of the inner cylinder was kept at 5 RPM during the CV runs in order to maintain the hydrodynamics conditions. Periodic

perturbations occurred due to the variation of the distance between the working electrodes (on the rotating cylinder) and the SCE (fixed in the crown of the eCTR), they were corrected applying a moving average on the corresponding voltage interval as explained previously (section 2.3.2.1):

$$\Delta V = \frac{\sigma \times 60}{\omega} \quad (3.2)$$

where ΔV in $V \cdot \text{rot}^{-1}$, σ is the CV scan rate velocity ($V \cdot s^{-1}$) and ω the rotation speed of the inner cylinder (RPM).

3.2.3 Microbial analysis

Sampling of the upper part of the biofilm developed on the electrode (from 2.5 cm under the water level) was carried out on days 13, 62 and 77. Each individual sample represented a colonized surface of 2.5 cm². DNA and RNA were extracted from the samples using the ZymoBIOMICS DNA/RNA Miniprep Kit (Zymo Research). From a total biofilm lysed volume of 400 μL , 80 μL of genomic DNA (gDNA) and RNA were obtained. iScript Reverse Transcription Supermix was then used for the reverse transcription of the RNA into cDNA. gDNA and cDNA concentrations were measured with the Qubit fluorescent dye assay (Invitrogen).

The V4-V5 region of 16S rDNA and rRNA amplification from total gDNA and cDNA extracted, bacterial community study and sequences library treatment were made according the detailed protocol of Philippon *et al.*, (2021).

The operational taxonomic unit (OTU) table was then analyzed and visualized with R V4.2.2 (2022-10-31 ucrt) on the genus taxonomic level. The normalization of the OTU table was made with the number of total OTU for each sample. It gave the relative abundance for each population of the desired taxonomic level according to:

$$RA_i (\%) = \frac{OTU_i}{\sum_{i=1}^n OTU_i} \quad (3.3)$$

3.2.4 Principal component analysis (PCA)

Principal component analysis (PCA) was used to convert normalized samples (loadings) and possibly correlated variables into a set of vectors expressed in dimensionless principal components. The R package FactomineR was used (Lê *et al.*, 2008). The OTU were expressed as the log value of the number of OTU on the geometrical mean of the total OTU for each sample, by adding 1 OTU for each value in order to avoid 0 values according to:

$$RA_i (\log) = \log \left(\frac{OTU_i + 1}{\sqrt[n]{\prod_{i=1}^n (OTU_i + 1)}} \right) \quad (3.4)$$

The relative abundance calculated according to the geometric mean gives more weight to the low abundant samples varying overtime.

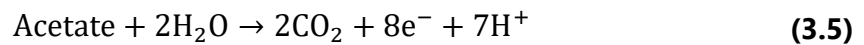
For each sample, 16S rDNA and rRNA were studied separately.

3.3 RESULTS AND DISCUSSION

3.3.1 Effect of applied potential on electroactive biofilms under low shear stress

3.3.1.1 Electrolysis

Twelve electroactive biofilms were developed under four applied potentials (-300, -150, 0, +150 mV/SCE in triplicates) on graphite electrodes. These four potentials were all above the formal equilibrium potential of acetate oxidation:



with the redox potential $E_{\text{Acetate}}^0 = -572$ mV/SCE at 25°C, pH = 8 (R K Thauer et al., 1977). These values correspond to the range of potentials commonly used in the literature for the formation of microbial anodes (Chang et al., 2022; Molderez et al., 2021; Rimboud et al., 2014; Torres et al., 2009).

The current records showed a similar current generation during the three-month experiment for all electroactive biofilms, regardless of the applied potential (Figure 3.2). Three phases were characterized (i) a latency phase (from day 0 to 3), (ii) an exponential growth phase with a progressive increase in the current density (from day 3 to 10 or 12 depending on the electrode) and finally (iii) since day 13, a maturation phase characterized by a continuous decrease of the electroactivity overtime.

For the applied potential values of -300, -150 and 0 mV/SCE, the three replicates produced similar current records, with very low variations between the triplicates (3%, 1% and 2%, respectively on average along the three-month period), in comparison with Molderez *et al.* (2021) findings who reported a variation of 10 % with seven replicates. This demonstrates that the eCTR was fully adequate to develop reproducible electroactive biofilms. In contrast, biofilms developed at higher potentials (150 mV/SCE) showed much higher variability (15% between the replicates). The same tendencies have been obtained for high applied potentials in the literature (30% variability between the 180 mV/ECS replicates in Molderez et al., [2021]).

The maximum values of the current density were reached at the end of the exponential

phase, around day 10 and 12 depending on the electrode's potential (Figure 3.2) as observed in former studies (Chang et al., 2022; Molderez et al., 2021; Torres et al., 2009; Ying et al., 2017). The highest current density ($3.71 \pm 0.03 \text{ A.m}^{-2}$ [3]) was obtained with the biofilms developed at 0 mV/SCE. Lowering applied potential decreased current densities at the end of the growth phase (3.46 ± 0.09 [3] and 2.72 ± 0.08 [3] A.m^{-2} for -150 and -300 mV/SCE, respectively), but the lowest values were given at the highest potential tested (1.9 ± 0.2 [3] A.m^{-2} at 150 mV/SCE). Similar behavior with respect to the potential were obtained in Ying *et al.* (2017) on smaller electrodes (3.1 cm^2) with only acetate feed in the same concentrations than in this work: maximum current density of 3.6 A.m^{-2} at -310 mV/SCE were obtained compared to 3.7 A.m^{-2} at -300 V/SCE in this study.

After day 13, the current decreased almost continuously during the rest of the experiment (Figure 3.2). The higher was the applied potential, the greater was the current density drop between the peak value and the final value at day 77 (42, 55, 57 and 72% decrease for -300, -150, 0 and 150 mV/SCE, respectively). Thus, lower applied potential led to more stable current generation overtime, as already reported by Chang et al., (2022).

Biofilm sampling (Figure 3.2, in dotted line) caused short and small disturbances of the current density. Changes of the feeding solution were correlated with larger variations (peaks on days 19, 33, 54 and 81) and were probably linked to variation in the composition of the primary wastewater.

Besides, the course of the eCTR operation suffered from some technical problems, causing visible drops of current density on all the electrodes (Figure 3.2). The main technical disturbance was from day 44 to 48, due to the non-supply of the reactor with the feeding solution during almost 4 days (malfunction of the feed pump). Then, on day 62, an acidification was detected in the reactor effluent: pH dropped from 7.3 down to 6.1 in 68 h, whereas the pH mean value was of 7.3 during the reactor operation. It was also correlated to an extremely high COD content in the primary wastewater used to prepare the feeding solution (soluble COD of 2370 ± 10 [7] mg.L^{-1} and total COD of 2400 ± 10 [7] mg.L^{-1} after 1 g.L^{-1} acetate addition). A total of 50 mL of sodium hydroxide, 3 g.L^{-1} was added into the reactor on day 67 in five successive additions of 10 mL but it had limited effect on pH. So after day 69, the eCTR was set in a recirculation mode until the current density re-established. Finally on day 75, the level in the feed tank was too low, which let air get into the eCTR and the disruption of the anaerobic conditions.

It is important to notice that none of these events significantly affected the overall evolution of the curves according to time, showing the high robustness of the electroactive biofilms formed under these operating conditions.

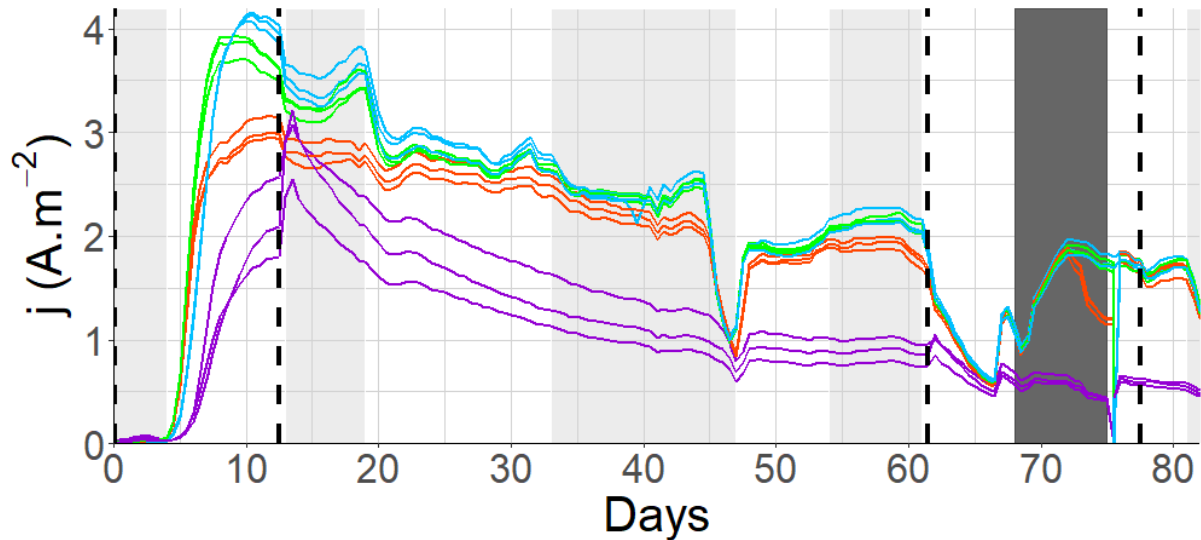


Figure 3.2: Evolution of the current density during three months of CTR operation.

Alternation of light grey and white areas shows the different feed supplies overtime. The dark grey zone corresponds to the operation of the eCTR in recirculation mode. —: -300 mV/SCE, —: -150 mV/SCE, —: 0 mV/SCE, —: 150 mV/SCE. Dotted lines represent biofilm sampling points associated with CV analysis.

3.3.1.2 Electrochemical characterization by cyclic voltammetry

For each anode formed under a given applied potential, the cyclic voltammetry (CV) records of the three replicates were similar (<4% difference with a mean standard deviation of 3%). The anodes developed at 150 mV/SCE gave less reproducible behavior (8% difference between replicates on day 13), which improved with time (2% difference on day 77). The OCP condition kept some variability for all the time points (11, 17 and 9% for day 13, 62 and 77, respectively). The CV confirmed the ability of the eCTR to produce biofilms with identical electrochemical characteristics when a constant potential is applied under controlled hydrodynamics, in comparison to the previous study of Molderez *et al.* (2021) where standard deviation went from 4 to 12 % on the same potential window than in this work.

CV showed two different behaviors depending on the electrochemical conditions. The microbial electrodes formed at -300, -150 and 0 mV/SCE displayed wave-shaped curves at day 13, which is in line with observation of Ying *et al.* (2017) who reported similar values of limiting current density (j_L). This well-known shape indicates that the current is controlled by the electrochemical kinetics of interfacial electron transfer in the lower part of the potential range while, in the upper part, it is limited by a potential-independent process. In electroactive biofilms, this rate-limiting step can be the diffusive transfer of redox species, which are produced by the biofilm and used as electron shuttles (Huang *et al.*, 2018). It can also be the production and release of electrons by the microbial cells. In any case, the CV curves showed a clear value for j_L . At days 62 and 77, the same general shape was kept and a transient peak appeared.

This peak was due to the establishment of a diffusive layer as previously theorized (Rousseau *et al.*, 2014) and was observed in former work after 25 days of growth (Torres *et al.*, 2009).

In contrast, the microbial electrodes formed at 150 mV/SCE and those let at open circuit produced CV curves that can be attributed to a pure electrochemical kinetics. The biofilms that developed on these electrodes did not show effective electro-catalyst capacities. The current density did not reach values high enough to be limited by any process other than electron transfer at the electrode surface. In conclusion, applying a too high potential or keeping the electrodes at open circuit are not appropriate strategies for developing efficient electroactive biofilms. The same behavior has been shown in a lesser extent for +300 mV/SCE in former studies (Torres *et al.*, 2009).

For the biofilms formed at -300, -150 and 0 mV/SCE, the limiting current density (j_L) was measured as the average value of the current density in the range of 150 to 200 mV/SCE. It is an indicator of the maximum current that bioanodes are able to generate under the conditions of the experiment and in particular the COD content in the eCTR. On day 0 (Figure 3.3A), all the conditions and all the replicates had the same behavior with very low residual limiting current density ($j_L = 0.05 \text{ A.m}^{-2}$).

When maximum currents were reached, on day 13 (Figure 3.3B), j_L were significantly higher for the anodes developed at -300 mV/SCE ($4.6 \pm 0.1 [3] \text{ A.m}^{-2}$) than those developed at -150 or 0 mV/SCE ($3.2 \pm 0.1 [6] \text{ A.m}^{-2}$). The same tendency was observed on day 62 (Figure 3.3C), $1.8 \pm 0.1 [3]$ versus $1.7 \pm 0.1 [6] \text{ A.m}^{-2}$, and day 77 (Figure 3.3D), $2.0 \pm 0.1 [3]$ versus $1.7 \pm 0.1 [6] \text{ A.m}^{-2}$. Similar behavior has been reported by Ying *et al.* (2017) after 21 days of biofilm growth: 4.8, 2.8 and 2.2 A.m^{-2} for -310, -10 and 290 mV/SCE, respectively.

The CV curves showed that the applied potential of -300 mV/SCE led to microbial electrodes that were clearly more efficient than those formed at the potentials of -150 and 0 V/SCE. The suitability of low values of potential has already been observed and explained (Molderez *et al.*, 2021; Chang *et al.*, 2022). The exoelectrogenic cells gain energy by extracting electrons from acetate and releasing them to the electrode. They gain all the more energy as the difference between the potential of substrate oxidation (here acetate, see Eq.(3.5)) and the potential of the electrode is great. When the potential of the electrode is close to the potential of acetate oxidation, as here for the applied potential of -300 mV/SCE, only the most effective exoelectrogenic bacteria can take benefit of the electrode as final electron acceptor and preferentially develop. The less restrictive values of -150 and 0 mV/SCE may induce a less stringent selection of efficient exoelectrogenic species and lead to less effective biofilms.

The higher electroactive properties of the biofilms formed at -300 mV/SCE could not be suspected by only considering the current-time curves (Figure 3.2). In fact, the

potential of -300 mV/SCE was too low to allow the full electro-catalytic efficiency of the electrodes to be used. The CV records show that only 58 to 60% of j_L was reached at -300 mV/SCE for the biofilms formed at this potential (Figure 3.3). In contrast, the potentials of -150 and 0 mV/SCE ensured currents close to j_L .

All the CV records showed a decreasing value of j_L along time (Figure 3.3B, Figure 3.3C and Figure 3.3D). The highest drops were observed for biofilms developed at -300 mV/SCE, the limiting current density decreased from 64% of its highest value from day 12 to day 77. j_L for biofilms formed at -150 and 0 mV/SCE both dropped from 56% during the same period. As a consequence, the j_L difference between biofilms developed at -300 mV/SCE and those developed at -150 and 0 mV/SCE tended to diminish with time, it was of 44% for growing biofilms (day 12) and only of 18% for mature biofilms (day 77). Both types of measures showed that all the biofilms evolved towards similar electrochemical characteristics overtime. The applied potential, in the range from -300 to 0 mV/SCE, had less effect on resulting current densities as time progressed.

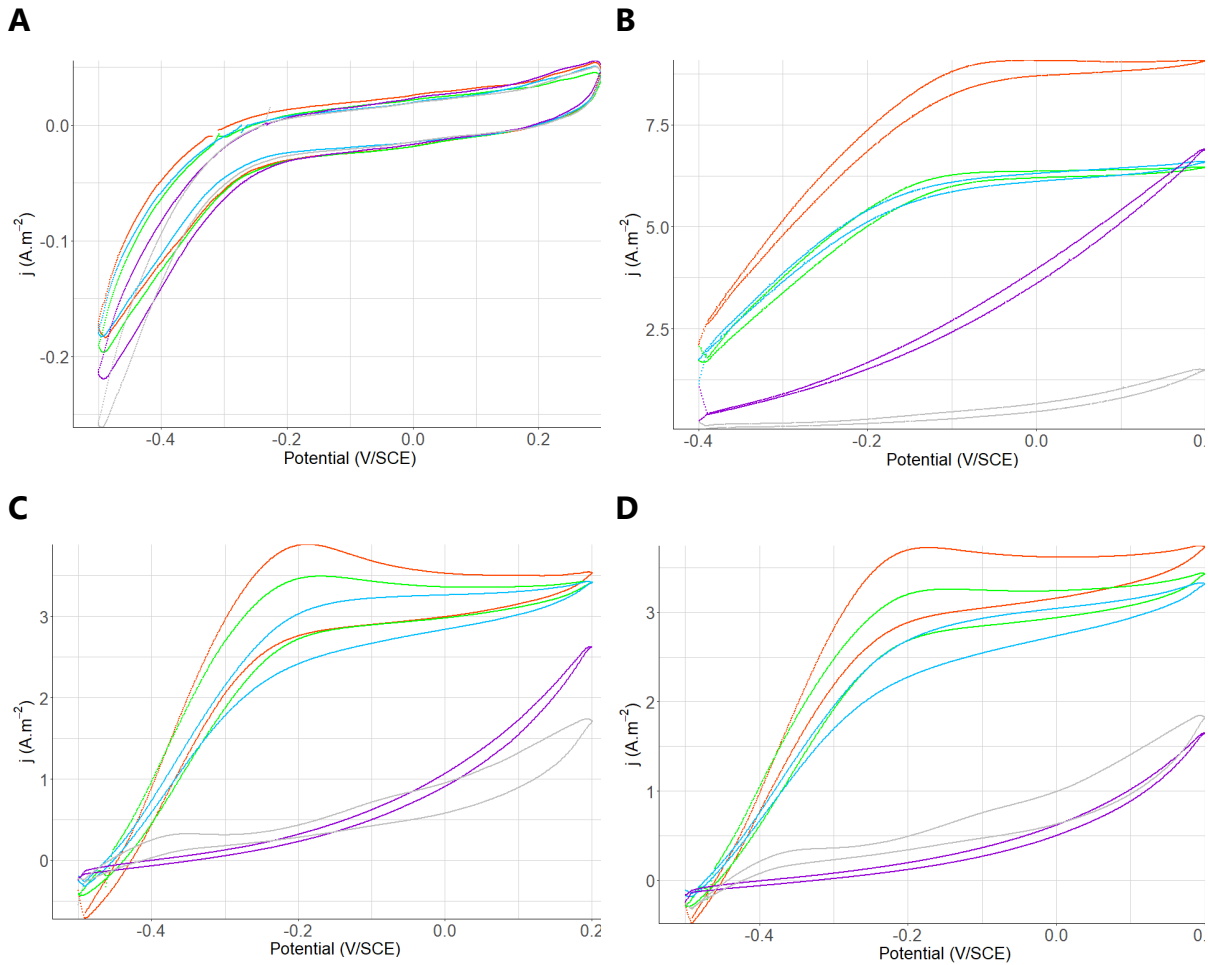


Figure 3.3: Cyclic voltammetry at different biofilm formation stage.

A) Day 0 (without biofilm), B) day 13, C) day 62 and D) day 77. Cycle 2 of the CV records from the same five electrodes representative of each potential condition are represented. The OCP condition represents the electrodes let without any applied potential. —: -300 mV/SCE, —: -150 mV/SCE, —: 0 mV/SCE, —: 150 mV/SCE, —: OCP.

3.3.2 Characterization of the main microbial populations

OTU from the different samples were characterized by sequencing and their abundance was normalized using an arithmetical mean (see Eq. (3.3)). The ten most abundant genera are represented in Figure 3.4A, considering relative abundance (RA) expressed in percentage (from the 16S rDNA sequencing). Figure 3.4B is obtained from sequencing 16S rRNA extracts and therefore represents active biofilm populations (see section 3.2.3).

The scraping of the biofilm was done on the same zone for each sample i.e. the 2.5 cm² upper immersed part of the electrodes. They represent for (i) day 13, biofilm grown from day 0 to day 13, (ii) day 62, biofilm redeveloped from day 13 to day 62 and (iii) for day 77, biofilm renewed from day 62 to 77.

Figure 3.4 shows a time evolution with visible variation between two phases: the end of the growth phase on day 13 and the maturation phase, similar between day 62 and day 77. For each replicate similar relative abundance proportions were obtained.

3.3.2.1 Biofilm growth phase (days 0 – 13)

The current generation is linked to electroactive bacteria activity. *Geobacter* is one of the main electroactive genera studied (Logan et al., 2019; Lovley and Walker, 2019). As expected, it is represented on day 13 on all polarized electrode surfaces (Figure 3.4A). Proportions of *Geobacter* populations were respectively higher than 25%, 15% and 5% for -300, -150 and 0 mV/SCE and in lesser extent for 150 mV/SCE. Lower applied potential increased the proportion of *Geobacter*, which may explain the hierarchy of the electro-catalytic activity discussed in 3.3.1.2. Nonetheless, despite higher proportion of *Geobacter* in the -150 mV/SCE samples than in 0 mV/SCE, the CV analysis (see section 3.3.1.2) was not showing different behavior. Its relative abundance was significantly lower in this work than in former studies using only acetate as substrate (Torres et al., 2009; Zhu et al., 2014), but in the same order of magnitude and even higher than in studies using synthetic or domestic wastewater in the same COD ranges (Chang et al., 2022; Ying et al., 2017).

Figure 3.4B showed the relative abundance of the main active genera as viewed from 16S rRNA sequencing. Comparing the active proportion of those bacteria in the biofilm along the 13-day growth period showed that *Geobacter* was active in lower proportion than what could be expected from their relative abundance. It was only active from 12 to 23% in -300 mV/SCE samples, around 13% for -150 mV/SCE and from 3 to 10% for 0 mV/SCE suggesting that lower potentials are associated with an increased level of *Geobacter* relative activity. It represented roughly half of the relative abundance of *Geobacter*, and was surprisingly low considering a growing biofilm, probably slightly affected by substrate diffusion limitations.

The day 13 reflected early biofilm structuration on the electrode surface. *Arcobacter* was the most abundant genera (Figure 3.4A) under all operating conditions ($\approx 39\%$ in all the samples) and the most active as well ($\approx 36\%$ for all the conditions). *Zoogloea* was also surprisingly active in the most samples ($>20\%$ for +150 mV/SCE in Figure 3.4B), considering a low relative abundance of their populations ($<5\%$), but especially for the electrodes connected to the potentiostat (except -150 mV/SCE where it represented less than 1% of rDNA). They are both known as heterotrophic genera (Fedorovich et al., 2009; Hou et al., 2021).

Those genera were present and active in all the samples, regardless of the applied potential. Their role in the structuration of the biofilm may be important. *Arcobacter* is one of the most abundant genera in wastewater (Fisher et al., 2014; Kristensen et al., 2020). It has been shown to be responsible of microbial mats formation (Pimenov et al., 2018) and is known to be an electroactive species (Fedorovich et al., 2009). *Zoogloea* is also very common in wastewater treatment processes and is known for excreting high levels of extracellular polymer substances, thus contributing to the formation of biofilms (Hou et al., 2021; Li et al., 2022). Those two genera may also explain the relative

low activity of *Geobacter*, competing for the substrate needed to their growth and activity.

3.3.2.2 Maturation of the biofilm (days 14 – 77)

Samples from days 62 and 77 revealed the relative stable behavior of a mature biofilm with no major difference in terms of composition in comparison with day 13. First, *Arcobacter* and *Zoogloea* population strongly decreased in proportion (<10%) but remained more represented in the control conditions (OCP and NC), especially for the non-connected (NC) electrodes ($\approx 20\%$). Nonetheless, they became less active (<5%) in all the conditions further supporting the hypothesis of their structuration role in early stage of biofilm development.

Regarding *Geobacter*, the evolution of its proportion for the polarized electrodes overtime depends on the applied potential. -300 mV/SCE and -150 mV/SCE led to a stable proportion of *Geobacter* along time. In comparison, 0 mV/SCE permitted a 300% augmentation of its relative abundance between day 13 and day 77 (from $\approx 7\%$ to $\approx 30\%$ for all the replicates). For 150 mV/SCE, it remained below 4% of total abundance. Under control conditions, it neighbored 0%. *Geobacter* relative abundance on day 77 was finally equivalent for each polarized electrode (except for 150 mV/SCE). It was also stable between day 62 and 77, with only small variations for -300 mV/SCE (lower value on day 62 compared to day 13 and 77). It might be an explanation to the similar j_L value obtained for these conditions on the CV records in Figure 3.3D. Nonetheless, it was not correlated with the decreasing current observed on CA (Figure 3.2) and CV records (Figure 3.3).

Geobacter relative activity was still lower than its relative abundance representing around half of its value. Comparing day 13 and 77, the same evolution was shown in Figure 3.4B considering its activity i.e. a constant proportion for -300 and -150 mV/SCE samples versus a significant increase of 300% for 0 mV/SCE between day 13 and 77. Higher applied potential (up to 0 mV/SCE in the current work) led to a greater increase of *Geobacter* abundance and activity along time. A different comportment is observed for day 62. It comes shortly after the start of a major decline of current generation, which was attributed to a change of the feeding solution (see section 3.3.1.1). The activity decline is transcribed by rRNA *Geobacter* relative abundance values, which also decreased in all samples (from 8 to 75% lower compared to day 77).

Nonetheless, the increase observed between days 13 and 77 was oppositely correlated to the decrease of the current density shown in Figure 3.2 or in the limiting current obtained in Figure 3.3. Consequently, the evolution of *Geobacter* populations may not explain entirely electrochemical behavior evolution.

Geobacter rRNA showed also variations between samples on day 77, giving higher abundance values for lower potential (25, 20 and 12% for -300, -150 and 0 mV/SCE, respectively). This was also correlated with the j_L values measured from the CV records. Therefore, *Geobacter* rRNA abundance may be a microbial indicator of the biofilm performance (j_L) with respect to its relative species abundance.

The 150 mV/SCE highlighted colonization by *Trichloromonas* after day 62 which is mainly represented in all the replicates ($\approx 60\%$) and highly active ($\approx 55\%$), but tended to decrease as shown on day 77 ($\approx 35\%$ of rDNA and $\approx 20\%$ rRNA). This may be linked to the short time spent between the two previous samplings, which may not have favored sufficiently biofilm development. Moreover, as *Trichloromonas* is an electroactive species (Liu *et al.*, 2022), a competition for electrons with *Geobacter*, whose abundance remained stable, is therefore possible.

Conversely, *Desulfobacter* became present and active in all the samples, even in the non-polarized electrodes. It is known as sulfate-reducing autotroph (Pan *et al.*, 2023) and may be an indicator of biofilm maturation as shown in studies on sulfate-reducing biofilms (Labrenz and Banfield, 2004). Its high proportion of rRNA seems to be an indicator of high activity and thus linked to high consumption of electrons, especially on day 62. It may potentially explain the decreasing activity observed on the CA records suggesting that interspecies electron transfer to *Desulfobacter* might constitute an alternative sink to the electrode for the electrons produced by *Geobacter*.

Small differences appeared between the OCP and the NC, which were both significantly different from the polarized electrodes. OCP had more diverse communities; whereas, NC was mainly represented by three genera: *Arcobacter*, *Desulfobacter* and *Trichlorobacter* (not known as electroactive bacteria). This result indicates a small impact of the potentiostat connection on the electrodes behavior and the biofilm composition. Even smaller differences appeared between OCP and NC condition for the rRNA analysis.

3.3.3 Statistical coevolution of applied potential and microbial communities

A Principal Component Analysis (PCA) was made to observe the correlations between microbial populations and the characteristic values from the reactor or electrode level. The variables are the microbial population's relative abundance (RA[log] expressed according to Eq. (3.4)). Only the OTU with relative abundance higher than 0.5% for at least one sample were kept for the analysis and only the most described OTU according the two first PCA dimensions were shown (outside of the 0.5 radius circle) except for the ten most represented genera identified in section 3.3.2. The 16S rDNA and rRNA were separated to calculate the two PCA.

Additional explicative variables were also considered (plotted in blue in Figure 3.5A and Figure 3.5B). They included for all the electrodes: time spend since the beginning of the experiment (Age), total and soluble COD content in the feeding of the reactor ($CODi_t$ and $CODi_s$) and the quantity of COD removed calculated according Eq. (3.1) ($CODr_t$ and $CODr_s$). The values of current densities extracted from the section 3.3.1 as j_m and j_l (the mean for the sampling day of the current density taken from the CA and the limiting current density from CV records, respectively) were also taken for each individual electrode as explicative variables.

The first two dimensions explained 43% of the total variance of the observations for both rDNA and rRNA analysis. The entire dataset was described in 42 components, but 3 were found sufficient to describe half of the dataset. The representations have been shown only on the 2 first axis but the other components were checked when needed.

By comparing the graph of variables (Figure 3.5A and Figure 3.5B), the correlation between the microbial populations appeared more clearly. The explicative variable Age , shows how genera may be correlated with time, which was well described according PC1 for both sequencing data.

correlated according principal components 2 and 3 ($-0.36; -0.52$) to j_m ($-0.35; -0.42$) (data not shown). It confirmed the strong influence of *Geobacter* activity on the current transmitted to the electrode observed in 3.3.2.

The variation of COD removal could be attributed to the evolution of electrocatalytic efficiency coupled to activity of non-electroactive microorganisms within the biofilm and/or planktonic ones. An opposite correlation was shown between *Geobacter* activity (but not its relative abundance), and the value of COD removed ($CODr_t$ and $CODr_s$). Nevertheless, no opposite correlation of *Geobacter* with the other genera in terms of their population abundance or active proportion was clearly expressed due to the major influence of time on these genera, but the relations of *Geobacter* with other species genera be considered.

Species identified among the most abundant such as *Desulfobacter* (see section 3.3.2) were expected to be well correlated with *Age*. *Desulfobacter* appeared to be also correlated with other sulfur-reducers (such as *Desulfobulbus* or *Desulfomicrobium*) especially in Figure 3.5B, where bacterial activity is highlighted. Those genera are responsible for sulfate (SO_4^{2-}) reduction and as autotrophs, they can use bicarbonate ions (HCO_3^-) as a carbon source (Pan *et al.*, 2023). So, they might not participate in COD removal (not correlated to $CODr_t$ or $CODr_s$), but they can use electrons produced from its oxidation by other species such as *Geobacter*. With a decreasing current observed specifically on day 62, a part of the electrons must have been transferred to other acceptors, rather to the electrode. *Desulfobacter*, associated with the other sulfur-reducer and their high proportion of active bacteria are good candidates to explain this decreasing current generation on day 62. The maturation of the biofilm seems to induce the development of alternative ways to transfer the electrons inside the biofilm rather than to the electrode.

This production of reduced sulfide component may have favored the development of sulfide oxidizing bacteria such as *Thiomonas* and *Beggiatoa* also known as putative autotrophs (Arsène-Ploetze *et al.*, 2010; Burton and Morita, 1964). Other active autotrophs were also found correlated with time, such as *Methanospirillum*, which could lead to methane production in the reactor. Nevertheless, this hypothesis cannot be verified as no gas analysis was carried out during the experiment.

Moreover, *Desulfobulbus* and *Methanospirillum* are also known as cable bacteria (Malkin *et al.*, 2014; Walker *et al.*, 2019) and thus may have a more complex role to play in electron transportation in biofilms developed in this study.

Conversely, heterotrophs such as *Zoogloea* and *Arcobacter* are oppositely correlated with time, probably competing for the substrate in early biofilm development, even if no clear opposite correlation was shown with *Geobacter*.

The different samples were plotted in Figure 3.5C for 16S rDNA and Figure 3.5D for 16S rRNA. Regarding 16S rDNA correlations, three groups appeared: (i) the samples of day 13, (ii) the control conditions of the mature biofilms (OCP and NC) and (iii) the other samples of days 62 and 77. Three different groups appeared concerning populations activities on Figure 3.5D, corresponding to the different sampling time: day 13, 62 and 77. They were grouped with an ellipse of confidence interval of 95%.

The electroactive communities were organized according to two different times in Figure 3.5C, showing the main difference between a growing biofilm (day 13) and a mature biofilm (day 62 and 77). Growing biofilms under a low shear stress applied, were more correlated between the samples (smaller area) showing less microbial diversity. This microbial diversity increased with maturation process occurring without being impacted by important biofilm detachment and showing more variability between the different potential conditions. The samples are more dispersed according PC1 and PC2 and between replicates except for the -300 mV/SCE which appeared to be well correlated and thus stable in their composition. This result corroborates previous observations (better electrocatalytic properties shown in section 3.3.1.2): lower potential (here, -300 mV/SCE) was hypothesized to be more selective for electroactive genera, resulting in biofilms with less variability in their composition. Before this work, this potential condition was not shown as efficient with classical chronoamperometry, since the oxidative plateau is located at higher potential, or with microbial abundance, since microbial populations are fairly equivalent between the different potential. Nonetheless, this study demonstrates the interest of such low potential for further applications.

Conversely, higher potential of -150, 0 and 150 mV/SCE led to biofilms with a more diverse composition and with more intrinsic variability, due to a less stringent growing condition: the difference between $E_{Acetate}^0$ and the applied potential being significantly higher allowed more energy to be dissipated by the biofilm. Consequently, it lets the ability to sulfate reducer to develop, which was not specifically shown in section 3.3.2 among the ten most abundant genera but was highlighted by the characterization of its activity using 16S rRNA.

In Figure 3.5D, the samples are only regrouped by the sampling day. For each group, growing biofilms and mature biofilms showed inter variability and intra variability between the replicates, increasing with time. The notable differences on the samples between day 62 and 77 may be an explanation of the drop of current generation observed on the CA records in 3.3.1.1. Such variation of the biofilm behavior was not directly linked to the bacterial community abundance but to their activity. It is also linked to the observations on the Figure 3.5B showing the correlation between the day 62 and the low total COD removal associated with high total COD feed for this time point. This is related to the high activity of *Geobacter*, nonetheless the low amount of electron transferred to the electrode (see section 3.3.1.1) tends to show that the biofilm

is turning on day 62 on an electron well, mainly showed through microbial activity.

A more complete characterization of biofilm properties (thickness, density, porosity) could have provided explanations on the evolution of biofilm composition and the detailed fluxes within it (substrate, electrons, redox shuttles ...).

3.4 CONCLUSION

- Under controlled low shear stress for a same applied potential, mature electroactive biofilm showed a very low variability. High-applied potential (up to 0 mV/SCE) gave better apparent current densities but with higher microbial diversity while more stable and performant biofilms are developed at -300 mV/SCE.
- *Geobacter* activity is a better indicator of current generation than its abundance.
- Electroactive biofilm formation involved mainly *Arcobacter* and *Zoogloea*, among other heterotrophs, probably competing for the substrate with *Geobacter*.
- During biofilm maturation, current generation was suspected to be impacted by other bacteria (sulfidogenic and methanogenic), using the electrons produced by *Geobacter* instead of the electrode. 16S rRNA revealed low applied potentials allow limiting this phenomenon being more selective for electroactive bacteria.

CHAPITRE 4 : IMPACT DE L'ÉVOLUTION DE LA CONTRAINTE DE CISAILLEMENT SUR L'ACTIVITE ET LA COMPOSITION DES BIOFILMS ELECTROACTIFS

4. SUIVI LONG TERME ET EN CONDITIONS HYDRODYNAMIQUES CONTROLÉES DE BIOFILMS ANODIQUES ALIMENTÉS A L'AIDE D'EAUX USEES

4.1 INTRODUCTION

Des biofilms alimentés en eaux usées ont été développés dans un réacteur de Couette-Taylor électrochimique (Chapitre 3) à différents potentiels (-300, -150, 0, et 150 mV/ECS) et pour une faible contrainte de cisaillement (8,3 mPa). Au cours des 77 premiers jours d'opération du réacteur, l'activité des biofilms a été caractérisée par chronoampérométrie aux différents potentiels étudiés, puis par voltammétrie cyclique et par l'étude couplée des genres bactériens et de leur activité. Grâce à l'hydrodynamique contrôlée au sein du réacteur, trois triplicats avec peu d'intra-variabilité pour chaque condition de potentiel ont ainsi été obtenus.

L'hydrodynamique est un paramètre clé dont l'impact a été largement étudié sur les biofilms et mis en œuvre à l'échelle industrielle dans plusieurs procédés de traitement de l'eau tels que les procédés membranaires, de bio-filtration ou granulaires (Y. Liu and Tay, 2002; Narayanan and Narayan, 2019; Syron and Casey, 2008). Dans le cas des technologies électro-microbienne, quelques expérimentations ont été menées pour étudier le rôle du cisaillement sur le développement de biofilms électroactifs (Jones and Buie, 2019; Moss et al., 2020; Pan et al., 2019; Vilas Boas et al., 2015), et une seule étude a évalué son potentiel pour redynamiser l'activité de biofilms matures (Islam et al., 2019). Ces études mettent en évidence l'effet positif de l'augmentation de la contrainte de cisaillement sur l'obtention de biofilms électroactifs et sur les courants générés dans des cellules d'écoulement ou des piles microbiennes. Ces résultats sont issus d'expérimentations menées à des contraintes de cisaillement dans une gamme relativement large de 5 à 1 600 mPa.

Parmi ces études, peu d'entre elles ont été conduites sur un temps suffisamment long (supérieur à un mois d'opération) et dans des conditions expérimentales suffisamment réalistes, c'est-à-dire avec des eaux réelles contenant des matières en suspension et dont la composition varie au cours du temps. Les réacteurs employés sont le plus souvent des cellules d'écoulement qui permettent une connaissance précise des contraintes de cisaillement appliquées au biofilm (Ieropoulos et al., 2010) mais pour lesquelles l'extrapolation des résultats dans un but de montée en échelle des technologies est délicate. La caractérisation de la diversité microbienne sur la base des espèces présentes au sein du biofilm n'est pas systématiquement réalisée et l'activité des biofilms est uniquement évaluée *via* les courants générés. De plus, aucune analyse de l'activité spécifique des microorganismes, basée sur leurs ARN, protéines ou métabolites, n'est proposée.

La spécificité du réacteur de Couette-Taylor utilisé dans ce manuscrit est de disposer de plusieurs régimes transitoires entre les régimes d'écoulement laminaires et turbulents, caractérisés par la formation de vortex de taille et d'intensité croissantes (Mehel et al., 2005; Racina and Kind, 2006). Ces vortex permettent notamment d'améliorer le transfert de matière sur la paroi du cylindre interne du réacteur et de couvrir une plus large gamme de contraintes de cisaillement que celle habituellement appliquée dans le cadre de l'étude de biofilm électroactifs (0,01-1 Pa (Jones and Buie, 2019)). Les 20 électrodes de large surface et indépendantes intégrées au réacteur de Couette-Taylor électrochimique permettent de développer, dans leur phase de croissance initiale, des biofilms anodiques très similaires pour plusieurs répliques à potentiel imposé.

Ce chapitre présente les effets de l'augmentation successive de contraintes de cisaillement (de 8,3 mPa à 5 Pa, avec une durée minimale de 10 jours pour chaque palier) sur la composition et l'activité de biofilms développés à différents potentiels. Le dispositif expérimental et les méthodes de caractérisation de la composition et de l'activité des biofilms sont identiques à ceux du chapitre précédent.

4.2 MATERIELS ET METHODES

4.2.1 Conditions opératoires appliquées

4.2.1.1 Alimentation du réacteur

Le réacteur a été alimenté en eaux usées réelles sur l'ensemble de la période de suivi. Au cours des jours 0 à 195, les eaux usées étaient collectées de façon hebdomadaire à bimensuelles sur la station d'épuration de Carré de Réunion (Saint-Cyr-l'École et Bailly, 78) et correspondaient à des eaux usées ayant subi une décantation primaire. A partir du jour 196 et jusqu'à la fin de l'expérimentation, l'eau usée a été collectée de façon hebdomadaire à bimensuelles sur la station d'épuration d'Ollainville (91) et correspond à une eau usée prétraitée. La Table 4-1 présente les caractéristiques en termes de concentration en DCO totale (DCO_{totale}) et soluble ($DCO_{soluble}$) des deux eaux usées.

Table 4-1 : Caractéristiques des eaux usées alimentant le réacteur sur l'ensemble de la période de suivi (avant addition d'acétate)

Moyenne \pm écart-type (nombre de points)

Période	Jours 0 – 195	Jours 196 - 347
Caractéristiques des eaux usées	Eau usée prétraitée ayant subi une décantation primaire – Station de Carré de la Réunion (78)	Eau usée prétraitée – Station d'Ollainville (91)
DCO_{totale} moyenne (mgO₂/L)	324 \pm 363 (27)	745 \pm 422 (21)
Min/Max	124/628	462/939
DCO_{soluble} moyenne (mgO₂/L)	142 \pm 400 (27)	564 \pm 472 (21)
Min/Max	38/365	353/753
Ratio DCO_{soluble}/DCO_{totale}	0,50 \pm 0,13	0,80 \pm 0,15

Ces eaux ont permis d'alimenter le réacteur avec un débit moyen de $2,6 \pm 0,3 \text{ L.j}^{-1}$ grâce à une pompe péristaltique (Gilson). Le débit était relativement stable et principalement soumis à des variations dues à l'encrassement des tuyaux d'alimentation, nettoyés au renouvellement d'alimentation hebdomadaire ou bimensuel. Le volume utile du réacteur étant de 3,6 L, le temps de séjour associé au débit est donc de 33 heures. Une supplémentation des eaux usées par 1 g.L^{-1} d'acétate (soit 12 mM) a été effectuée pour éviter les limitations en substrat carboné facilement biodégradable, amortir les effets de variations de concentration en DCO des eaux usées réelles et ainsi assurer des conditions d'alimentation favorables au développement de *Geobacter* (Chae et al., 2009).

Un bullage du tank d'alimentation et du ciel gazeux du réacteur au diazote a été effectué pour limiter l'introduction d'oxygène dans le réacteur. Ce bullage a été réalisé selon plusieurs cycles quotidiens (contrôlés par un minuteur) ainsi qu'à chaque ouverture du réacteur pour le prélèvement de biofilm ou période d'opération manuelle sur le réacteur. La fréquence et durée de bullage ont évolué au cours de l'étude en fonction des besoins. Les différents bullages ont ainsi été effectués entre 1 et 4 fois par jour durant 15 à 60 minutes.

4.2.1.2 Conditions hydrodynamiques appliquées

Les différentes conditions hydrodynamiques induites par la rotation du cylindre intérieur sont présentées dans la Table 4-2.

Table 4-2 : Conditions de cisaillement associées aux différentes phases de développement de biofilm au cours de la durée de l'essai

VO = Vortex Ondulés / VT = Vortex Turbulents / T = Turbulent

Phase	1	2	3	4	5	6	7	8
Jours d'opération	0-90	90-119	119-132	132-162	162-211	211-273	273-316	316-347
Durée d'opération (j)	90	29	13	30	49	62	43	31
Jours de prélèvement de biofilm	13/62/77	116	130	160	210	271	313	347
Vitesse de rotation du cylindre intérieur (RPM)	5	13,4	33,6	84	124	184	280	5
Contrainte de cisaillement (mPa)	8,3	34	130	590	1 200	2 400	5 000	8,3
Nombre de Taylor associé (Ta x 1000)	0,7	1,9	4,8	12	18	26	40	0,7
Régime d'écoulement	VO	VO	VT	VT	VT	VT	T	VO

Différents paliers de contraintes de cisaillement ont été imposés sur l'ensemble de la période de suivi, suivant la phase de croissance et de maturation initiale réalisée à une contrainte de cisaillement de 8,3 mPa au cours des jours 0 – 90 (Phase 1, présentée dans le Chapitre 3) :

- Jours 90 – 119 : La contrainte de cisaillement a été augmentée à 34 mPa pour atteindre la limite supérieure théorique du régime d'écoulement à vortex ondulés ;
- Jours 119 - 132 : Passage au régime d'écoulement vortex turbulents à 130 mPa ;
- Jours 132 – 162 : Augmentation de la contrainte de cisaillement à une valeur de 590 mPa, supérieure au seuil généralement considéré pour le détachement des couches intermédiaires des biofilms (valeur de 300 mPa pour des biofilms développés sous des contraintes de cisaillement de 100 mPa (Coufort - Saudejaud et al., 2007)) ;
- Jours 162 – 211 : Passage de la contrainte à une valeur de 1,2 Pa ;
- Jours 211 – 273 : Augmentation de la contrainte de cisaillement à 2,4 Pa, proche de la valeur associée au détachement de la couche basale de biofilms se situant autour de 2 Pa pour des biofilms développés à 100 mPa (Coufort - Saudejaud et al., 2007) ;
- Jours 273 – 313 : Passage en régime d'écoulement turbulent en augmentant la contrainte de cisaillement à la valeur de 5 Pa ;
- Jours 316 – 347 : Retour à la condition initiale de 8,3 mPa utilisée pour le

développement initial du biofilm.

4.2.1.3 Potentiels appliqués aux anodes

Les potentiels appliqués aux anodes au cours de la phase 1 (jours 0-90) sont conservés pour l'ensemble des phases successives de l'expérimentation. Il s'agit des potentiels de -300, -150, 0 et 150 mV/ECS, appliqués respectivement à 4 triplics d'électrodes réparties au sein du cylindre central dans la même disposition qu'au Chapitre 3 (section 3.2.2). Ces potentiels sont contrôlés par un potentiostat (VMP-3, BioLogic) par rapport à une électrode de référence au calomel saturée (ECS, BioLogic, +0.244 V/ESH). Deux boîtiers Nstat ont été utilisés (BioLogic) afin d'étudier chaque électrode de façon indépendante.

4.2.2 Analyse du fonctionnement du réacteur

4.2.2.1 Suivi physico-chimique du réacteur

Un prélèvement de liquide a été effectué de façon quotidienne (sur les jours ouvrés) en entrée et en sortie de réacteur pour mesurer la DCO totale et soluble (après filtration à 0.2 µm). Pour chacun des échantillons la DCO a été déterminée par micro-méthode (kit Hach LCK 514). La quantité de DCO soluble éliminée ou abattue a été calculée comme suit :

$$DCO_a = DCO_e - DCO_s \quad (4.1)$$

où DCO_a est la quantité de DCO éliminée (mg.L⁻¹), DCO_e la DCO en entrée et DCO_s en sortie du réacteur (mg.L⁻¹).

Le pH de la solution en entrée de réacteur est mesuré quotidiennement pour contrôler d'éventuelles variations dans le tank d'alimentation à l'aide d'une sonde InPro 4010/120/Pt100, tandis que le pH en sortie de réacteur a été suivi en continu mais sa valeur a été moyennée sur un pas de temps de 15 minutes pour faciliter l'interprétation des résultats. Au cours de l'expérimentation, le pH d'entrée a légèrement augmenté passant de 7,7 à 8,4 entre la phase 1 et la phase 7 (Figure 4.1B), mais ses variations sont restées faibles (en moyenne $8,1 \pm 0,4$ (391)). Le pH en sortie de réacteur est resté relativement stable autour d'une valeur de $7,6 \pm 0,5$ (391), révélant une légère acidification due à l'activité microbienne. A noter que des chutes importantes de pH en sortie de réacteur ont été observées suite à certains changements des solutions d'alimentation concernant des eaux usées particulièrement chargées en DCO soluble et dont le ratio $DCO_{soluble}/DCO_{totale}$ était élevé (en moyenne $0,92 \pm 0,01$ (22) contre $0,82 \pm 0,01$ (211) en dehors de ces pics de concentration). Lorsque ces chutes de pH étaient observées (exemple fourni en Annexe 4A), le réacteur était alors configuré en recirculation en circuit fermé jusqu'à atteindre une stabilisation du pH autour de la

valeur moyenne de 7,6.

4.2.2.2 Prélèvement de biofilm et analyse de la diversité microbienne

Pour chacun de ces paliers de contrainte de cisaillement fixe, un prélèvement de biofilm a été réalisé. Les prélèvements n'ont été réalisés qu'après une durée minimale de 10 jours suite à la modification de la contrainte de cisaillement pour assurer une période suffisante de stabilisation du biofilm. Celle-ci est caractérisée par une stabilisation de la densité de courant mesurée sur chacune des anodes, du pH et de la DCO en sortie de réacteur. Cela a donc conduit à des temps de développement allant de 13 jours pour les phases 1 et 3 (phase de développement initial à 8,3 mPa et pour 130 mPa – Table 4-2) à 62 jours pour la phase 6 (contrainte de cisaillement de 2,4 Pa).

Le prélèvement du biofilm a été réalisé par grattage de la zone de 2,5 cm² à partir de la partie supérieure de l'anode immergée (sur une surface totale de biofilm disponible de 18 cm²). L'échantillon a été plongé dans l'azote liquide pour conserver l'ARN des cellules puis stocké à -80°C jusqu'à l'étape d'extraction ADN/ARN. L'analyse couplée d'ADNr et d'ARNr des biofilms électroactifs effectuée dans le Chapitre 3 a montré une bonne reproductibilité des résultats de séquençage sur les différents réplicas jusqu'au jour 77. En considérant le coût temporel et financier, une seule anode pour chaque condition de potentiel a alors été séquencée à partir du jour 130 et pour le reste du suivi.

L'ADN et l'ARN ont été extraits des échantillons à l'aide du kit ZymoBIOMICS DNA/RNA Miniprep (Zymo Research). À partir d'un volume total de 400 µl de biofilm lysé, 80 µl d'ADN génomique (ADNg) et d'ARN ont été obtenus. Le iScript Reverse Transcription Supermix a ensuite été utilisé pour la rétrotranscription de l'ARN en ADNc. Les concentrations d'ADNg et d'ADNc ont été mesurées à l'aide du test de colorant fluorescent Qubit (Invitrogen).

L'amplification de la région hypervariable V4-V5 de l'ADNr et de l'ARNr 16S à partir de l'ADNg total et de l'ADNc extraits ont permis l'étude des communautés microbiennes. Le traitement de la bibliothèque de séquences a été réalisé selon le protocole détaillé dans Philippon et al., (2021).

Le tableau des unités taxonomiques opérationnelles (OTU) a ensuite été analysé et visualisé avec R V4.2.2 (2022-10-31 ucrt) au niveau taxonomique des genres bactériens. La normalisation du tableau des OTU a été faite avec le nombre d'OTU total pour chaque échantillon. L'abondance relative de chaque population, $AR_i(\%)$ est donc donnée par :

$$AR_i(\%) = \frac{OTU_i}{\sum_{i=1}^n OTU_i} \quad (4.2)$$

4.2.2.3 Caractérisation de l'activité bio-électrochimique

Le suivi de l'activité bio-électrochimique a été réalisé par chronoampérométrie pour mesurer les courants obtenus à chaque électrode avec un pas de temps d'1 min permettant d'avoir une très bonne résolution des courants mesurés. Ces derniers seront exprimés en densité de courant en considérant les surfaces actives d'électrode de 18 cm². Afin de faire le lien avec des paramètres obtenus pour des échelles de temps différentes, les valeurs de courant peuvent être intégrées sur les périodes considérées (Δt) pour donner la quantité d'électricité correspondante selon :

$$Q_{\Delta t} = \int_t^{t+\Delta t} jSdt \quad (4.3)$$

où $Q_{\Delta t}$ est la quantité d'électricité sur la période Δt (C), j la densité de courant (A.m⁻²) et S la surface active d'électrode (m²).

À la suite de chaque prélèvement de biofilm, une voltammétrie cyclique (CV) en condition turn-over a été réalisée après remise en marche de la rotation du cylindre central, à la vitesse de 1 mV.s⁻¹ durant 3 cycles de -0,5 à 0,2 V/ECS. Le premier cycle était parfois légèrement différent des deuxièmes et troisièmes cycles, qui étaient toujours identiques. Aussi, toutes les données rapportées dans ce chapitre ont été extraites du deuxième cycle des CV.

4.2.3 Analyse statistique des données

L'analyse en composantes principales (ACP) a été utilisée afin d'analyser les corrélations entre les biofilms développés, les conditions d'opération du réacteur et le temps (section 4.3.4.2). Les échantillons de séquençage normalisés et les variables opératoires ont été exprimés en composantes principales sans dimensions pour les comparer entre eux. Le package R FactomineR a été utilisé (Lê et al., 2008). Pour normaliser les OTU, l'abondance relative a été calculée avec la moyenne géométrique des OTU pour chaque échantillon (Eq. (4.4)). Le nombre 1 a été ajouté au compte de chaque valeur d'OTU pour ne jamais avoir au numérateur et au dénominateur de 0. L'abondance relative, AR_i (log) est donc exprimée comme suit :

$$AR_i(\log) = \log \left(\frac{OTU_i + 1}{\sqrt[n]{\prod_{i=1}^n (OTU_i + 1)}} \right) \quad (4.4)$$

Pour chaque échantillon, l'ADNr et l'ARNr 16S ont été étudiés séparément.

4.3 RESULTATS

La première partie du développement et de la maturation de biofilm jusqu'au jour 77 (phase 1) a été détaillée dans le chapitre précédent (Chapitre 3). Ce chapitre se concentrera sur l'effet de la modification des contraintes de cisaillement par paliers successifs à partir de la valeur initiale de 8,3 mPa (appliquée au cours de la phase initiale de développement des jours 0 à 90 – Phase 1). Les variations de contraintes de cisaillement induites par la modification de la vitesse de rotation sont notées dans la Table 4-2 et sont reportées sur les figures ci-dessous sous forme de bandeau dans leur partie supérieure.

4.3.1 Description de la dynamique des conditions opératoires et des performances du réacteur sur la durée expérimentale totale (347 jours)

Les principaux paramètres caractéristiques du système expérimental (quantité d'électricité échangée par jour pour l'ensemble des bio-anodes polarisées (Q_{quot}), pH en entrée et en sortie de réacteur, DCO totale et soluble en entrée (DCOe) et en sortie de réacteur (DCOs) sont représentés sur la Figure 4.1 au pas de temps journalier. Cette représentation permet d'avoir une vision globale des évolutions de certains paramètres caractéristiques d'intérêt au cours du temps, qui seront détaillés dans les parties suivantes. De plus, celle-ci permet de mettre en évidence :

- Les renouvellements périodiques d'alimentation (hebdomadaires ou bimensuels) supplémentée en acétate qui sont indiqués par l'alternance de zones grisées claires et blanches, chacune des bandes verticales indiquant une alimentation ;
- Les périodes d'arrêt d'alimentation et de mise en recirculation, suite à des chutes de pH en dessous de 7 en sortie de réacteur, qui sont pointées par des zones grisées plus foncées ;
- Les prélèvements de biofilm sont matérialisés par des lignes verticales en pointillés. Après prélèvement et reprise de l'alimentation, une voltammétrie cyclique est systématiquement réalisée.
- Les contraintes de cisaillement appliquées au cours des différentes phases sont rappelées sur le bandeau horizontal situé sur la partie supérieure de la Figure 4.1.

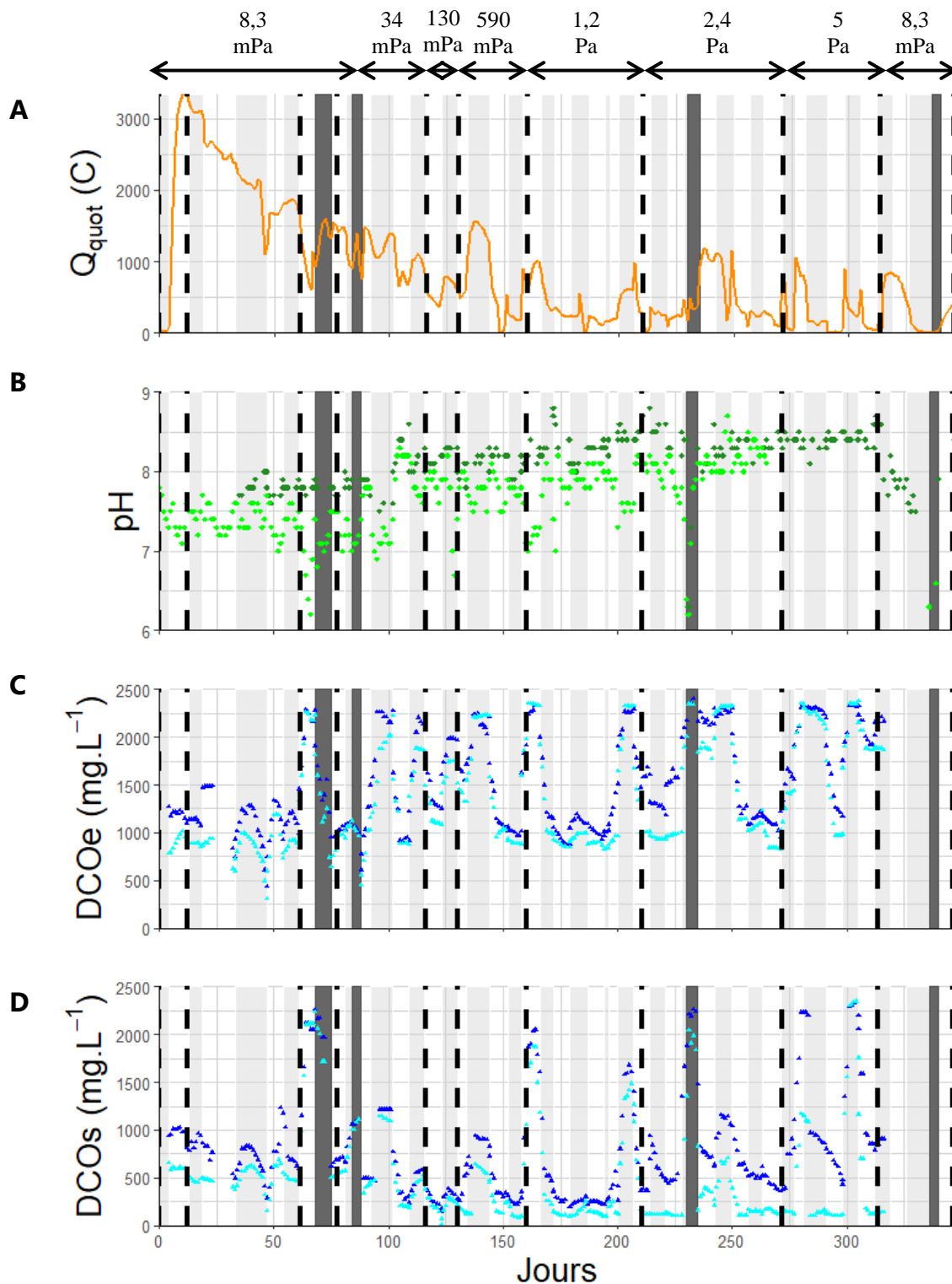


Figure 4.1: Evolution des paramètres du réacteur.

A) Quantité d'électricité quotidienne (—) B) DCO en entrée et C) en sortie de réacteur, totale (▲) et soluble (▲) et D) pH en entrée (◆) et sortie (◆) de réacteur associés aux différents modes d'alimentation : continue (gris clair/blanc) et avec recirculation (gris foncé). Les points de prélèvement des biofilms sont indiqués en pointillé.

4.3.2 Evolution temporelle des propriétés physico-chimiques

4.3.2.1 Consommation de DCO totale et soluble au sein du réacteur

Les Figure 4.2A et Figure 4.2B présentent respectivement l'évolution temporelle de la concentration de DCO abattue (DCO_a) et du taux d'abattement de celle-ci.

Trois périodes, correspondant à des évolutions distinctes sont identifiées et mises en évidence sur la Figure 4.2 :

- Période **P1** : Lors de la période de développement à $\tau = 8,3$ mPa (Phase 1 - jours 0 à 90), l'abattement de la DCO est faible, correspondant respectivement à 31 et 38 % de la DCO totale et soluble en entrée. Cela représente une consommation de $360 \text{ mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}$ en DCO_{totale} et de $340 \text{ mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}$ en DCO_{soluble} ;
- Période **P2** : Entre les jours 90 ($\tau = 34$ mPa) à 132 ($\tau = 590$ mPa), on observe une augmentation de l'abattement de la DCO totale et soluble qui passent de 50 % à des valeurs supérieures à 80 % ;
- Période **P3** : A partir de l'application de la contrainte de 590 mPa et jusqu'à la fin de l'étude (jours 132 à 316), l'abattement de la DCO_{soluble} se maintient à des valeurs élevées, 77 ± 21 % (246) en moyenne ($1085 \text{ mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}$) alors que celui de la DCO_{totale} diminue. Il passe de plus de 65 % en début de période à des valeurs inférieures à 50 % en fin de celle-ci.

L'augmentation des abattements de la DCO à partir du jour 90 (période P2) est probablement due à une solution d'alimentation plus chargée en DCO (Figure 4.1C). Après ajout d'acétate, la DCO_{totale} mesurée dans le tank d'alimentation est en moyenne de $1170 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ avant le jour 90 et $1510 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ à partir de ce jour et jusqu'à la fin de l'étude (augmentation de 29 %). Un apport plus important en substrat carboné favorise la croissance de plus de micro-organismes, ce qui se traduit logiquement par une augmentation de la consommation en DCO. L'amélioration du transport des composés solubles (DCO_{soluble} et métabolites) à l'interface liquide/biofilm et au sein du biofilm avec l'augmentation de la vitesse de rotation du cylindre interne est un élément supplémentaire pouvant contribuer à l'amélioration des performances d'abattement de la DCO_{soluble} .

La baisse progressive de la consommation de DCO_{totale} , observée lors de la période P3, alors que celle de la DCO_{soluble} est relativement stable, est significative d'une augmentation de la DCO particulière, constatée visuellement en sortie de réacteur.

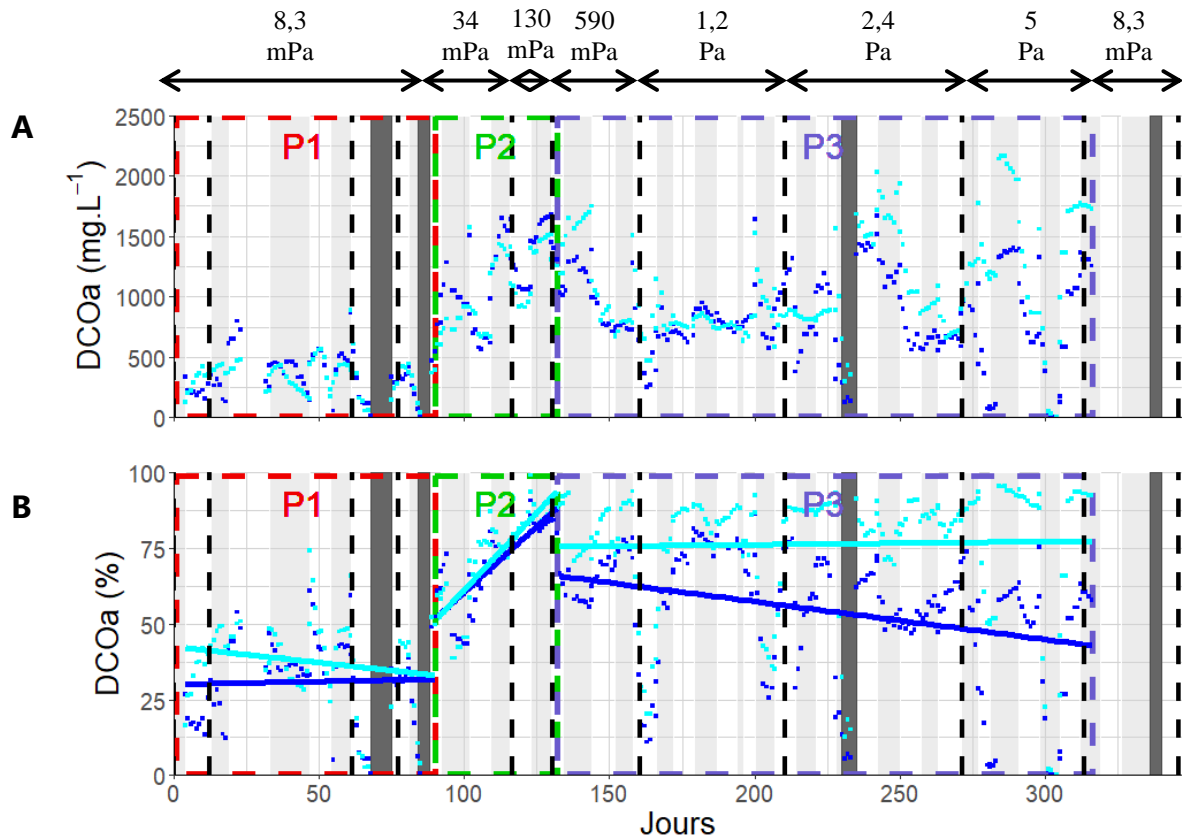


Figure 4.2: Abattement journalier de la DCO totale (■) et soluble (■)

A) Concentration de DCO ou B) pourcentage rapportée à la DCO en entrée du réacteur. Les lignes représentent les courbes de tendance des DCO totale et soluble en fonction des périodes identifiées (jour 0 à 90, jours 90 à 132 et jours 132 à 316). Ces trois périodes sont indiquées par les cadres colorés.

Afin de disposer des conditions d'alimentation et de consommation de DCO au sein du réacteur lors de périodes de caractérisation des anodes microbiennes par voltammétrie cyclique, les DCO totale et soluble mesurées en entrée et sortie de réacteur lors des jours de prélèvement de biofilm sont reportées dans la Table 4-3. Ces données font apparaître des DCO_{soluble} en sortie inférieures à 200 mgO₂/L, pouvant induire des conditions limitantes d'apport en substrat carboné lors de la réalisation des voltammétries cycliques aux jours 210, 271 et 313.

Table 4-3: Valeurs de DCO (mg.L⁻¹) en entrée (e) et en sortie (s), totale et soluble pour les jours de prélèvement de biofilm associés aux voltammétries cycliques.

En gras, les conditions de DCO solubles en sortie identifiées comme limitantes.

Jour de prélèvement et de réalisation des CV	Contrainte de cisaillement (mPa)	DCOe totale (mgO ₂ /L)	DCOs totale (mgO ₂ /L)	DCOe soluble (mgO ₂ /L)	DCOs soluble (mgO ₂ /L)
77	8,3	1 063	748	973	555
116	34	2 104	432	1 838	380
130	130	1 908	272	1 720	210
160	590	2 354	1 994	2 198	1882
210	1 200	1 485	285	989	105
271	2 400	926	356	821	147
313	5 000	2 164	909	1 862	139

4.3.2.2 Caractéristiques de l'effluent du réacteur : mise en évidence de détachement de biofilm

Des particules de différentes tailles sont observées ponctuellement dans la bouteille tampon en sortie de réacteur lors des augmentations de contraintes de cisaillement au-delà de $\tau = 130$ mPa. Des photographies de la bouteille de prélèvement illustrant les caractéristiques de l'effluent de sortie sont fournies sur la Figure 4.3.

La taille et la composition des particules n'ont pas été caractérisées lors de l'étude, hormis une analyse qualitative des propriétés de l'effluent de sortie, pour les différentes périodes de suivi, en Table 4-4. Cependant deux hypothèses concernant leur origine sont privilégiées :

- La mise en suspension de particules décantées en fond de réacteur, suite à l'augmentation de la vitesse de rotation du cylindre interne pour les différents paliers de contraintes de cisaillement appliqués ;
- Le détachement de biofilm qui peut se faire selon deux mécanismes principaux. Le premier mécanisme, l'érosion, correspond au détachement continu de petites particules à la surface du biofilm. Le second correspond à un détachement volumique, marqué par une libération discontinue de particules de grande taille (du même ordre de grandeur que l'épaisseur du biofilm). La prédominance d'un mécanisme par rapport à l'autre dépend des conditions de culture du biofilm et de son histoire (Telgmann et al., 2004).

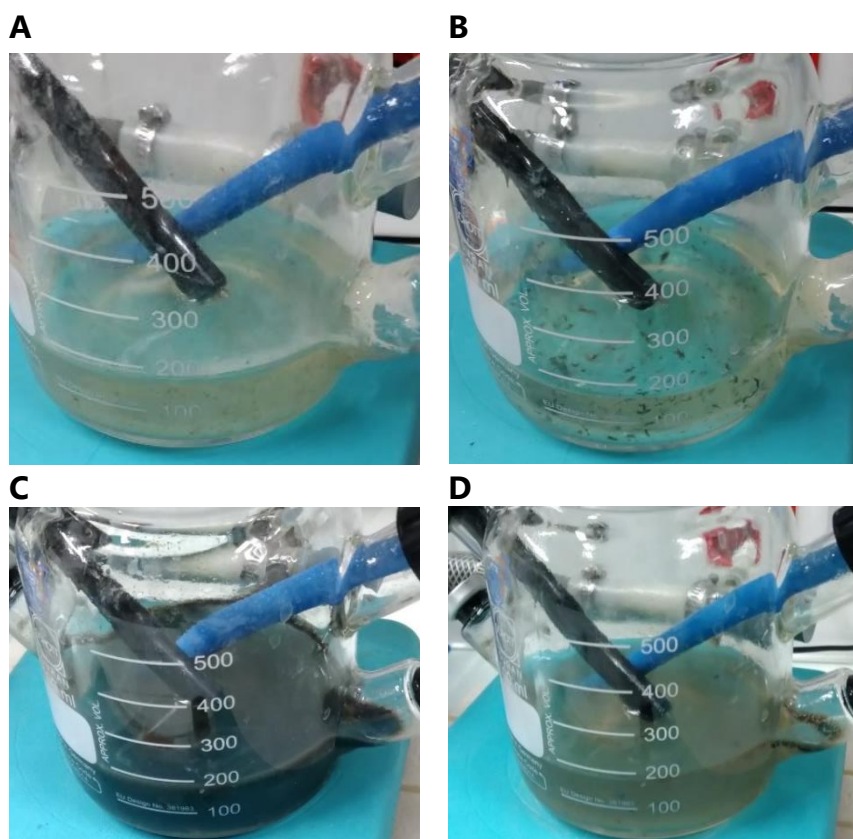


Figure 4.3: Effluent de sortie du réacteur au sein de la bouteille tampon utilisée pour le prélèvement de solution

A) Jour 119 : premier jour de la contrainte à 130 mPa / Pas de particules visibles à l'œil nu. B) Jour 132 : premier jour de la contrainte à 590 mPa / Particules visibles à l'œil nu. C) Jour 215 : quatrième jour de la contrainte à 2,4 Pa / Particules visibles à l'œil nu de différentes tailles. D) Jour 217 : après 6 jours de l'application de la contrainte à 2,4 Pa / Pas de particules visibles à l'œil nu, mais couleur plus foncée qu'au jour 130.

Sur la base de l'analyse qualitative, des particules de grande taille, potentiellement reliées à un détachement du biofilm, sont observées à partir de l'application d'une contrainte de cisaillement de 130 mPa, puis de façon systématique pour chacun des paliers de contraintes successifs Table 4-4. Le détachement observé se poursuit généralement quelques jours après le changement de contrainte, à l'exception de 590 mPa (observation sur l'ensemble de la durée du palier, soit 30 jours). Il apparaît donc que pour chaque palier de contrainte de cisaillement appliqué, les biofilms se sont reconstitués en créant des liaisons adaptées à ces conditions hydrodynamiques spécifiques. L'augmentation de la contrainte de cisaillement lors des changements de paliers successifs provoquerait alors le détachement des parties externes les moins denses et cohésives.

Table 4-4: Analyse qualitative des caractéristiques des particules contenues dans l'effluent en sortie du réacteur.

[++ = Présence significative / + : Présence observée mais non-significative / - : Absence/non-détectées à l'œil nu]

Contrainte de cisaillement appliquée (mPa)	Jours d'opération	Grosses particules (sous forme de fragments)	Petites particules (induisant un changement de coloration/turbidité de l'eau de sortie)
8,3	0-90	-	-
34	90-119	-	-
130	119	-	-
	120-122	+	-
	123-124	++	-
	125-132	+	-
590	132-133	++	+
	134-162	++	-
1 200	162-211	++/+	-
2 400	211-215	++	++
	215-238	+	++
	238-273	+	+
5 000	273-274	++	++
	275-316	+	+
8,3	316-347	-	-

Parallèlement, des particules de petite taille, entraînant un changement de turbidité dans la bouteille de prélèvement, sont également observées en complément (Figure 4.3C) ou non (Figure 4.3D) des particules de tailles plus importantes. Le changement de turbidité de la solution étant difficile à juger à l'œil nu, l'absence de coloration n'est pas forcément significative de l'absence du détachement mais souligne seulement l'intensité de celui-ci. Les changements de coloration sont principalement observés pour des contraintes de cisaillement supérieures à 2,4 Pa mais apparaissent ponctuellement dès la contrainte de 590 mPa (Table 4-4). Ils sont détectés sur des temps courts correspondant à 1 ou 2 temps de séjour hydraulique (jours 132-133 [590 mPa], 211-215 [2,4 Pa], 273-274 [5 Pa]). De plus, ils surviennent systématiquement suite à des changements de vitesse de rotation du cylindre interne. Les particules sont donc éliminées du réacteur définitivement, sans renouvellement en apparence. L'hypothèse d'une mise en suspension de particules décantées est alors la plus probable pour ces périodes spécifiques.

D'autres changements de colorations sont maintenus sur des durées plus longues avec souvent une moins grande intensité (jours 215-238, jours 238-273, jours 275, jour 316), signifiant qu'une production continue de ces particules détachées a lieu dans le réacteur. Cela irait alors dans le sens d'une érosion continue de biofilm qui pourrait être couplée au détachement de plus grosses particules se retrouvant dans la phase

liquide. Cela concerne en particulier les deux contraintes de cisaillement les plus élevées de 2,4 et 5 Pa, respectivement.

Des analyses plus complètes devront être réalisées lors d'expérimentations ultérieures, afin de caractériser les particules évacuées, notamment la concentration en matières en suspension afin d'estimer une masse détachée de biofilm. Des caractérisations physico-chimiques dont celles des produits microbiens solubles et substances polymériques extracellulaires et/ou la composition microbiologique, granulométrie... pourront être effectuées.

4.3.3 Evolution temporelle de l'activité bio-électrochimique

4.3.3.1 Quantité globale d'électricité générée au niveau des anodes microbiennes polarisées et efficacité coulombique associée

L'évolution générale de la quantité globale d'électricité échangée quotidiennement par le système est présentée en Figure 4.4. Cette quantité est obtenue en intégrant le courant pour l'ensemble des électrodes polarisées en fonction du temps pour chaque jour d'opération (Q_{quot}). Cette représentation permet de lisser les effets de perturbations ponctuelles dus notamment aux interventions manuelles de maintenance sur le réacteur et au bullage d'azote quotidien.

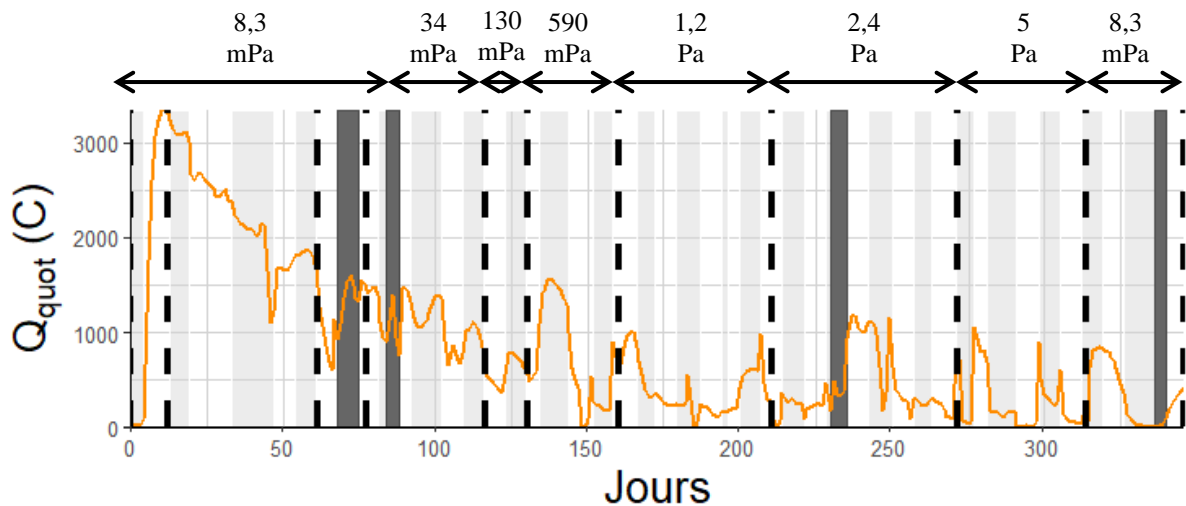


Figure 4.4: Evolution de la quantité d'électricité journalière (–) au cours du temps.

Les contraintes de cisaillement appliquées sont reportées dans la partie supérieure de la figure. Les points de prélèvement des biofilms sont indiqués par les lignes en pointillés.

Afin de dégager la tendance globale de l'évolution de cette quantité d'électricité, une moyenne des Q_{quot} obtenus est réalisée pour chaque palier de contrainte de cisaillement (Figure 4.5).

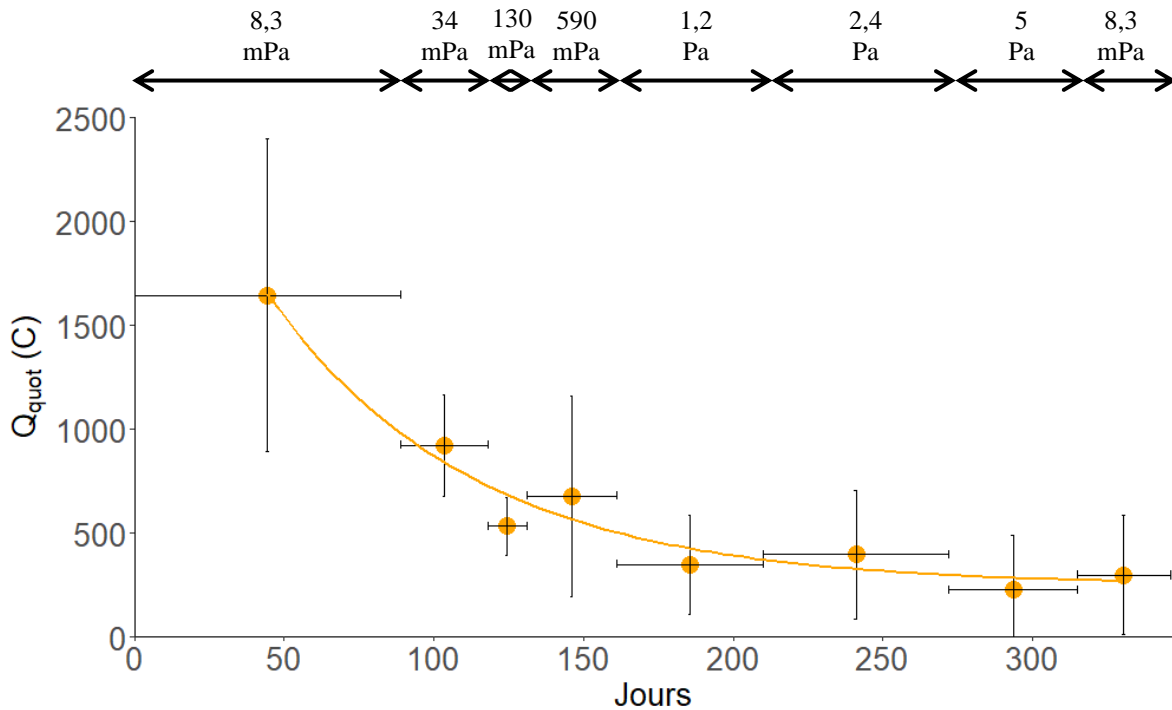


Figure 4.5: Evolution de la quantité d'électricité journalière moyenne pour chaque palier de contrainte de cisaillement.

Les barres horizontales représentent un palier de cisaillement donné et les barres d'erreur verticales représentent l'écart type de la quantité d'électricité pour chaque palier.

La courbe obtenue possède une allure exponentielle décroissante en fonction du temps. Une valeur moyenne de $1650 \pm 750 \text{ C.j}^{-1}$ est déterminée pour la contrainte de cisaillement initiale de 8,3 mPa, atteignant $228 \pm 236 \text{ C.j}^{-1}$ pour le palier de contrainte à 5 Pa. Au regard de ces données, il est difficile de dissocier l'effet de la croissance des contraintes de cisaillement de celui du temps sur la décroissance continue des quantités d'électricité échangées.

Cette analyse globale est couplée à une analyse plus fine des évolutions ponctuelles observées pour la quantité d'électricité journalière générée par les anodes microbiennes polarisées. Des pics de quantité d'électricité sont observés au cours de l'ensemble des phases de suivi et sont identifiés par des lettres grecques (α à κ) sur la Figure 4.6A.

Ces fluctuations temporelles illustrent un système complexe en lien avec l'alimentation en eaux usées réelles de composition variable au cours du temps. Ces fluctuations sont systématiquement corrélées à un renouvellement de la solution d'alimentation ayant des concentrations en DCO totale et soluble supérieures à $2000 \text{ mgO}_2.\text{L}^{-1}$ après supplémentation en acétate (Figure 4.6A). La quantité d'électricité réagit alors positivement à la DCO en entrée du réacteur. Les anodes microbiennes semblent donc agir comme des capteurs de DCO, réagissant par une réponse en courant aux variations

de DCO dans le réacteur.

A partir de la contrainte de 34 mPa, et en dehors des périodes de pics de DCO en entrée mis en évidence ci-dessus, la DCO soluble est relativement faible en sortie de réacteur. Elle est en moyenne de $170 \pm 90 \text{ mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}$ sur la période et atteint régulièrement un seuil minimal de $80 \text{ mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}$ (Figure 4.1D). Cette concentration est très faible au regard de la DCO soluble de l'alimentation (en moyenne $970 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en dehors des pics de concentration et $1500 \text{ mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}$ en comptant ces pics). Cela souligne une consommation importante du substrat au sein du réacteur, pouvant créer des limitations d'apport en matière organique *via* la diffusion au sein du biofilm. Cette limitation peut être particulièrement marquée à partir du jour 132, à partir duquel les concentrations de DCO soluble en sortie sont inférieures à $200 \text{ mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}$ 60% du temps.

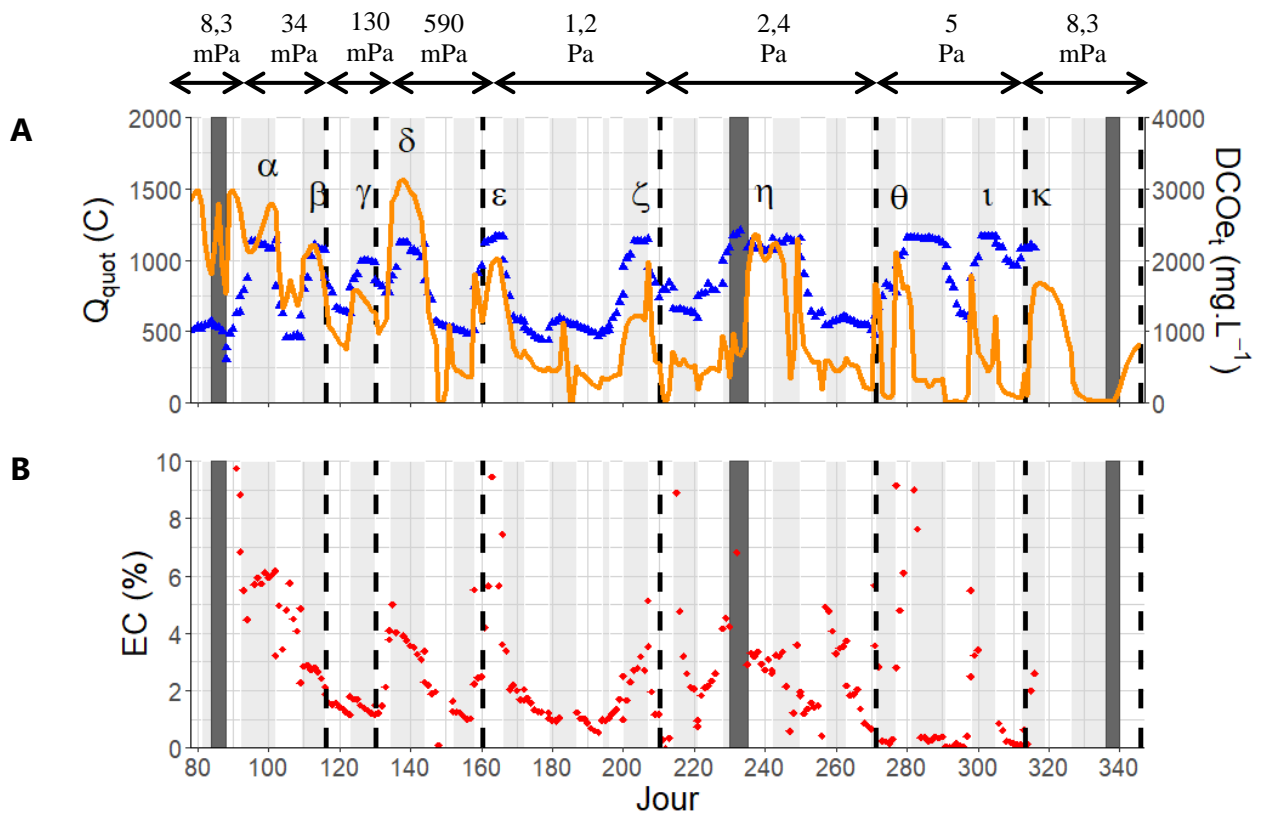


Figure 4.6: A) Quantité d'électricité journalière (—) et DCO_{total} entrante (▲) des jours 78 à 347. B) Evolution de l'efficacité coulombique résultante (◆) (zoom sur 6%).

Les évolutions de cette quantité d'électricité journalière (Q_{quot}) peuvent être quantifiées en fonction des différentes phases de contraintes de cisaillement opérées. La chute de Q_{quot} la plus importante est observée lors de la période initiale de 90 jours à 8,3 mPa ($\Delta Q_{quot} = -1,6 \cdot 10^3 \text{ C}\cdot\text{j}^{-1}$), en comparaison des chutes observées des jours 90 à 316 ($\Delta Q_{quot} = -4,7 \cdot 10^2 \text{ C}\cdot\text{j}^{-1}$), lorsque les contraintes de cisaillements augmentent progressivement de 34 mPa à 5 Pa (Figure 4.5).

La Figure 4.6B (zoomée) présente l'évolution de l'efficacité coulombique (EC) au cours

du temps, définie par:

$$EC(\%) = 100 \frac{n_i M_{O_2}}{n_e F} \frac{\Delta Q_{quot}}{V \Delta DCO_{quot}} \quad (4.5)$$

où M_{O_2} est la masse molaire de l'oxygène (32 g.mol⁻¹), n_i le coefficient stœchiométrique de l'oxygène (1), n_e le nombre d'électrons échangés par mole d'oxygène (4), F la constante de Faraday (96 485 C.mol⁻¹), V le débit journalier du réacteur (L.j⁻¹), ΔQ_{quot} la quantité d'électricité produite par jour (C. j⁻¹) et ΔDCO_{quot} le flux quotidien de DCO abattue (gO₂.j⁻¹).

En lien avec l'évolution décroissante de la quantité globale d'électricité produite par les bio-anodes, une décroissance globale de l'EC est observée, avec une valeur maximale de 41 % mesurée lors de la phase initiale de suivi ($\tau = 8,3$ mPa) jusqu'à atteindre des valeurs particulièrement faible (< 0,5 % hors pics) pour la phase correspondant au palier de contrainte de cisaillement de 5 Pa. Ces résultats mettent en évidence la perte d'efficacité du système électroactif au cours du temps. Les électrons issus de l'oxydation de la DCO sont donc de moins en moins transférés à l'électrode. Cela peut être dû à plusieurs voies :

- La consommation de la DCO *via* des microorganismes aérobies (intégrés au biofilm ou planctoniques) en compétition pour le substrat carboné avec les microorganismes électroactifs anaérobies du biofilm. Les apports en oxygène (concentration en oxygène dissous non-mesurée au sein du réacteur) pourraient être liés à des transferts au niveau de la surface libre du réacteur, pouvant s'intensifier avec l'augmentation des vitesses d'agitation du réacteur. Ils pourraient être quantifiés dans des études ultérieures afin de déterminer précisément les flux d'oxygène potentiels. Les apports en oxygène maximums *via* la surface du réacteur (en considérant une fuite dans la partie supérieure induisant une concentration équivalent à celle de l'air atmosphérique dans celui-ci) ont été estimés (calcul présenté en Annexe 4B). Néanmoins, l'ordre de grandeur obtenu ne permet pas de justifier cette consommation de DCO (hors conversion par voie bio-electrochimique). A noter que ces phénomènes de transfert sont potentiellement limités par le renouvellement régulier du gaz de la zone supérieure du réacteur par circulation d'un flux de N₂. De plus, la concentration en oxygène de l'alimentation était maintenue à inférieure à 0,1 mg.L⁻¹ (mesure à l'aide d'une sonde O₂ positionnée dans le tank d'alimentation) par bullage à l'azote ;
- Le développement au cours de temps de microorganismes capables d'utiliser les électrons produits par l'oxydation de la matière organique avant qu'ils ne soient transmis à l'électrode comme évoqué dans le Chapitre 3.

4.3.3.2 Analyse du comportement individualisé de chacune des bio-anodes : Impact du potentiel appliqué

4.3.3.2.1 Suivi de la densité de courant en électrolyse à potentiel imposé (chronoampérométrie)

Pour discerner les comportements liés au potentiel appliqué, les densités de courant obtenues pour chaque potentiel sont analysées de façon indépendante. La Figure 4.7 présente la moyenne journalière des densités de courant des trois réplicas soumis chacun au même potentiel.

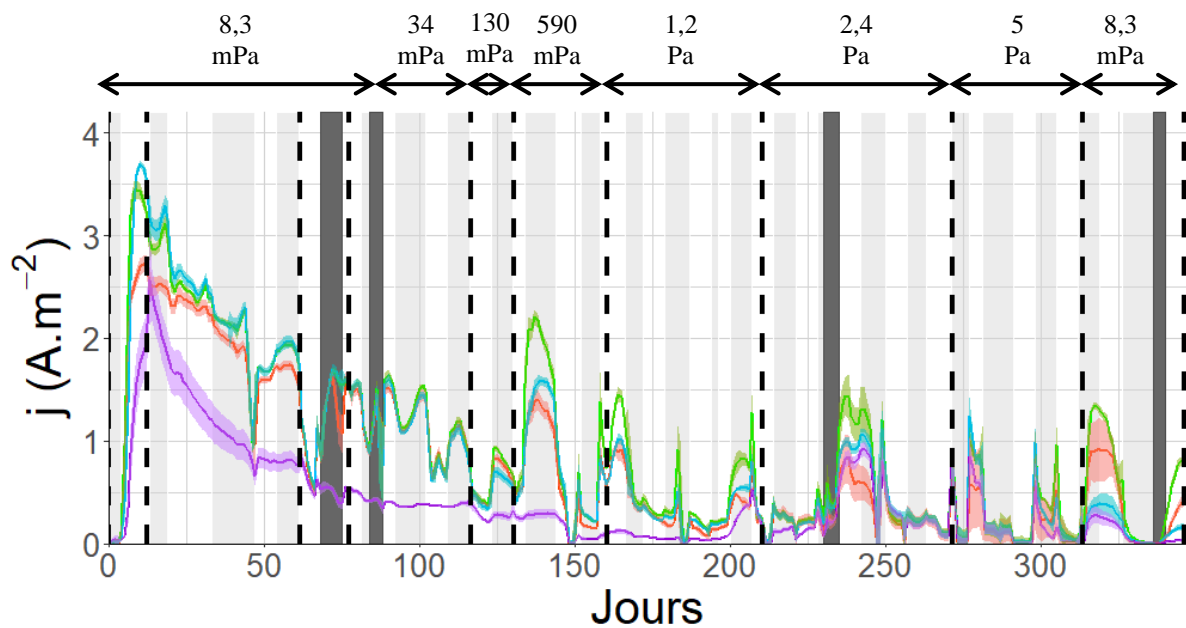


Figure 4.7: Evolution de la densité de courant au cours du temps, moyenne de trois triplicats pour chaque condition de potentiel imposé.

Code couleur : - : -300 mV/ECS, - : -150 mV/ECS, - : 0 mV/ECS, - : 150 mV/ECS. Les zones colorées autour des courbes représentent l'écart-type des triplicats.

Les observations relatives à l'évolution de la quantité d'électricité globale commentée ci-dessus restent valables pour chaque groupe d'électrodes, notamment en ce qui concerne la décroissance de la densité de courant au cours du temps et les perturbations ponctuelles tels que les pics liés à la DCO entrante et les chutes liées au pH en sortie de réacteur.

L'évolution de la densité de courant au cours du temps est analysée pour chacun des paliers de contraintes de cisaillement, à savoir :

- Phase 1 : $\tau = 8,3$ mPa (Chapitre 3) :

Au jour 89, les potentiels de -300, -150 et 0 mV/ECS donnent des densités de courant très similaires, peu variables ($1,51 \pm 0,05$ [3], $1,60 \pm 0,06$ [3] et $1,55 \pm 0,06$ [3] A.m^{-2} , respectivement) et significativement plus grandes que le potentiel de 150 mV/ECS ($0,41 \pm 0,01$ [3] A.m^{-2}).

- Phase 2 : $\tau = 34$ mPa (Figure 4.8) :

Pour la contrainte de 34 mPa (jours 90-119), la densité de courant mesurée évolue de façon équivalente, soit de $1,77 \pm 0,06$ (3) à $0,48 \pm 0,06$ (3) A.m^{-2} pour les électrodes aux potentiels de -300, -150 et 0 mV/ECS et de $0,45 \pm 0,01$ (3) à $0,33 \pm 0,04$ (3) A.m^{-2} pour les électrodes au potentiel de +150 mV/ECS. On observe également que la faible variabilité entre les triplicats est conservée.

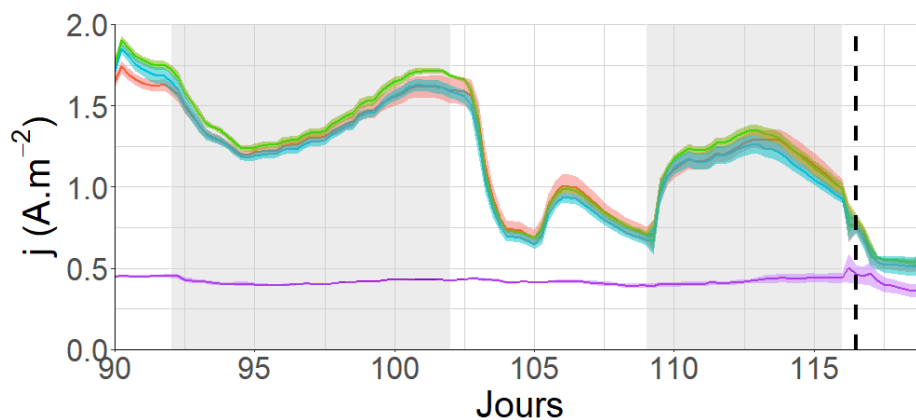


Figure 4.8: Evolution de la densité de courant au cours de la phase 2 – Palier de contrainte de cisaillement de 34 mPa.

Code couleur : - : -300 mV/ECS, - : -150 mV/ECS, - : 0 mV/ECS, - : 150 mV/ECS.

- Phase 3 : $\tau = 130$ mPa (Figure 4.9) :

Pour la contrainte de 130 mPa (jours 119 à 132), des différences significatives apparaissent entre les densités de courants enregistrées avec des valeurs de $0,69 \pm 0,06$ (3), $0,83 \pm 0,03$ (3) et $0,93 \pm 0,04$ (3) A.m^{-2} pour les électrodes polarisées à 0, -300, -150 mV/ECS respectivement, au jour 124 lorsque l'écart est le plus important (correspondant au jour suivant un changement d'alimentation). Ces différences s'atténuent progressivement jusqu'au changement d'alimentation suivant au jour 130. On peut noter que les électrodes polarisées à 150 mV/ECS continuent de produire les courants les plus faibles ($<0,5$ A.m^{-2}).

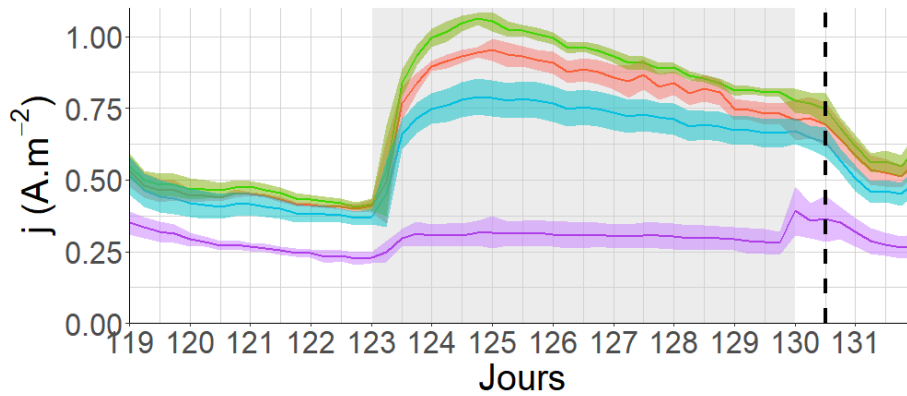


Figure 4.9: Evolution de la densité de courant au cours de la phase 3 – Palier de contrainte de cisaillement de 130 mPa.

Code couleur : - : -300 mV/ECS, - : -150 mV/ECS, - : 0 mV/ECS, - : 150 mV/ECS.

- Phases 4 et 5 : $\tau = 590$ et $1\ 200$ mPa respectivement (Figure 4.10) :

Pour l'ensemble des phases 4 et 5, la variabilité inter-réplica augmente par rapport aux phases précédentes mais reste faible avec des écarts relatifs maximaux de 0,40, 0,36, 0,29 et 0,42 $\text{A}\cdot\text{m}^{-2}$ pour les potentiels respectifs de -300, -150, 0, 150 mV/ECS. Concernant les différences entre les potentiels, les densités de courant générées par l'électrode polarisée à -150 mV/ECS restent supérieures à celles produites aux autres potentiels. De plus, les densités de courant du potentiel de 0 mV/ECS deviennent supérieures à celles de -300 mV/ECS sur quasiment l'ensemble de la période concernée. Cette période est également marquée le changement de l'origine de l'eau usée au jour 196 provoquant des évolutions sensibles des courants générés par l'ensemble des électrodes. A noter que les électrodes polarisées à 150 mV/ECS donnent encore de faibles courants sur la première partie de la période, suivi d'une augmentation significative de leur activité à partir du jour 200.

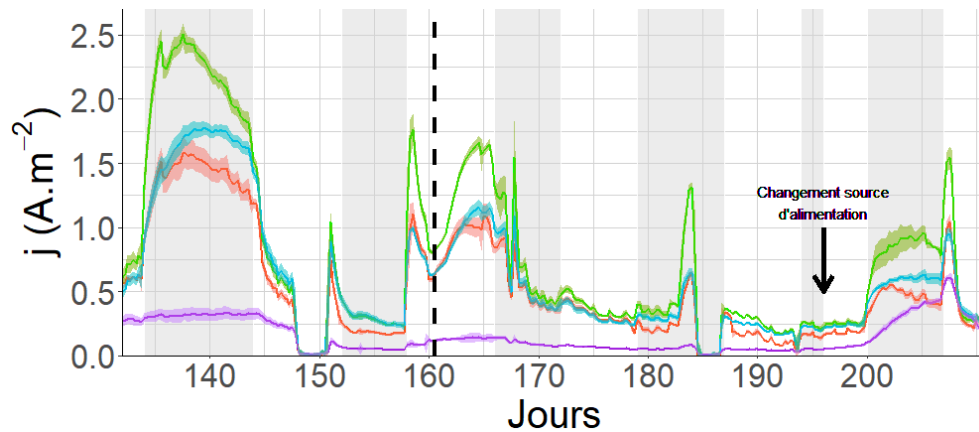


Figure 4.10 : Evolution de la densité de courant au cours des phases 4 et 5 – Palier de contrainte de cisaillement de 590 et 1200 Pa.

Code couleur : - : -300 mV/ECS, - : -150 mV/ECS, - : 0 mV/ECS, - : 150 mV/ECS.

- Phases 6 et 7 : $\tau = 2,4$ et 5 Pa respectivement (Figure 4.11) :

Les phases 6 et 7 sont marquées par une plus forte variabilité entre les triplicats des électrodes polarisées par rapport aux phases précédentes, particulièrement pour les électrodes à -300 mV/ECS. Cette différence varie de 7 % au jour 214 (au début de l'application de la contrainte de 2,4 Pa) à 33 % au jour 247, pour atteindre 70 % au jour 280. Cette période est également marquée par des courants faibles générés par l'ensemble des électrodes, quels que soient les potentiels imposés.

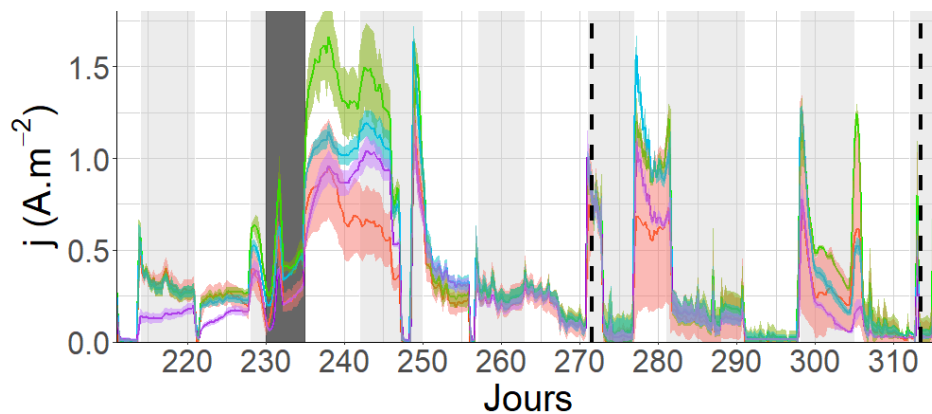


Figure 4.11 : Evolution de la densité de courant au cours des phases 6 et 7 – Palier de contrainte de cisaillement de 2,4 et 5 Pa.

Code couleur : - : -300 mV/ECS, - : -150 mV/ECS, - : 0 mV/ECS, - : 150 mV/ECS.

- Phase 8 : $\tau = 8,3$ mPa (Figure 4.12) :

Lors du retour à la contrainte de 8,3 mPa au cours de la phase 8, les dix premiers jours sont toujours marqués par une grande variabilité pour les triplicas des électrodes à un même potentiel (en moindre mesure pour les électrodes à -150 mV/ECS). Cependant, une distinction nette de densité de courant apparaît entre les électrodes aux plus bas potentiels (-300 et -150 mV/ECS), plus performantes avec des densités respectives de $0,86 \pm 0,22$ (3) et $0,95 \pm 0,05$ (3) A.m^{-2} au jour 324, et les électrodes à 0 et 150 mV/ECS ($0,38 \pm 0,11$ [3] et $0,24 \pm 0,06$ [3] A.m^{-2} au jour 324, respectivement). Une période de mise en recirculation (jours 336 à 340), suite à la perte d'activité concomitante à une diminution du pH (Figure 4.1B), permet de retrouver les faibles variabilités absolues inter-triplicas obtenues à 130 mPa avec des densités de courant de $0,03 \pm 0,02$ (3), $0,17 \pm 0,04$ (3), $0,41 \pm 0,05$ (3) et $0,79 \pm 0,04$ (3) A.m^{-2} pour les électrodes polarisées aux potentiels respectifs de 150, 0, -300 et -150 mV/ECS (depuis les électrodes les moins performantes aux plus performantes).

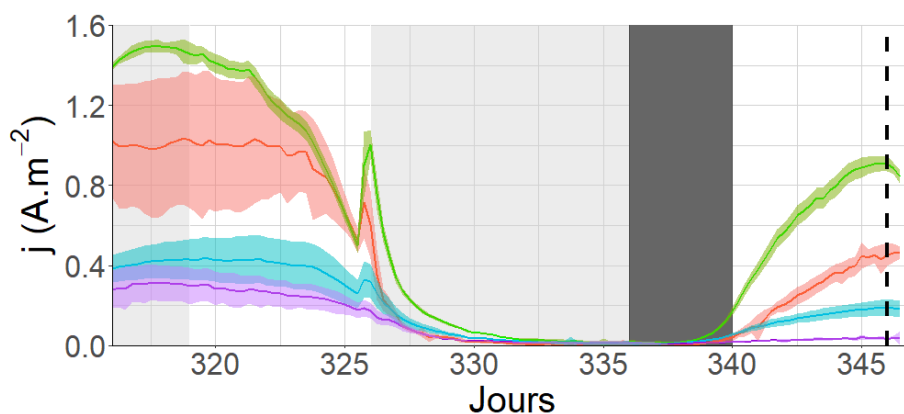


Figure 4.12 : Evolution de la densité de courant au cours de la phase 8 – Palier de contrainte de cisaillement de 8,3 mPa.

Code couleur : - : -300 mV/ECS, - : -150 mV/ECS, - : 0 mV/ECS, - : 150 mV/ECS.

4.3.3.2.2 Caractérisation de la catalyse microbienne par voltammétrie cyclique (CV)

Des voltammétries cycliques (CV) ont été réalisées au cours de l'expérimentation aux jours correspondant aux prélèvements indiqués dans la Table 4-2 et représentés sur chacune des figures par une barre verticale pointillée. Il est important de noter que des conditions potentiellement limitantes en substrat carboné au sein du réacteur ont été identifiées au paragraphe 4.3.2.1 (cf. valeurs en gras dans le Table 4-3). Ainsi seules les CV correspondant aux paliers de contraintes de cisaillement de 8,3, 34, 130 et 590 mPa sont considérées en conditions non-limitantes en DCO soluble et permettent une comparaison des enregistrements de CV obtenus d'une contrainte de cisaillement à l'autre.

La Figure 4.13 présente les densités de courant mesurées en fonction du potentiel (à une vitesse de balayage de 1 mV.s^{-1}), pour l'ensemble des électrodes du réacteur (polarisées et en circuit ouvert) et pour les différents jours de mesure. La contrainte de

cisaillement appliquée lors de la mesure est donnée dans la partie supérieure de chacune des figures. Afin d'évaluer l'effet du potentiel imposé, chaque courbe de CV est représentée sur une échelle libre. A noter que des phénomènes ponctuels associés à des valeurs de potentiel et de cisaillement spécifiques ont été identifiés pour certains jeux d'électrodes. Leur interprétation spécifique est réalisée en Annexe 4C.

Les courbes de CV révèlent l'apparition d'un courant limite d'oxydation, matérialisé par un plateau aux valeurs de potentiels les plus élevées sur les voltammogrammes (au-delà de -200 mV/ECS). C'est le cas de toutes les courbes enregistrées avec les électrodes polarisées à -300 et -150 mV/ECS. Les courbes des électrodes polarisées à ces potentiels ont des allures semblables, avec des densités de courant significativement supérieures aux autres conditions de potentiel (0, 150 mV/ECS) et en circuit ouvert.

L'apparition d'un courant limite, c'est-à-dire d'un plateau de courant qui ne dépend plus du potentiel imposé, est caractéristique de l'occurrence d'un processus limitant qui ne dépend pas du transfert d'électrons à la surface de l'électrode. Ici, en oxydation, le transfert d'électrons à la surface de l'électrode devient de plus en plus rapide à mesure que le potentiel augmente, jusqu'à ce qu'un processus indépendant du potentiel vienne limiter la vitesse globale du système. En électrochimie conventionnelle, il s'agit généralement d'une limitation par le transfert du réactif vers la surface de l'électrode. Dans le cadre de l'électrochimie microbienne, il peut s'agir d'une limitation due (i) au transfert du substrat vers les microorganismes, (ii) à la vitesse de production des électrons par les voies métaboliques microbiennes ou (iii) au transfert des électrons des cellules vers la surface de l'électrode.

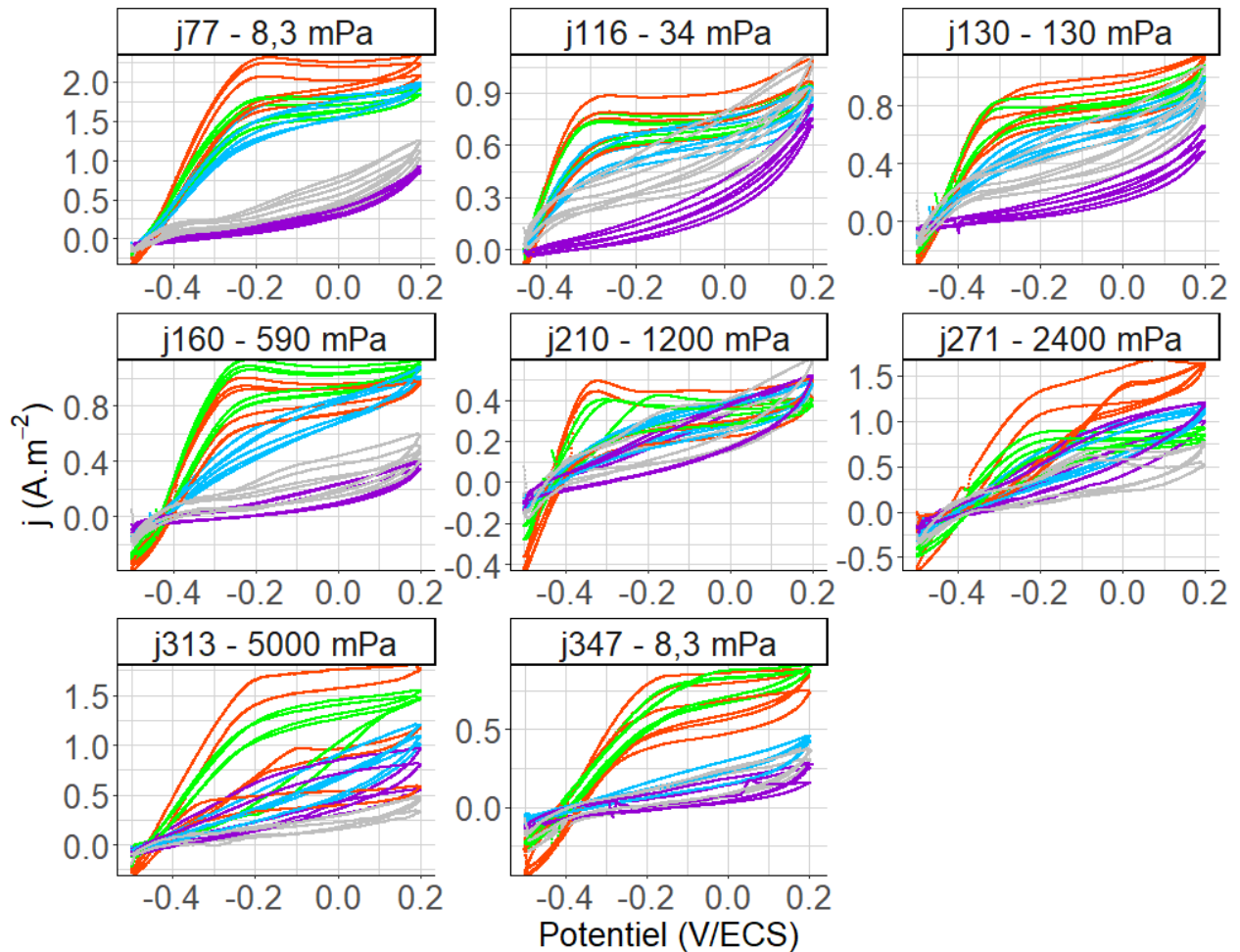


Figure 4.13 : CV après prélèvements de biofilms des électrodes polarisées à - : -300 mV/ECS, - : -150 mV/ECS, - : 0 mV/ECS, - : 150 mV/ECS, - : OCP.

A l'inverse, la plupart des courbes de CV enregistrées avec les électrodes polarisées à 150 mV/ECS et les électrodes laissées en circuit ouvert ne présentent pas de courant limite, à l'exception des électrodes en circuit ouvert soumises à 2,4 Pa (jour 271). Pour ces courbes ne présentant pas de plateau d'oxydation, le transfert électronique à l'interface ne devient jamais suffisamment rapide pour qu'une étape limitante soit atteinte.

Les CV des électrodes polarisées à 0 mV/ECS révèlent une diminution relative de la catalyse par rapport aux électrodes polarisées à -300 et -150 mV/ECS à partir de la contrainte de 590 mPa. Le plateau correspondant au courant limite commence alors à disparaître, révélant un comportement catalytique proche des électrodes polarisées à 150 mV/ECS et à l'OCP. La catalyse tend à devenir négligeable à partir du jour 210 pour la contrainte de 1,2 Pa.

Les valeurs moyennes de densité de courant limite sont reportées sur la Figure 4.14 afin d'observer leur évolution dans le temps et l'application progressive des paliers de contraintes de cisaillement pour chaque triplica. Lorsque les courbes de CV ne

présentent pas de courant limite, la valeur portée sur la Figure 4.14 est la moyenne des densités de courant mesurées sur la courbe d'oxydation de 150 à 200 mV/ECS.

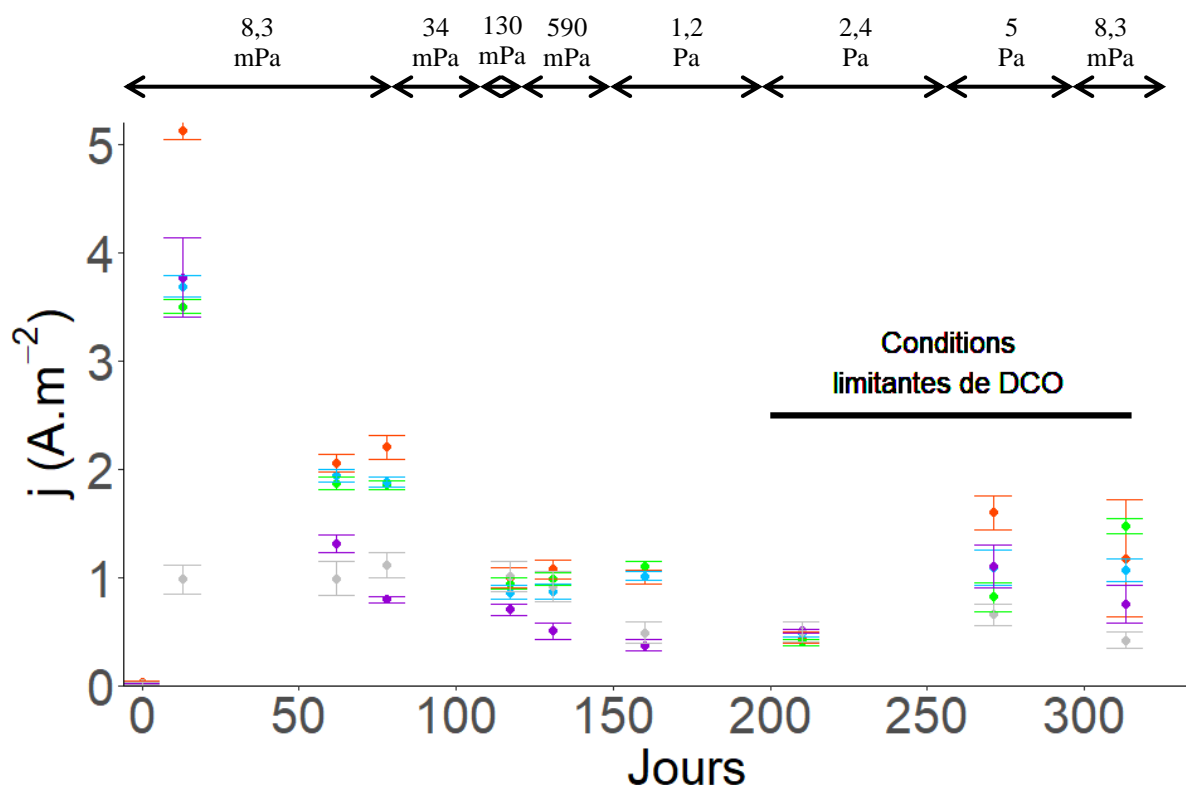


Figure 4.14 : Densités de courant moyennes entre 0,15 et 0,2 V/ECS

Correspondants aux courants limites ou aux courant maximums pour les courbes ne présentant pas de plateaux d'oxydation en fonction des différentes contraintes de cisaillement et des potentiels imposés : ● : -300 mV/ECS, ● : -150 mV/ECS, ● : 0 mV/ECS, ● : 150 mV/ECS, ● : OCP. Les barres d'erreur correspondent aux écart-type des triplicas.

Pour rappel, les points à partir du jour 210 peuvent présenter des limitations de l'activité bio-électrochimique dues aux faibles concentrations de DCO dans le réacteur (Table 4-3). Par conséquent, ils ne seront pas comparés quantitativement avec les contraintes précédentes, qui disposent de concentrations en DCO supérieures et potentiellement en excès.

L'évolution globale observée présente une décroissance des densités de courant moyennes issues des CV en fonction du temps. Cependant, une analyse des comportements spécifiques peut être réalisée pour différentes périodes :

- Jours 0 (8,3 mPa) – 116 (34 mPa) : l'ensemble des électrodes polarisées sont marquées par une décroissance des densités de courant limite. Les électrodes en circuit ouvert donnent des densités de courant maximales significativement plus faibles et constantes en comparaison des autres électrodes.

- Jours 116 (34 mPa) – 160 (590 mPa) : Une évolution relativement constante avec une convergence des courants limites pour les électrodes polarisées à -300, -150 et 0 mV/ECS est observée. Les densités de courant maximales des électrodes polarisées à 150 mV et en circuit ouvert diminuent sur cette période.
- Jours 210 (1,2 Pa) – 313 (5 Pa) : Les courants obtenus au jour 210 sont assez proches pour toutes les électrodes et ont été reliés à une DCO soluble en sortie de réacteur considérée limitante ($105 \text{ mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1}$). Les valeurs de courant limite observées sont néanmoins relativement élevées pour les contraintes de 2,4 et 5 Pa en comparaison des valeurs relevées sur les phases précédentes, compte-tenu des limitations potentielles en DCO soluble pour ces mesures spécifiques. Les contraintes de cisaillement élevées (2,4 et 5 Pa) sont associées à des courants maximum élevés, principalement pour le potentiel appliqué de -150 mV/ECS (malgré des quantités limitantes de DCO qui conduisent à potentiellement sous-estimer leurs valeurs). Ce résultat contraste avec la dynamique décroissante des densités de courant reportée sur la Figure 4.7.
- Jour 316 (8,3 mPa) : La concentration en DCO en entrée et en sortie de réacteur lors du retour à la contrainte de 8,3 mPa au jour 316 n'a pas été mesurée. Aussi, des précautions doivent être prises lors de l'interprétation des résultats de ce palier. Toutefois, on observe que les biofilms obtenus présentent à nouveau une faible variabilité des densités de courant entre les triplicatas et que les densités de courant maximales relevées sont proches de celles obtenues à la contrainte de 590 mPa en conditions de DCO non-limitante (-15 et -19 % de moins pour les électrodes polarisées à -300 et -150 mV/ECS au regard des valeurs relevées pour le palier de contrainte de 590 mPa).

Les anodes microbiennes développées à 0 mV/ECS semblent être impactées négativement par les évolutions successives de la contrainte de cisaillement (Figure 4.14) et ne donnent plus que des performances catalytiques faibles (Figure 4.13) proches de celles des électrodes développées à 150 mV/ECS et en circuit ouvert. Ce potentiel ne permet donc pas de maintenir une catalyse microbienne résistante à l'augmentation des contraintes de cisaillement, contrairement aux potentiels de -300 et -150 mV/ECS qui permettent le développement d'un biofilm électroactif plus résistant.

4.3.4 Populations microbiennes présentes et actives

Le séquençage de la région d'ADN hypervariable V4-V5 codant l'ARN ribosomique a permis d'identifier les différents genres bactériens présents dans chaque échantillon par metabarcoding 16S (Figure 4.15A). Le séquençage des ARNr correspondants, sous forme d'ADN complémentaire, a permis de révéler les genres les plus actifs (Figure 4.15B).

La Figure 4.15 présente l'évolution au cours du temps des abondances relatives des dix populations les plus représentées en considérant l'ensemble des séquences obtenues à partir des extraits d'ADN (Figure 4.15A) et d'ARN (Figure 4.15B). Au vu de la reproductibilité satisfaisante des analyses de communautés microbiennes par séquençage d'électrodes opérées en réplica constatée dans le Chapitre 3, il a été décidé de ne procéder au séquençage que d'un seul réplica. Ces figures n'intègrent donc que les séquences correspondant à six électrodes : une représentative de chaque condition de potentiel (-300, -150, 0 et 150 mV/ECS), une pour la condition en circuit ouvert et une pour les électrodes non-connectées au potentiostat.

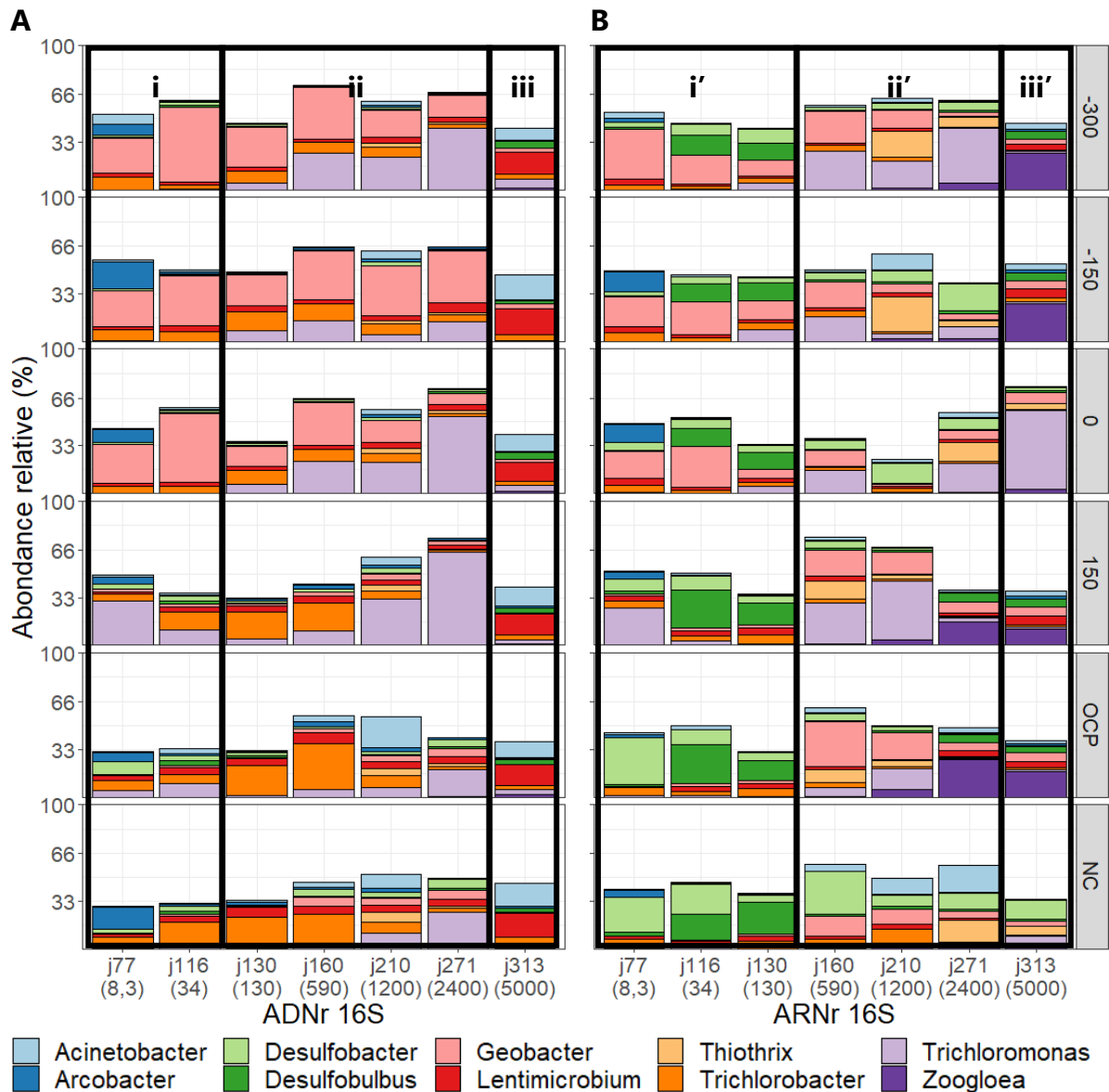


Figure 4.15 : Représentation des abondances relatives des dix genres bactériens les plus représentés

A) Genres majoritaires (ADNr 16S) et B) genres les plus actifs (ARNr 16S) au cours du temps. Les différentes conditions de potentiel imposé sont indiquées en mV/ECS (colonne de droite). La condition OCP représente les électrodes en circuit ouvert et la condition NC les électrodes non-connectées. Les contraintes de cisaillement sont indiquées entre parenthèses en mPa en dessous des jours de prélèvements.

4.3.4.1 Evolution des populations microbiennes et des genres les plus actifs au cours du suivi

Parmi les dix genres bactériens majoritaires représentés sur la Figure 4.15A, *Geobacter* et *Trichloromonas* semblent particulièrement importants dans quasiment tous les biofilms issus d'électrodes polarisés (-300, -150, 0 et 150 mV/ECS). Cependant, lors de la mesure du jour 313 (5 Pa), il apparaît que la somme de leurs proportions est assez faible sur toutes les électrodes (<9 %). *Geobacter* était attendue, puisqu'elle est souvent

retrouvée en grandes proportions dans les systèmes électro-microbiens, alors que *Trichloromonas* n'est pas particulièrement connue pour son comportement électroactif.

En comparaison, la somme des abondances respectives de *Geobacter* et *Trichloromonas* reste relativement constante soit 41 ± 13 % (18) jusqu'au jour 271 (2,4 Pa) pour chaque condition de potentiel de -300 à 0 mV/ECS. L'abondance totale de ces deux genres bactériens est néanmoins associée à des variations spécifiques de chaque population l'une par rapport à l'autre.

Le biofilm développé au potentiel de 150 mV/ECS se distingue car la proportion de *Geobacter* y reste très faible quelle que soit la contrainte de cisaillement étudiée. Seules les évolutions de *Trichloromonas* au sein des biofilms polarisés à 150 mV/ECS sont alors particulièrement visibles et soumises à des évolutions importantes au cours du temps, passant de 31 à 4 % d'abondance relative du jour 77 au jour 130, puis augmentant jusqu'à un maximum de 65 % au jour 271. Comme discuté dans le Chapitre 3 (section 3.3.2.2), ce potentiel pourrait favoriser l'apparition de genres microbiens distincts dès le démarrage de la colonisation de l'électrode.

Trois stades principaux, relatifs aux évolutions des populations microbiennes, sont mis en évidence sur la Figure 4.15A :

- Le stade (i) correspond aux jours 77 et 116 (τ de 8,3 à 34 mPa) pour lesquels *Geobacter* est le genre bactérien majoritaire pour les électrodes polarisées à -300, -150 et 0 mV/ECS ;
- Le stade (ii) regroupe les échantillons des jours 130 à 271 (τ de 130 à 2 400 mPa). Il est caractérisé par une proportion de *Trichloromonas* croissante dans la plupart des biofilms (-300, 0 et 150 mV/ECS) au détriment de *Geobacter*. Pour les biofilms développés à -150 mV/ECS, les proportions de *Trichloromonas* et de *Geobacter* restent relativement constantes sur la période ;
- Le stade (iii) correspond au jour 313 ($\tau = 5$ Pa) durant lequel *Geobacter* et *Trichloromonas* deviennent négligeables sur chaque électrode (< 9% en abondance relative) au profit de *Lentimicrobium* et *Acinetobacter* (> 24% en abondance relative). Contrairement aux stades précédents, on observe également au jour 313 que les proportions de chaque genre bactérien sont relativement similaires dans les biofilms développés, et ce, quel que soit le potentiel imposé ainsi que dans les biofilms de contrôle (OCP ou NC).

Ce découpage en trois stades est également observé pour les évolutions des genres microbiens les plus actifs présentés sur la Figure 4.15B, bien qu'ils soient légèrement différents :

- Le stade (i'), des jours 77 à 130 (τ de 8,3 à 130 mPa), est caractérisé par une activité importante de *Geobacter* sur les électrodes polarisées, à l'exception une nouvelle fois de 150 mV/ECS. De plus, on observe une activité significative de populations peu représentées en termes d'abondance comme *Desulfobulbus* et *Desulfobacter* sur l'ensemble des électrodes (polarisées, OCP et NC) qui semblent se maintenir jusqu'au jour 130 ;
- Lors du stade (ii'), des jours 130 à 271 (τ de 130 à 2 400 mPa), des espèces minoritaires sont détectées sur la base de leur activité. C'est le cas de *Thiothrix*, *Acinetobacter* et *Desulfobacter*. A l'inverse, des espèces majoritaires voient leur activité diminuer, telle que *Geobacter* pour l'ensemble des électrodes polarisées.

Le jour 210 (1,2 Pa) est marqué par des différences importantes d'expressions par rapport aux autres jours de prélèvement pour toutes les conditions de potentiel, possiblement en lien avec la proximité temporelle avec le changement de provenance de l'eau usée d'alimentation du réacteur (changement à partir du jour 196).

A noter également, l'apparition au jour 160 de populations actives de *Geobacter* sur les électrodes polarisées à 150 mV/ECS, en OCP et NC jusque-là non-détectées et peu significatives au niveau des populations microbiennes. De plus cette apparition est conjointe à la très nette diminution de populations de *Desulfobulbus* actives pour toutes les conditions.

- Finalement, le stade (iii'), au jour 313 ($\tau = 5$ Pa), est caractérisé par une forte activité relative de *Zoogloea* dans la plupart des biofilms, exception faite de celui développé à 0 mV/ECS dans lequel *Trichloromonas* reste très active.

L'analyse de la composition du biofilm et de l'activité des genres les plus actifs au regard des conditions hydrodynamique (Table 4-2) fait ressortir les observations suivantes :

L'évolution du régime de vortex ondulé (8,3 puis 34 mPa) au vortex turbulent à partir du jour 119 (échantillon au jour 130 à 130 mPa) semble avoir un faible impact sur les espèces microbiennes présentes. On note cependant l'apparition de *Trichloromonas* qui participe à la décroissance des populations de *Geobacter* sur les électrodes polarisées de -300 à 0 mV/ECS (Figure 4.15A). La diminution des populations de *Geobacter* s'accompagne d'une diminution également de son activité (Figure 4.15B). Il est à noter que ces évolutions ne peuvent être attribuées à l'effet de l'hydrodynamique seule et sont possiblement liées à un effet temporel.

A l'inverse, le passage en régime turbulent et donc l'application d'une contrainte de cisaillement élevée de 5 Pa (échantillon du jour 313) est associé à une modification significative de la composition des biofilms qui est certainement due à son détachement important et possiblement en profondeur. Les éléments permettant

d'étayer cette hypothèse sont, d'une part, le retour à une composition relativement homogène des biofilms, d'autre part, l'augmentation importante de l'activité de *Zoogloea*. Ces deux observations évoquent ce qui avait été constaté spécifiquement sur des biofilms jeunes (après 13 jours de développement, cf. Chapitre 3). Toutefois, ces conditions ne permettent pas d'augmenter la proportion de *Geobacter* ni même son activité.

4.3.4.2 Analyse multivariée

Une analyse statistique par composante principale a été effectuée pour avoir une vision globale de l'évolution des différentes populations microbiennes au cours du temps (leur abondance est donnée selon l'Eq. (4.3)). Des variables explicatives issues d'autres paramètres du réacteur ont ensuite été ajoutées et sont présentées dans la Table 4-5. Ces variables n'interviennent pas dans la construction des axes de l'ACP.

Table 4-5: Variables explicatives prises en compte dans l'analyse multivariée.

Type de données	Variable considérée	Nom associé
Temporelle	Jour de prélèvement	<i>Age</i>
Paramètres opératoires	Vitesse de rotation du cylindre intérieur du réacteur de Couette-Taylor	<i>V_rot</i>
Activité bio-électrochimique	Densité de courant mesurée par chronoampérométrie	<i>j_m</i>
	Densité de courant limite issue de la voltammétrie cyclique	<i>j_L</i>
Physico-chimie	Quantité de DCO totale consommée au sein du réacteur	<i>DCOa_t</i>
	Quantité de DCO soluble consommée au sein du réacteur	<i>DCOa_f</i>

L'analyse est réalisée en séparant les données relatives à l'ADNr (Figure 4.16A) et l'ARNr (Figure 4.16B). Les deux premières composantes principales permettent de décrire près de 40 % de la variance des données (36 et 38 % pour l'ADNr et l'ARNr, respectivement).

La composante principale CP1 permet de bien décrire l'influence temporelle et la vitesse de rotation. En effet, les Figure 4.16A et Figure 4.16B montrent que la variable *Age* est corrélée de façon négative à l'axe CP1, de même que la variable *V_rot*. La vitesse de rotation étant fortement corrélée au temps pour ce jeu de données, leur analyse découplée n'est donc pas possible par cette méthode.

La composante principale CP2 quant à elle permet une bonne description des densités de courant mesurées sur les CV (*j_L*). De plus, celle-ci est négativement corrélée à l'abattement de la DCO totale (*DCOa_t*).

Chapitre 4 : Impact de l'évolution de la contrainte de cisaillement sur l'activité et la composition des biofilms électroactifs

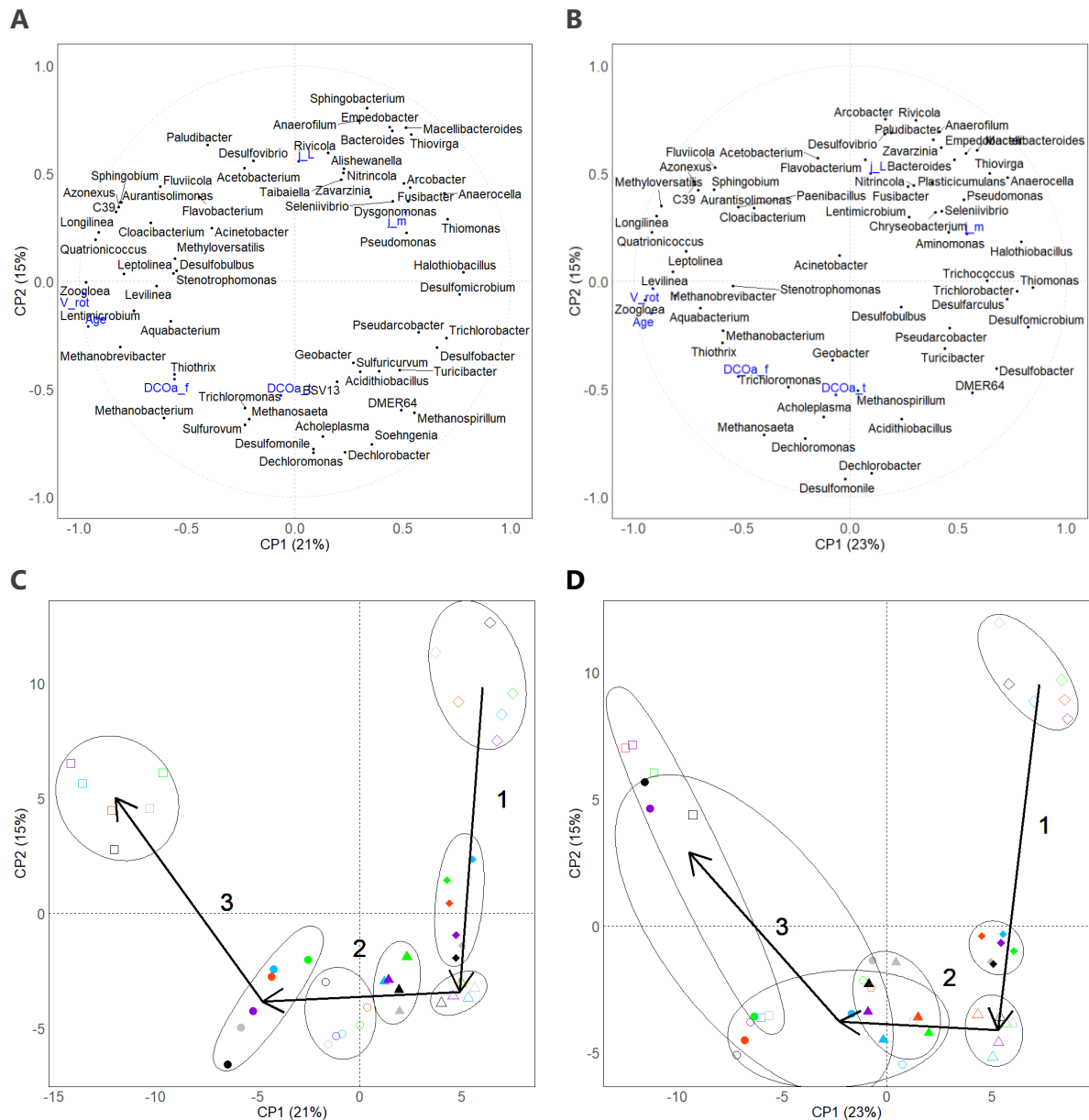


Figure 4.16 : Analyses en composantes principales des populations microbiennes obtenues des jours 77 à 313.

Contribution aux coordonnées principales des genres bactériens majoritaires dans les détectés dans l'ADNr 16S (A) et ARNr 16S (B) et corrélation avec les variables qualitatives (en bleu). Représentation de la composition (C) et de l'activité (D) des biofilms dans le plan des composantes principales. Les ellipses regroupent les échantillons par jour de prélèvement et les flèches représentent leur évolution temporelle. Les couleurs de points déterminent les conditions de potentiel, ● : -300 mV/ECS, ● : -150 mV/ECS, ● : 0 mV/ECS, ● : 150 mV/ECS, ● : OCP, ● : NC. Les formes de points déterminent les jours de prélèvements associés aux différentes contraintes de cisaillement, 77 (8,3 mPa) : ◇, 116 (34 mPa) : ◆, 130 (130 mPa) : △, 160 (590 mPa) : ▲, 210 (1,2 Pa) : ○, 271 (2,4 Pa) : ● et 313 (5 Pa) : □.

Les échantillons sont représentés en séparant les données relatives à l'ADNr (Figure 4.16C) et l'ARNr (Figure 4.16D). Les ACP montrent clairement une évolution temporelle

de la composition et de l'activité des biofilms électro-microbiens dans laquelle on distingue 3 phases, matérialisées par les flèches numérotées de 1 à 3 sur les Figure 4.16C et Figure 4.16D :

- Une première phase (1) s'étalant du jour 77 à 130 (soit τ de 8,4 à 130 mPa) présente une évolution des biofilms selon l'axe CP2, et inversement corrélée à j_L . Cela traduit la diminution progressive de l'activité catalytique au cours du temps et l'absence de corrélation aux conditions hydrodynamique appliquées (caractérisées par la variable V_{rot}) ;
- Au cours de la deuxième phase (2), des jours 130 à 271 (soit τ compris entre 130 et 2 400 mPa), les individus se déplacent sensiblement selon l'axe CP1, exprimant une corrélation forte avec les variables Age et V_{rot} , traduisant un effet fort du temps et/ou de la contrainte de cisaillement sur les populations microbiennes.
- Une dernière phase (3) entre les jours 271 et 313, correspondant à l'application de la contrainte de cisaillement de 5 Pa induit une dernière évolution de la composition des biofilms selon les deux axes CP1 et CP2 et selon une corrélation positive entre j_L et les variables Age et V_{rot} . Les populations microbiennes développées et leur activité sont donc influencées fortement par la contrainte de cisaillement appliquée et ces évolutions s'accompagnent d'une meilleure catalyse microbienne sur les bio-électrodes.

Par ailleurs, les compositions de biofilms issus de l'analyse de l'ARNr (Figure 4.16D), et soumis à des contraintes de cisaillement comprises entre 1,2 et 5 Pa, sont marqués par une grande variabilité pour une même date de prélèvement indiquant un effet plus important du potentiel imposé sur l'activité des biofilms que sur la composition de la communauté.

4.4 DISCUSSIONS

4.4.1 Apport du réacteur de Couette-Taylor électrochimique et du contrôle de l'hydrodynamique à la répétabilité des bio-électrodes dans le cadre de suivi long-terme

Pour chaque condition opératoire, les analyses électrochimiques ont été réalisées systématiquement sur un jeu de trois électrodes (triplicas) afin de caractériser la reproductibilité des mesures. Celle-ci est évaluée pour chacun des groupes de triplicas à l'aide d'un coefficient de variation ($CVar[\%]$), donné par l'expression :

$$\sigma_i = \left[\frac{1}{k} \sum_{n=1}^k (j_n - \bar{j}_i)^2 \right]^{1/2} \quad (4.6)$$

$$CVar[\%] = \frac{100}{p} \sum_{i=1}^p \frac{1}{\bar{j}_i} \sigma_i \quad (4.7)$$

où i est l'instant de mesure, σ_i est l'écart type à l'instant i , k est le nombre de réplicas, j_n le courant mesuré pour le réplica k , \bar{j}_i le courant moyen sur les k réplicas à l'instant i et p la période considérée.

Ce coefficient de variation est calculé pour les résultats des densités de courant obtenues par chronoampérométrie (CA) mais également pour les valeurs des courants limites issus des voltammétries cycliques (CV). La Table 4-6 présente ces coefficients de variation pour chacun des groupes de triplicas correspondant à un potentiel imposé.

Table 4-6 : Valeurs de coefficients de variation (en %) associés aux densités de courants mesurées sur les chronoampérométrie (CA) et aux densités de courant limites observées sur les voltammétries cycliques (CV) pour chaque potentiel étudié.

Potentiel imposé (mV/ECS)	CA		CV	
	Jours 0 - 77	Jours 77 - 347	Jours 0 - 77	Jours 77 - 347
-300	7	25	4	12
-150	5	21	2	4
0	6	18	3	5
150	13	17	7	13
Moyenne	8	21	4	10

Pour les densités de courant issues des courbes d'électrolyse (CA), le coefficient de variation est donné sur l'ensemble des mesures (1 par minute) des jours 77 à 347 et comparé à ceux obtenus pour la phase initiale de formation du biofilm au cours des jours 0 à 77. Des jours 77 à 347, la valeur de $CVar$ varie de 17 à 25 % en fonction du potentiel, pour une valeur moyenne de 21%. Il a donc sensiblement augmenté par rapport à celui déterminé sur la période des jours 0 à 77 (7,7 %). De plus, ces augmentations de $CVar$ peuvent également être expliquées par les plus faibles valeurs de courants mesurés aux plus grandes contraintes de cisaillement en fin de l'expérimentation, et ce malgré des variations absolues entre les triplicas constantes. Peu d'études renseignent quantitativement les écarts relatifs obtenus lors des essais de chronoampérométrie à l'exception de Chang et al., (2022) qui indiquent des coefficients de variation de l'ordre de 38 à 148 % en fonction des potentiels appliqués lors d'une expérimentation de 67 jours réalisée en eau usée synthétique sans changement des conditions opératoires.

Concernant les densités de courant limites issues des voltammétries cycliques, le coefficient de variation varie de 4 à 13%, pour une moyenne de 10%. Une augmentation significative par rapport aux valeurs des jours 0 à 77 (moyenne de 4%) est encore une fois observée. Pour des voltammétries cycliques réalisées dans les mêmes gammes de potentiel (-335 à +165 mV/ECS) avec des biofilms âgés d'environ 13 jours, Molderez et al., (2021) rapportent des variations entre 4 et 12 % sur les valeurs de courant limite

observés sur 7 réplicas, soit dans les mêmes ordres de grandeurs que ceux observés dans le cadre de notre étude. A noter cependant que les électrodes utilisées étaient recouvertes d'un film d'or pour améliorer leur conductivité et plongées dans un milieu synthétique supplémenté en acétate (24 mM).

L'influence du potentiel sur la variabilité induite au niveau des triplicas peut aussi être analysée. Concernant les densités de courant issues des CA, les valeurs obtenues sont 25, 21, 18 et 17 %, pour les potentiels respectifs de -300, -150, 0 et 150 mV/ECS, indiquant qu'aucun effet significatif du potentiel ne peut être identifié au cours de la période des jours 77 à 347, contrairement à l'impact observé au cours de la période des jours 0 à 77. Une influence plus sensible du potentiel semble être observée sur les densités de courant limite issues de l'analyse des courbes de CV. En effet, ils sont respectivement de 12, 4, 5 et 13 % pour les potentiels de -300, -150, 0 et 150 mV/ECS, soit une variabilité plus faible pour les potentiels intermédiaires (-150 et 0 mV/ECS). Des tendances similaires étaient observées pour la période initiale des jours 0 à 77 (4, 2, 3 et 7 % pour les potentiels de -300, -150, 0 et 150 mV/ECS, respectivement).

Cette variabilité peut également être commentée au regard des évolutions observées entre les différentes phases, telles que décrites en partie 4.3.3.2.1. En effet, la variabilité inter-réplicas augmente pour les contraintes de cisaillement les plus élevées (τ de 2,4 et 5 Pa), pour lesquelles le détachement du biofilm semble le plus important (Table 4-4). Ces conditions sont donc susceptibles de générer ponctuellement des biofilms dont la structure est plus hétérogène, y compris au sein d'un même triplica.

Le système expérimental (eCTR) utilisé dans le cadre de cette étude pour le suivi long-terme de bioanodes permet d'obtenir des résultats très satisfaisants au regard des observations de la littérature concernant la reproductibilité des propriétés électrochimiques générées, en termes de densités de courant mesurées au cours du temps (*via* la réalisation de chronoampérométrie) et de comportement catalytique de l'électrode microbienne (analysé *via* la réalisation de voltammétrie cyclique). Ce résultat est d'autant plus remarquable au regard de la durée de l'expérimentation (347 jours) et l'alimentation en eau usée réelle utilisée dont les caractéristiques peuvent varier au cours d'une année d'expérimentation. La répétabilité des résultats est remarquable durant les deux premiers mois (jours 0 à 77). Ensuite, l'âge des biofilms semble être une cause de légère dispersion des résultats ainsi que l'application des fortes contraintes de cisaillement. Toutefois, même les triplicas de biofilms âgés de plusieurs mois soumis à des contraintes de cisaillement élevées gardent des répétabilités parmi les meilleures observées dans la littérature. Le contrôle et l'homogénéisation des écoulements appliqués sur les bio-électrodes semblent donc être un des facteurs prépondérants de la répétabilité des performances des systèmes bio-électrochimiques.

4.4.2 Différences observées entre les courbes d'électrolyse et de voltammétrie

L'analyse des coefficients de variation conduit à observer des comportements distincts entre les courbes de CA et courbes de CV. La Figure 4.17 représente les distributions des valeurs de densité de courant obtenues en CA (Figure 4.17A) et de densités de courant limite obtenues en CV (Figure 4.17B) sur la période de suivi des jour 77 à 347.

La comparaison des valeurs des densités de courant obtenues par chronoampérométrie (Figure 4.17A) indique un optimum pour le potentiel de -150 mV/ECS, avec une valeur médiane de $0,67 \text{ A.m}^{-2}$. Ces courants médians sont significativement supérieurs ($p - \text{value} < 0,018$) à ceux générés à -300 et 0 mV/ECS (respectivement $0,52$ et $0,47 \text{ A.m}^{-2}$), eux-mêmes significativement supérieurs ($p - \text{value} < 0,001$) aux courants obtenus par les électrodes polarisées à 150 mV/ECS (médiane à $0,31 \text{ A.m}^{-2}$). L'analyse des densités de courant limites déduites des CV (Figure 4.17B) donne une tendance différente avec des valeurs de courants limites diminuant suivant l'ordre croissant des potentiels d'électrolyse de -300, à 150 mV/ECS. Les électrodes laissées en circuit ouvert (notées OCP) donnent les densités de courant limite les plus faibles, proches de celles des électrodes polarisées à 150 mV/SCE, cependant, le faible nombre de points (9 triplicatas) utilisé dans chaque distribution ne permet pas de déterminer de différences significatives selon le test de Wilcoxon (à l'exception des densités de courants limites obtenues à -300 mV/ECS significativement supérieures aux densités de courants des électrodes à 150 mV/ECS et en OCP [$p - \text{value} < 0,05$]).

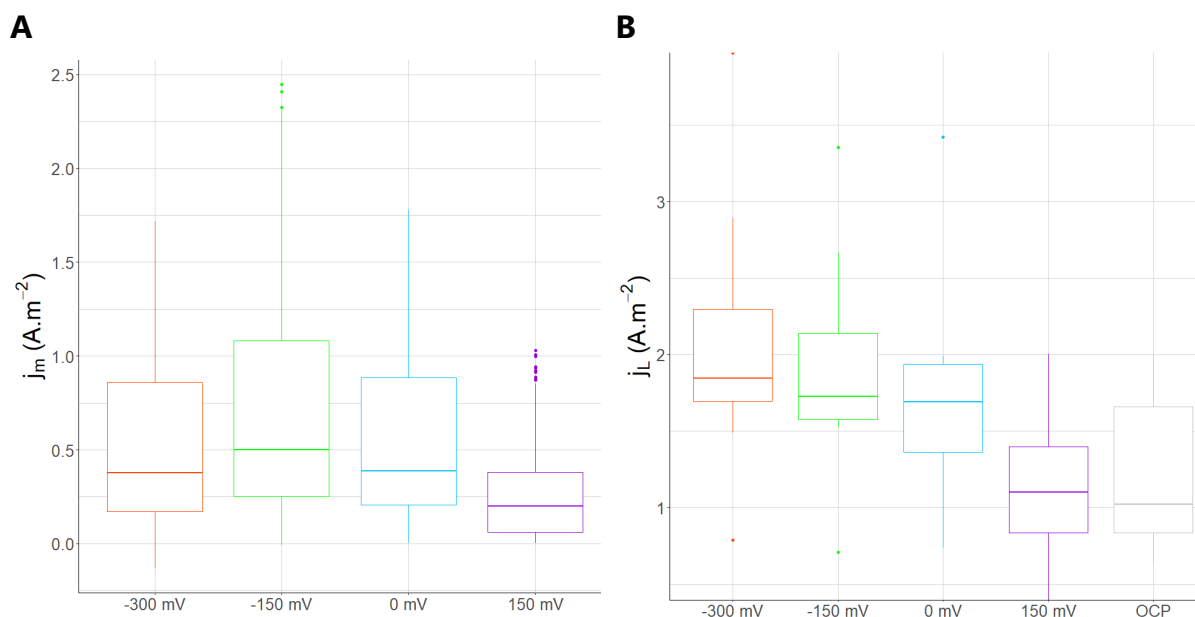


Figure 4.17 : Distribution des densités de courant associées à chaque potentiel d'électrolyse, des jours 77 à 347.

A) Densités de courant obtenues par chronoampérométrie et B) densités de courant limite obtenues sur les voltammétries cycliques. Les p-values obtenues par le test de Wilcoxon appliqué entre chaque distribution deux à deux sont reportées en Annexe 4D.

On retrouve ici, par l'analyse statistique, un comportement commenté dans le chapitre précédent (section 3.3.1.2). Les potentiels les plus bas sont les plus favorables à la formation de bioanodes efficaces, c'est-à-dire des bioanodes capables de produire des densités de courant limite élevées. C'est ce que montrent les CV. En revanche, les potentiels les plus bas sont trop bas pour atteindre le courant limite lors des électrolyses. En résumé, les électrolyses aux potentiels bas sont adéquates pour former les bioanodes les plus performantes mais elles ne permettent pas de les exploiter à leur maximum de performance.

Sur cette base, on pourrait envisager des stratégies opératoires consistant à former les bioanodes à un potentiel bas (-300 mV par exemple) et de les exploiter ensuite à un potentiel plus élevé (0 mV/SCE par exemple) leur permettant de délivrer le courant limite. Il faudrait sans doute alterner les deux potentiels avec une fréquence à déterminer afin que le potentiel d'électrolyse n'affecte pas trop les propriétés électrocatalytiques de la bioanode. Toutefois, dans le cas présent, le gain serait minime et un potentiel de l'ordre de -150 mV paraît être le bon compromis pour la formation d'électrodes efficaces et leur exploitation proche de leur maximum. Plusieurs travaux de la littérature ont montré des densités de courant maximales avec divers biofilms composés de *Geobacter* pour des valeurs basses de potentiel entre -300 et -150 mV/ECS (Chatterjee et al., 2019; Molderez et al., 2021; Torres et al., 2009). Notre étude pointe plutôt l'intérêt du potentiel de -150 mV/ECS pour la formation et le maintien

d'un biofilm efficace.

Afin de comparer de façon plus pertinente les résultats d'électrolyse et de voltammétrie, il faut extraire des courbes de CV les valeurs de densité de courant correspondant au potentiel appliqué durant l'électrolyse. Cette densité de courant est appelée « densité de courant attendue » par la suite et notée j_a . Ces densités de courant attendues sont calculées en prenant la moyenne des valeurs de densité de courant entre la courbe aller et la courbe retour des CV, à la valeur du potentiel d'électrolyse. Prendre la moyenne des courbes aller et retour permet d'éliminer le courant capacitif qui est un courant transitoire qui s'ajoute au courant faradique du fait de la variation continue du potentiel durant le tracé des CV. La Figure 4.18 présente les densités de courant attendues issues des CV (j_a) en fonction des densités de courant moyennes (j_m) issues des CA pour chaque palier de contrainte de cisaillement appliquées. Les densités de courant moyennes (j_m) sont calculées sur les dernières 24 heures qui précèdent le prélèvement des biofilms suivi du tracé des CV.

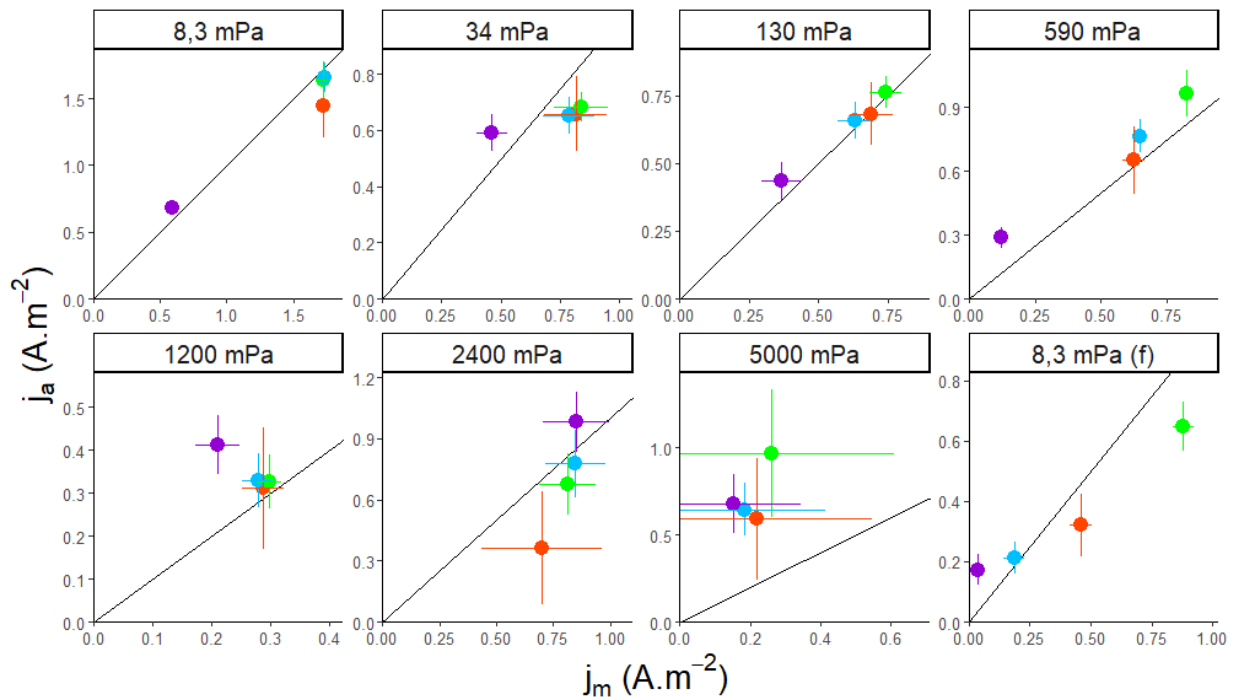


Figure 4.18 : Densités de courant attendues mesurées sur chaque voltammétrie au potentiel d'électrolyse en fonction des densités de courant moyennes mesurées par chronoampérométrie 24 heures avant le tracé des CV.

● : -300 mV/ECS, ● : -150 mV/ECS, ● : 0 mV/ECS, ● : 150 mV/ECS. Les barres d'erreur correspondent aux écart-type des moyennes de chaque triplica. La droite correspond à $j_L = j_m$.

On note une bonne correspondance des valeurs de j_a et j_m qui se situent toujours très proches de la bissectrice, c'est-à-dire proche de l'égalité, quel que soit le potentiel d'électrolyse et quel que soit la contrainte de cisaillement appliquée, sauf pour la plus forte de 5 Pa. Les voltammétries donnent donc une caractérisation des bioanodes

proche de l'état stationnaire atteint durant les électrolyses.

Il faut noter qu'une partie des biofilms est prélevée en fin d'électrolyse et que les CV sont tracées après le prélèvement. Le prélèvement implique d'ouvrir le réacteur et donc d'exposer la partie supérieure des électrodes à l'air, donc à l'oxygène et d'augmenter sans doute sa concentration dissoute. Les excellentes correspondances entre les valeurs de j_m (mesurées sur les électrolyses avant le prélèvement) et de j_a (mesurées sur les CV après le prélèvement) montre la robustesse des bioanodes qui ne sont pas perturbées par les conditions du prélèvement. En particulier, elles peuvent accepter une brève exposition à l'air.

Pour la plus forte des contraintes de cisaillement (5 Pa), toutes les valeurs de j_a sont nettement plus élevées que les valeurs de j_m issues de l'électrolyse. En fait, cet écart à l'égalité est dû à l'effondrement des valeurs durant l'électrolyse, alors que les valeurs de j_a restent du même ordre de grandeur que celles du palier précédent. Il est difficile d'expliquer ce phénomène, il serait toutefois nécessaire de reproduire l'expérience pour le confirmer avant d'engager des hypothèses explicatives combinant cinétique électrochimique, structure des biofilms et contraintes de cisaillement.

Au cours de ce travail, les biofilms électroactifs se développant sur des anodes polarisées à différents potentiels et soumis à des forces de cisaillement d'intensité croissante ont été suivi sur une durée de plus de 300 jours. Pour cela, après ouverture du réacteur et vidange d'une fraction de l'électrolyte afin de découvrir les premiers centimètres supérieurs des bioanodes en graphite, les biofilms présents sur la partie émergée ont été récoltés et soumis à une extraction d'acides nucléiques afin de récupérer et d'analyser en parallèle les communautés microbiennes par séquençage de ribotags obtenus à partir de l'ADN (structure de la communauté microbienne du biofilm s'étant développé entre deux prélèvements) et de l'ARN (groupes microbiens actifs au moment du prélèvement). Il est donc important de garder à l'esprit que les communautés présentes et actives analysées par séquençage de ribotags sont celles qui se sont développées sur la partie supérieure de la bioanode entre un prélèvement et le précédent. Ainsi, elles ne correspondent pas nécessairement à la composition et l'activité du biofilm présent sur l'ensemble de l'électrode.

4.4.2.1 Evolution temporelle de la composition de la communauté microbienne du biofilm électroactif

En ce qui concerne l'évolution de la structure taxonomique de la communauté, l'analyse qualitative de la Figure 4.15A montre une certaine similitude de structure entre deux points de temps successifs d'une même électrode. Par exemple, on peut noter que la structure des communautés microbiennes est relativement similaire entre les deux premiers points de prélèvement sur chaque électrode prise individuellement, pour tous les potentiels appliqués. En revanche, les compositions des biofilms entre différentes

électrodes polarisées pour une même date de prélèvement sont en général plus contrastées. Pourtant, les électrodes sont toutes au contact d'un seul électrolyte et donc d'une même biomasse microbienne planctonique. Cette observation suggère donc qu'un phénomène de sélection par les conditions spécifiques de polarisation sur chaque électrode et/ou un phénomène de dispersion de microorganismes provenant du biofilm déjà en place sur le reste de l'électrode jouent un rôle prépondérant dans la composition du biofilm se développant entre chaque prélèvement. Ainsi, jusqu'au jour 271, la structure taxonomique des biofilms développés sur chaque électrode montre une certaine résilience en dépit des prélèvements successifs.

Pour le jour 313 en revanche, la structure de la communauté microbienne du biofilm électroactif change de façon notable. De plus, il est surprenant de constater que les communautés s'étant développées au jour 313 sont très homologues d'une électrode à l'autre, au contraire des prélèvements précédents. Au jour 313, des contraintes de cisaillement importantes sont exercées (5 Pa). Selon toute vraisemblance, elles constituent la pression de sélection prépondérante qui détermine la composition de la communauté microbienne capable de constituer un biofilm dans ces conditions de cisaillement et de turbulence hydrodynamique, quelle que soit la condition de polarisation ou la composition du biofilm subsistant sur le reste de l'électrode. De plus, *Geobacter* et *Trichloromonas* sont très peu représentés dans ces conditions, ce qui suggère que ce niveau de contrainte de cisaillement est peu adapté au développement des biofilms électroactifs. Ces observations restent préliminaires et mériteraient d'être confirmées par des expérimentations dédiées. Elles ouvrent toutefois des pistes pour mieux gérer le développement des biofilms électroactifs à partir du contrôle des conditions hydrodynamiques.

4.4.2.2 Evolution temporelle de l'activité des populations constituant le biofilm électroactif

Bien que le suivi de l'activité des groupes microbiens par séquençage de ribotags issus d'extractions d'ARN ait été utilisé dans d'autres types d'écosystèmes tels que l'eau potable (Henne et al., 2012) ou des biofilms benthiques (Wilhelm et al., 2014), cette approche reste relativement nouvelle pour les biofilms électroactifs si bien que nous disposons de peu de recul pour l'interprétation de nos données. L'analyse dynamique de l'activité des groupes microbiens dans le biofilm électroactif (Figure 4.15B) évolue de manière nettement plus contrastée que la structure des communautés (Figure 4.15A). De manière assez attendue toutefois, les analyses révèlent une activité métabolique importante des populations du genre *Geobacter* jusqu'au jour 160 pour les potentiels de polarisation les plus bas (-300, -150 mV/ECS) et dans une moindre mesure pour le potentiel de 0 mV/ECS. Cette observation confirme que des polarisations à des potentiels plutôt bas et l'exposition à des contraintes de cisaillement faibles à modérées constituent des conditions favorables à l'activité du genre *Geobacter* et s'accompagnent de bons niveaux de catalyse électro-microbienne. En revanche, la proportion de séquences issues d'ARNr de populations affiliées à

Geobacter est aussi parfois nettement plus faible que sa proportion dans les séquences issues d'ADNr. C'est les cas, par exemple, aux jours 210 et 271 pour les électrodes polarisées à -300, -150 et 0 mV/ECS : alors que la proportion de *Geobacter* est toujours élevée dans les biofilms, leur activité est notablement plus faible. Cette observation confirme le fait que le suivi des populations de *Geobacter* à partir des ARN constitue un meilleur indicateur de l'électroactivité globale du biofilm que la simple présence de *Geobacter* car ces points de temps correspondent justement à des niveaux de catalyse électro-microbienne faibles (Figure 4.14 – jours 210 et 271).

Toutefois, les groupes microbiens actifs évoluent aussi de manière plus contrastée. Ainsi aux jours 116 et 130, sur toutes les électrodes, une fraction notable des groupes actifs sont affiliés aux genres *Desulfobacter* et *Desulfobulbus* alors que ces groupes sont relativement peu présents dans le biofilm. Au jour 160, l'activité de ces groupes diminue fortement en proportion, à l'exception du genre *Desulfobacter* sur les électrodes non-connectées. Ces évolutions plus rapides intervenant sur quasiment toutes les électrodes de façon parallèle, elles peuvent être liées à une combinaison de causes multiples comme une réponse à l'évolution des contraintes de cisaillement ou des variations de composition de l'influent. L'élucidation des causes précises de ces évolutions nécessiterait des expériences et/ou des analyses complémentaires.

4.5 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

La robustesse du réacteur pour l'étude de la formation et du développement de biofilms électroactifs sous hydrodynamique contrôlée a été éprouvée lors d'une étude long-terme de 347 jours en milieu réel. Les répliques de bioanodes ont indiqué une bonne fiabilité tout au long de la durée expérimentale, présentant des tendances significativement équivalentes pour un même potentiel imposé (à l'exception des électrodes polarisées à -300 mV/ECS pour des contraintes de cisaillement supérieures à 2,4 Pa).

Les potentiels d'électrodes sont déterminants dans les courants obtenus au cours du temps pour chaque électrode. Outre le fait que le potentiel de -300 mV/ECS donne le plus de variabilité entre les courants mesurés, il permet aussi d'atteindre les plus hauts courants limites au cours de l'expérimentation. Au contraire, les potentiels les plus élevés (0 et 150 mV/ECS) ont montré une bonne fiabilité au cours du temps entre les répliques mais de moins bonnes performances électrochimiques. Ainsi le potentiel intermédiaire étudié dans ce chapitre de -150 mV/ECS semble être le meilleur compromis entre l'obtention d'un biofilm stable au cours du temps face aux différentes conditions hydrodynamiques et un biofilm donnant de bonnes performances catalytiques au cours du temps avec les meilleurs courants mesurés.

L'effet de l'augmentation de la contrainte hydrodynamique sur les propriétés des biofilms a été étudié spécifiquement dans ce chapitre. Des phénomènes de

détachement de biofilms ont pu être observés qualitativement, mais leur caractérisation et leur quantification aurait pu permettre de mieux comprendre l'effet du potentiel imposé et l'évolution temporelle de ces mécanismes et ainsi analyser l'impact de l'hydrodynamique sur la structure des biofilms électroactifs.

Pour autant, ces modifications n'ont pas entraîné de changements dans l'évolution générale des courants des électrodes. En effet, les courants mesurés ont montré une tendance décroissante au cours du temps quelle que soit la contrainte hydrodynamique appliquée. Par opposition à cette décroissance, une bonne stabilité dans la composition des biofilms électroactifs développés a aussi été montrée entre chaque point de prélèvement de biofilms, jusqu'à des contraintes élevées (>5 Pa) qui ont engendrées des modifications importantes des compositions microbiennes.

L'évolution des populations de *Geobacter* et principalement de leur activité a été montrée comme indicatrice de ces phénomènes de diminution de courants générés. L'analyse couplée des populations microbiennes et de leur activité a permis de révéler des espèces peu présentes mais particulièrement actives comme *Desulfobacter* et *Desulfobulbus* au cours des jours 77 à 130. Ces groupes bactériens mettent en évidence des interactions entre les différentes espèces au sein des biofilms électroactifs ainsi que des chaînes trophiques complexes (carbone et soufre mais d'autres éléments sont possiblement non-identifiés). Ces espèces semblent agir en coopération avec *Geobacter* qui fournit les électrons nécessaires à leur métabolisme, mais traduisent des courants plus faibles mesurés au niveau de l'électrode. Ces interactions positives entre microorganismes pourraient permettre d'expliquer les fortes valeurs d'abattement de matière organique. En comparaison des compétitions avec *Geobacter* semblent aussi être révélées, notamment avec *Trichloromonas*. En effet, l'augmentation des proportions de *Trichloromonas* au cours du temps semble conjointe à la diminution des populations de *Geobacter*. Ces deux groupes pourraient en effet coloniser la même niche écologique et être en compétition pour le substrat carboné. Le potentiel imposé semble influencer la balance entre ces deux espèces et pourrait être un levier pour contrôler le développement de populations compétitrices des microorganismes électroactifs. Des caractérisations de biofilm à des pas de temps plus faibles (à chaque semaine de développement par séquençage et/ou par observation microscopique) pourraient alors apporter des éléments de compréhension des mécanismes en œuvre au sein du biofilms pouvant générer cette décroissance afin de mesurer l'effet court-terme des modifications des conditions hydrodynamiques. Finalement, l'expérimentation étant réalisée dans des conditions de substrat se voulant en excès, des expérimentations en milieu réel non-supplémenté pourraient donner des tendances différentes à investiguer.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'hydrodynamique est un facteur clé de contrôle de l'activité des biofilms, comme en témoigne la vaste littérature sur le sujet, mais dont le rôle a peu été étudié dans le contexte des biofilms électroactifs. Ces travaux de thèse visent à combler ce manque de connaissances, d'une part, en proposant un dispositif expérimental adapté à l'étude du couplage hydrodynamique-bio-électrochimie, d'autre part en documentant l'effet des conditions hydrodynamiques sur la composition et l'activité de biofilms électroactifs depuis leur développement initial jusqu'à leur maturation.

Le travail s'est concentré sur des biofilms anodiques appliqués au traitement de la matière organique contenue dans des eaux usées urbaines, et a nécessité la mise en œuvre d'une approche expérimentale couplant les outils du génie des procédés avec des techniques électrochimiques et de biologie moléculaire.

CONCLUSIONS

Les premiers travaux de la thèse ont été dédiés à lever un verrou technologique en développant le premier réacteur de Couette-Taylor électrochimique (eCTR). Ce réacteur a été conçu afin de permettre le développement et l'étude de biofilms électroactifs sur un ensemble de 20 électrodes de grandes surfaces (18 cm^2) en conditions hydrodynamiques contrôlées. Cette conception permet de proposer un réacteur d'étude répondant aux limitations actuelles rencontrées par les systèmes expérimentaux de la littérature (homogénéité des contraintes hydrodynamiques appliquées à la surface des électrodes, grande surface d'électrodes permettant de limiter l'effet d'hétérogénéité spatiale des biofilms, volume suffisant de biofilm pour permettre un prélèvement représentatif pour leur caractérisation).

Préalablement aux expérimentations biotiques, l'influence de l'écoulement sur les paramètres électrochimiques a été caractérisée en conditions abiotiques en utilisant un couple redox modèle. L'épaisseur de la couche limite de diffusion à la surface du cylindre interne a été estimée et une relation adimensionnelle entre le nombre de Taylor et le nombre de Sherwood est proposée. Le dispositif expérimental (eCTR) donne des résultats qui correspondent aux résultats expérimentaux et théoriques rapportés dans la littérature pour des régimes d'écoulement similaires. Cette étude préliminaire constitue une validation du système expérimental proposé sur un modèle abiotique. En outre, elle enrichit la bibliographie en caractérisant les régimes de vortex ondulés, qui sont clairement distincts des écoulements en vortex turbulents quant à leur influence sur les réactions électrochimiques.

Les expérimentations en conditions biotiques se sont déroulées sur une durée d'un an (347 jours). L'alimentation des biofilms avec des eaux usées supplémentées en acétate a permis l'obtention d'un biofilm mixte dont la composition et les performances ont évolué au cours du temps et sous la pression de sélection du potentiel électrique imposé ainsi que des conditions hydrodynamiques.

Des résultats très satisfaisants concernant la reproductibilité des réponses électrochimiques ont été obtenus. La répétabilité est remarquable durant les deux premiers mois, avec une variation entre répliques d'environ 6 % pour les densités de courant obtenues par chronoampérométrie et les densités de courant limites issues des voltammétries cycliques. L'âge des biofilms ainsi que les fortes contraintes de cisaillement appliquées lors de la seconde phase d'opération du eCTR (jours 77 à 347) semblent avoir causé une légère dispersion des résultats (14 % de variabilité) qui reste, toutefois, parmi les plus faibles observées dans la littérature pour des biofilms mixtes en réacteurs alimentés en eaux usées réelles.

Le contrôle et l'homogénéisation des écoulements appliqués sur les bio-électrodes semblent donc être un des facteurs prépondérants de la répétabilité des performances des technologies électro-microbiennes. Le dispositif expérimental (eCTR) permet ainsi d'obtenir des données robustes qui serviront à l'extrapolation des résultats de recherche en vue d'une montée d'échelle des technologies électro-microbiennes.

L'application de potentiels aux électrodes (respectivement de -300, -150, 0 et 150 mV/ECS) sur l'ensemble de la période de suivi a mis en évidence que les potentiels les plus bas sont les plus favorables à la formation de bioanodes efficaces, bien qu'ils ne permettent pas d'exploiter ces dernières au maximum de leur performance catalytique. Ces observations sont confortées par l'analyse des communautés microbiennes des biofilms mettant en évidence un phénomène de sélection par les conditions de polarisation sur chacune des électrodes (éventuellement couplé à un phénomène de dispersion des microorganismes provenant des biofilms déjà en place).

La chute d'activité électrochimique observée au cours du temps se matérialise par des courants plus faibles alors que l'oxydation de la matière organique reste relativement stable et génère donc la même quantité d'électrons. L'hypothèse d'une compétition pour les électrons entre l'électrode et certaines espèces microbiennes sulfato-réductrices et méthanogènes est avancée. Le développement et l'activité de ces espèces sont favorisés par les potentiels élevés et les contraintes de cisaillement faibles. Nos données d'évolution de composition des communautés microbiennes constituant le biofilm électroactif suggèrent que *Geobacter* et *Trichloromonas* pourraient être en compétition pour la même niche écologique. En effet, l'activité de cette dernière augmente au cours du temps, à l'inverse de celle de *Geobacter*, ce qui semble conduire à la génération de courants plus faibles.

Les augmentations successives des contraintes de cisaillement n'ont pas montré d'effet significatif sur l'évolution des courants générés. Toutefois, on observe une augmentation des courants limites pour les contraintes de cisaillement élevées de 2,4 et 5 Pa, signifiant un impact sensible sur les biofilms électroactifs matures. Le passage en régime turbulent et l'application de la contrainte de cisaillement maximale de 5 Pa modifient sensiblement la composition des biofilms, qui devient alors plus proche de

celle d'un biofilm jeune, mais sans augmentation significative des courants générés.

PERSPECTIVES

Ce travail conduit à de nouveaux questionnements scientifiques et à des perspectives pour approfondir l'interprétation de certaines observations expérimentales de la thèse ainsi que la compréhension du rôle de l'hydrodynamique.

Tout d'abord, sur le plan méthodologique :

Des améliorations ont été proposées puis apportées au réacteur de Couette-Taylor électrochimique pour permettre une analyse structurale *ex situ* des biofilms. En effet, parmi les objectifs initiaux de la thèse, des électrodes amovibles avaient été envisagées mais elles n'ont pu être mises en place à cause de problèmes d'étanchéité au niveau des connexions électriques. Une solution a été apportée à ce problème, qui a permis de développer une seconde version du réacteur qui comporte des électrodes amovibles. Toutefois, ce dispositif n'a pas été utilisé par manque de temps.

La connaissance des propriétés structurales telles que de l'épaisseur du biofilm et sa densité permettrait de comprendre comment l'hydrodynamique peut influencer le détachement et la structure des biofilms. Nous pourrions également caractériser le régime de croissance des biofilms et déterminer s'il est limité par le transfert de matière ou par la croissance des espèces microbiennes.

Il serait opportun de récolter l'effluent de sortie du réacteur afin de pouvoir retenir suffisamment de volume pour effectuer un bilan de matière sur les particules détachées et les analyser. La distribution de taille des particules détachées et leur composition (notamment microbienne) fourniraient des éléments clé pour interpréter l'effet du détachement.

Enfin, nous avons constaté à plusieurs reprises une baisse de l'activité électrochimique suite à des alimentations très concentrées en DCO soluble. La cause de ces baisses d'activité n'a pu être clairement déterminée et il subsiste un doute sur un effet indirect du pH. L'ajout d'une solution tampon pH à l'alimentation permettrait certainement de réduire les variations de pH dans le réacteur. De même, une analyse plus poussée des paramètres physico-chimiques et de la composition microbienne des eaux usées est recommandée.

Pour conforter nos résultats et approfondir certaines hypothèses :

Les augmentations successives des contraintes cisaillement n'ont pas permis de recouvrer le courant élevé qui avait été observé sur des biofilms jeunes. Ce résultat

soulève la question de l'adaptation progressive des biofilms aux contraintes de cisaillement croissantes. En effet, l'histoire du biofilm conditionne son comportement suite à une modification des conditions de culture. Dans le cas de notre étude, une densification progressive du biofilm est suspectée. Pour s'affranchir de cet effet « mémoire », il peut être envisagé de cultiver des biofilms dans le réacteur de Couette-Taylor électrochimique puis de transférer les différentes bioanodes dans des cellules de détachement identiques mais opérées avec différentes conditions hydrodynamiques.

L'effet « mémoire » peut également être discuté au regard de la durée du changement appliqué. On peut s'attendre à un comportement différent des biofilms lorsqu'ils sont soumis à un changement de l'hydrodynamique sur un temps suffisamment court pour ne pas permettre l'adaptation de leur structure et de leur composition, en comparaison des temps longs appliqués dans le cadre de notre étude. Il serait donc intéressant de tester l'effet d'échelons répétés de contraintes de cisaillement dont la durée et l'intensité pourraient être optimisées en vue de piloter l'activité des biofilms électroactifs.

L'hypothèse que la diminution du courant transféré au circuit électrique pourrait être liée au développement progressif d'un transfert direct inter-espèces entre les populations électroactives (principalement *Geobacter*) et les populations sulfato-réductrices et/ou méthanogènes, est une piste de recherche particulièrement intéressante pointée par notre travail. Afin de mieux documenter cette possibilité, l'analyse de la distribution spatiale des bactéries électroactives à l'aide de sondes nucléiques spécifiques ciblant l'ARNr 16S (technique FISH : « Fluorescent *in situ* Hybridization ») permettrait d'observer plus particulièrement la localisation des espèces électroactives au sein du biofilm et d'apporter des éléments complémentaires sur les causes qui conduisent à la diminution de l'électroactivité au fur et à mesure du vieillissement du biofilm. Il pourrait être par exemple envisagé d'analyser, à l'aide de techniques d'analyse d'image, la co-localisation entre *Geobacter* et les populations microbiennes sulfato-réductrices ou méthanogènes suspectées de développer des interactions de type transfert inter-espèces d'électrons. L'observation d'une co-localisation accrue de ces groupes microbiens au cours de la maturation et du vieillissement du biofilm pourrait en effet être un élément qui renforcerait l'hypothèse du développement d'un transfert direct inter-espèces d'électrons. Pour étayer cette hypothèse, il serait également possible de réaliser des analyses en métagénomique et métatranscriptomique shotgun afin de documenter les profils d'expression de gènes chez les principales populations constituant le biofilm électroactif. Ces analyses avaient en effet initialement été envisagées. Nous n'avons toutefois pas pu les mener par manque de temps. La mise en œuvre de ces analyses et l'interprétation des données constituent un travail en soi, qui pourrait être permis dans le futur, en utilisant les acides nucléiques (ADN et ARN) déjà extraits au cours de ce travail de thèse. En complément, une caractérisation et quantification des gaz produits dans le réacteur pour de futures

expérimentations pourrait permettre d'établir un bilan plus précis des différentes réactions ayant lieu dans le réacteur. Elle pourrait aussi identifier l'apparition de certains composés (CH_4 et H_2S notamment) afin de confirmer l'activité hypothétique de ces différents groupes microbiens.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adesokan, B.J., Quan, X., Evgrafov, A., Heiskanen, A., Boisen, A., Sørensen, M.P., 2016. Experimentation and numerical modeling of cyclic voltammetry for electrochemical micro-sized sensors under the influence of electrolyte flow. *J. Electroanal. Chem.* 763, 141–148. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2015.12.029>
- Ahmad, M., Ahmed, M., 2023. Characterization and applications of ion-exchange membranes and selective ion transport through them: a review. *J. Appl. Electrochem.* <https://doi.org/10.1007/s10800-023-01882-3>
- Ajayi, F.F., Kim, K.-Y., Chae, K.-J., Choi, M.-J., Kim, I.S., 2010. Effect of hydrodynamic force and prolonged oxygen exposure on the performance of anodic biofilm in microbial electrolysis cells. *Int. J. Hydrog. Energy* 35, 3206–3213. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.01.057>
- Al-Mamun, A., Ahmad, W., Baawain, M.S., Khadem, M., Dhar, B.R., 2018. A review of microbial desalination cell technology: Configurations, optimization and applications. *J. Clean. Prod.* 183, 458–480. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.02.054>
- Amirdehi, M.A., Gong, L., Khodaparastasarabad, N., Sonawane, J.M., Logan, B.E., Greener, J., 2022. Hydrodynamic interventions and measurement protocols to quantify and mitigate power overshoot in microbial fuel cells using microfluidics. *Electrochimica Acta* 405, 139771. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2021.139771>
- Arsène-Ploetze, F., Koechler, S., Marchal, M., Coppée, J.-Y., Chandler, M., Bonnefoy, V., Brochier-Armanet, C., Barakat, M., Barbe, V., Battaglia-Brunet, F., Bruneel, O., Bryan, C.G., Cleiss-Arnold, J., Cruveiller, S., Erhardt, M., Heinrich-Salmeron, A., Hommais, F., Joulian, C., Krin, E., Lieutaud, A., Lièremont, D., Michel, C., Muller, D., Ortet, P., Proux, C., Siguier, P., Roche, D., Rouy, Z., Salvagnol, G., Slyemi, D., Talla, E., Weiss, S., Weissenbach, J., Médigue, C., Bertin, P.N., 2010. Structure, Function, and Evolution of the *Thiomonas* spp. Genome. *PLoS Genet.* 6, e1000859. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000859>
- Asensio, Y., Mansilla, E., Fernandez-Marchante, C.M., Lobato, J., Cañizares, P., Rodrigo, M.A., 2017. Towards the scale-up of bioelectrogenic technology: stacking microbial fuel cells to produce larger amounts of electricity. *J. Appl. Electrochem.* 47, 1115–1125. <https://doi.org/10.1007/s10800-017-1101-2>
- Babanova, S., Jones, J., Phadke, S., Lu, M., Angulo, C., Garcia, J., Carpenter, K., Cortese, R., Chen, S., Phan, T., Bretschger, O., 2020. Continuous flow, large-scale, microbial fuel cell system for the sustained treatment of swine waste. *Water Environ. Res.* 92, 60–72. <https://doi.org/10.1002/wer.1183>
- Babauta, J., Renslow, R., Lewandowski, Z., Beyenal, H., 2012. Electrochemically active biofilms: facts and fiction. A review. *Biofouling* 28, 789–812. <https://doi.org/10.1080/08927014.2012.710324>
- Bagot'skiĭ, V.S., 2006. Fundamentals of electrochemistry, 2nd ed. ed, The Electrochemical Society series. Wiley-Interscience, Hoboken, N.J.
- Bard, A.J., Faulkner, L.R., 2000. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*. Wiley.
- Bard, A.J., Faulkner, L.R., White, H.S., 2022. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*. John Wiley & Sons.
- Bazant, M.Z., Thornton, K., Ajdari, A., 2004. Diffuse-charge dynamics in electrochemical systems. *Phys. Rev. E* 70, 021506. <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.70.021506>

- Beloin, C., Houry, A., Froment, M., Ghigo, J.-M., Henry, N., 2008. A Short-Time Scale Colloidal System Reveals Early Bacterial Adhesion Dynamics. *PLoS Biol.* 6, e167. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060167>
- Berne, C., Ellison, C.K., Ducret, A., Brun, Y.V., 2018. Bacterial adhesion at the single-cell level. *Nat. Rev. Microbiol.* 16, 616–627. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0057-5>
- Berrich, E., Aloui, F., Legrand, J., 2016. Experimental Investigations of Couette-Taylor-Poiseuille Flows Using the Electro-Diffusional Technique, in: Volume 1A, Symposia: Turbomachinery Flow Simulation and Optimization; Applications in CFD; Bio-Inspired and Bio-Medical Fluid Mechanics; CFD Verification and Validation; Development and Applications of Immersed Boundary Methods; DNS, LES and Hybrid RANS/LES Methods; Fluid Machinery; Fluid-Structure Interaction and Flow-Induced Noise in Industrial Applications; Flow Applications in Aerospace; Active Fluid Dynamics and Flow Control — Theory, Experiments and Implementation. Presented at the ASME 2016 Fluids Engineering Division Summer Meeting collocated with the ASME 2016 Heat Transfer Summer Conference and the ASME 2016 14th International Conference on Nanochannels, Microchannels, and Minichannels, American Society of Mechanical Engineers, Washington, DC, USA, p. V01AT13A013. <https://doi.org/10.1115/FEDSM2016-7918>
- Bian, B., Bajracharya, S., Xu, J., Pant, D., Saikaly, P.E., 2020. Microbial electrosynthesis from CO₂: Challenges, opportunities and perspectives in the context of circular bioeconomy. *Bioresour. Technol.* 302, 122863. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122863>
- Bird, R.B., Stewart, W.E., Lightfoot, E.N., 2006. *Transport Phenomena*, Revised 2nd Edition, 2nd edition. ed. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Böl, M., Möhle, R.B., Haesner, M., Neu, T.R., Horn, H., Krull, R., 2009. 3D finite element model of biofilm detachment using real biofilm structures from CLSM data. *Biotechnol. Bioeng.* 103, 177–186. <https://doi.org/10.1002/bit.22235>
- Bond, D.R., Lovley, D.R., 2005. Evidence for Involvement of an Electron Shuttle in Electricity Generation by *Geothrix fermentans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 2186–2189. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.4.2186-2189.2005>
- Borole, A.P., Reguera, G., Ringeisen, B., Wang, Z.-W., Feng, Y., Kim, B.H., 2011. Electroactive biofilms: Current status and future research needs. *Energy Environ. Sci.* 4, 4813–4834. <https://doi.org/10.1039/C1EE02511B>
- Bridier, A., Desmond-Le Quemener, E., Bureau, C., Champigneux, P., Renvoise, L., Audic, J.-M., Blanchet, E., Bergel, A., Bouchez, T., 2015. Successive bioanode regenerations to maintain efficient current production from biowaste. *Bioelectrochemistry*, Special Issue on “Biological fuel cells” 106, 133–140. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2015.05.007>
- Burton, S.D., Morita, R.Y., 1964. EFFECT OF CATALASE AND CULTURAL CONDITIONS ON GROWTH OF BEGGIATOIA, 12. *J. Bacteriol.* 88, 1755–1761.
- Byung-Hong, K., Hyung-Joo, K., Moon-Sik, H., Doo-Hyun, P., 1999. Direct Electrode Reaction of Fe(III)-Reducing Bacterium, *Shewanella putrefaciens*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 9, 127–131.
- Call, D.F., Logan, B.E., 2011. Lactate Oxidation Coupled to Iron or Electrode Reduction by *Geobacter sulfurreducens* PCA ∇ . *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 8791–8794. <https://doi.org/10.1128/AEM.06434-11>
- Cao, Y., Mu, H., Liu, W., Zhang, R., Guo, J., Xian, M., Liu, H., 2019. Electricigens in the anode of microbial fuel cells: pure cultures versus mixed communities. *Microb. Cell Factories* 18, 39. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1087-z>

- Carmona-Martínez, A.A., Pierra, M., Trably, E., Bernet, N., 2013. High current density via direct electron transfer by the halophilic anode respiring bacterium *Geoalkalibacter subterraneus*. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 15, 19699–19707. <https://doi.org/10.1039/C3CP54045F>
- Chae, K.-J., Choi, M.-J., Lee, J.-W., Kim, K.-Y., Kim, I.S., 2009. Effect of different substrates on the performance, bacterial diversity, and bacterial viability in microbial fuel cells. *Bioresour. Technol.* 100, 3518–3525. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.02.065>
- Chang, C.-C., Chen, Y.-C., Yu, C.-P., 2022. Microbial community dynamics in electroactive biofilms across time under different applied anode potentials. *Sustain. Environ. Res.* 32, 19. <https://doi.org/10.1186/s42834-022-00128-9>
- Chatterjee, P., Dessì, P., Kokko, M., Lakaniemi, A.-M., Lens, P., 2019. Selective enrichment of biocatalysts for bioelectrochemical systems: A critical review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 109, 10–23. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.04.012>
- Cheng, X.-L., Xu, Q., Sun, J.-D., Li, C.-R., Yang, Q.-W., Li, B., Zhang, X.-Y., Zhou, J., Yong, X.-Y., 2022. Quorum sensing signals improve the power performance and chlortetracycline degradation efficiency of mixed-culture electroactive biofilms. *iScience* 25, 104299. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.104299>
- Choi, O., Sang, B.-I., 2016. Extracellular electron transfer from cathode to microbes: application for biofuel production. *Biotechnol. Biofuels* 9, 11. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0426-0>
- Colli, A.N., Bisang, J.M., 2019. Time-dependent mass-transfer behaviour under laminar and turbulent flow conditions in rotating electrodes: A CFD study with analytical and experimental validation. *Int. J. Heat Mass Transf.* 137, 835–846. <https://doi.org/10.1016/j.ijheatmasstransfer.2019.03.152>
- Connors, E.M., Rengasamy, K., Bose, A., 2022. Electroactive biofilms: how microbial electron transfer enables bioelectrochemical applications. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 49, kuac012. <https://doi.org/10.1093/jimb/kuac012>
- Costa, N.L., Hermann, B., Fourmond, V., Faustino, M.M., Teixeira, M., Einsle, O., Paquete, C.M., Louro, R.O., 2019. How Thermophilic Gram-Positive Organisms Perform Extracellular Electron Transfer: Characterization of the Cell Surface Terminal Reductase OcwA. *mBio* 10, e01210-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.01210-19>
- Costerton, J.W., 1999. Introduction to biofilm. *Int. J. Antimicrob. Agents* 11, 217–221. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(99\)00018-7](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(99)00018-7)
- Costerton, J.W., Lewandowski, Z., DeBeer, D., Caldwell, D., Korber, D., James, G., 1994. Biofilms, the customized microniche. *J. Bacteriol.* 176, 2137–2142. <https://doi.org/10.1128/jb.176.8.2137-2142.1994>
- Coufort - Saudejaud, C., Derlon, N., Ochoa-Chaves, J., Line, A., Etienne, P., 2007. Cohesion and detachment in biofilm systems for different electron acceptor and donors. *Water Sci. Technol. J. Int. Assoc. Water Pollut. Res.* 55, 421–8. <https://doi.org/10.2166/wst.2007.286>
- Coufort, C., 2004. Etude expérimentale de la floculation en réacteur de Taylor-Couette : influence de l'hydrodynamique sur les phénomènes d'agrégation et de rupture (thesis). Toulouse, INSA.
- Coursolle, D., Baron, D.B., Bond, D.R., Gralnick, J.A., 2010. The Mtr Respiratory Pathway Is Essential for Reducing Flavins and Electrodes in *Shewanella oneidensis*. *J. Bacteriol.* 192, 467–474. <https://doi.org/10.1128/JB.00925-09>
- Dau, H., Limberg, C., Reier, T., Risch, M., Roggan, S., Strasser, P., 2010. The Mechanism of Water Oxidation: From Electrolysis via Homogeneous to Biological Catalysis. *ChemCatChem* 2, 724–761. <https://doi.org/10.1002/cctc.201000126>

- de Fouchécour, F., Larzillière, V., Bouchez, T., Moscoviz, R., 2022. Systematic and quantitative analysis of two decades of anodic wastewater treatment in bioelectrochemical reactors. *Water Res.* 214, 118142. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2022.118142>
- Dennis, P.G., Viridis, B., Vanwonterghem, I., Hassan, A., Hugenholtz, P., Tyson, G.W., Rabaey, K., 2016. Anode potential influences the structure and function of anodic electrode and electrolyte-associated microbiomes. *Sci. Rep.* 6, 39114. <https://doi.org/10.1038/srep39114>
- Derlon, N., Massé, A., Escudié, R., Bernet, N., Paul, E., 2008. Stratification in the cohesion of biofilms grown under various environmental conditions. *Water Res.* 42, 2102–2110. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.11.016>
- Dessi, P., Rovira-Alsina, L., Sanchez, C., Dinesh, G.K., Tong, W., Chatterjee, P., Tedesco, M., Farras, P., Hamelers, H.M.V., Puig, S., 2021. Microbial electrosynthesis: Towards sustainable biorefineries for production of green chemicals from CO₂ emissions. *Biotechnol. Adv.* 46, 107675. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107675>
- Dexter, S.C., Lin, S.H., 1992. Calculation of Seawater pH at Polarized Metal Surfaces in the Presence of Surface Films. *Corrosion* 48, 50–60. <https://doi.org/10.5006/1.3315918>
- Donlan, R.M., 2002. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerg. Infect. Dis.* 8, 881–890. <https://doi.org/10.3201/eid0809.020063>
- Eisenberg, M., Tobias, C.W., Wilke, C.R., 1954. Ionic Mass Transfer and Concentration Polarization at Rotating Electrodes. *J. Electrochem. Soc.* 101, 306. <https://doi.org/10.1149/1.2781252>
- Escudié, R., Cresson, R., Delgenès, J.-P., Bernet, N., 2011. Control of start-up and operation of anaerobic biofilm reactors: An overview of 15 years of research. *Water Res.* 45, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.07.081>
- Esser, A., Grossmann, S., 1996. Analytic expression for Taylor–Couette stability boundary. *Phys. Fluids* 8, 1814–1819. <https://doi.org/10.1063/1.868963>
- Fedorovich, V., Knighton, M.C., Pagaling, E., Ward, F.B., Free, A., Goryanin, I., 2009. Novel electrochemically active bacterium phylogenetically related to *Arcobacter butzleri*, isolated from a microbial fuel cell. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 7326–7334. <https://doi.org/10.1128/AEM.01345-09>
- Fisher, J.C., Levican, A., Figueras, M.J., McLellan, S.L., 2014. Population dynamics and ecology of *Arcobacter* in sewage. *Front. Microbiol.* 5.
- Flayac, J.-C., Trably, E., Bernet, N., 2018. Microbial Ecology of Anodic Biofilms: From Species Selection to Microbial Interactions 506 p. https://doi.org/10.1007/978-3-319-66793-5_4
- Flemming, H.-C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S., Kjelleberg, S., 2016. Biofilms: An emergent form of bacterial life. *Nat. Rev. Microbiol.* 14, 563–575. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94>
- Fricke, K., Harnisch, F., Schröder, U., 2008. On the use of cyclic voltammetry for the study of anodic electron transfer in microbial fuel cells. *Energy Environ. Sci.* 1, 144–147. <https://doi.org/10.1039/B802363H>
- Gabe, D., Robinson, D., 1972a. Mass-Transfer in a Rotating Cylinder Cell .1. Laminar-Flow. *Electrochimica Acta* 17, 1121-. [https://doi.org/10.1016/0013-4686\(72\)90028-X](https://doi.org/10.1016/0013-4686(72)90028-X)
- Gabe, D., Robinson, D., 1972b. Mass-Transfer in a Rotating Cylinder Cell .2. Turbulent-Flow. *Electrochimica Acta* 17, 1129-. [https://doi.org/10.1016/0013-4686\(72\)90029-1](https://doi.org/10.1016/0013-4686(72)90029-1)

- Gabe, D.R., Wilcox, G.D., Gonzalez-Garcia, J., Walsh, F.C., 1998. The rotating cylinder electrode: its continued development and application. *J. Appl. Electrochem.* 28, 759–780. <https://doi.org/10.1023/A:1003464415930>
- Goeres, D.M., Hamilton, M.A., Beck, N.A., Buckingham-Meyer, K., Hilyard, J.D., Loetterle, L.R., Lorenz, L.A., Walker, D.K., Stewart, P.S., 2009. A method for growing a biofilm under low shear at the air–liquid interface using the drip flow biofilm reactor. *Nat. Protoc.* 4, 783–788. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.59>
- Gomes, I.B., Simões, M., Simões, L.C., 2014. An overview on the reactors to study drinking water biofilms. *Water Res.* 62, 63–87. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.05.039>
- Gong, L., Amirdehi, M.A., Sonawane, J.M., Jia, N., de Oliveira, L.T., Greener, J., 2022. Mainstreaming microfluidic microbial fuel cells: a biocompatible membrane grown in situ improves performance and versatility. *Lab. Chip* 22, 1905–1916. <https://doi.org/10.1039/d2lc00098a>
- Guo, K., PrévotEAU, A., Patil, S.A., Rabaey, K., 2017. Materials and Their Surface Modification for Use as Anode in Microbial Bioelectrochemical Systems, in: *Functional Electrodes for Enzymatic and Microbial Electrochemical Systems*. WORLD SCIENTIFIC (EUROPE), pp. 403–427. https://doi.org/10.1142/9781786343543_0011
- Gupta, P., Sarkar, S., Das, B., Bhattacharjee, S., Tribedi, P., 2016. Biofilm, pathogenesis and prevention—a journey to break the wall: a review. *Arch. Microbiol.* 198, 1–15. <https://doi.org/10.1007/s00203-015-1148-6>
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W., Stoodley, P., 2004. Bacterial biofilms: from the Natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 95–108. <https://doi.org/10.1038/nrmicro821>
- Hamelers, H.V.M., ter Heijne, A., Stein, N., Rozendal, R.A., Buisman, C.J.N., 2011. Butler–Volmer–Monod model for describing bio-anode polarization curves. *Bioresour. Technol., Special Issue: Biofuels - II: Algal Biofuels and Microbial Fuel Cells* 102, 381–387. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.156>
- Heard, D.M., Lennox, A.J.J., 2020. Electrode Materials in Modern Organic Electrochemistry. *Angew. Chem. Int. Ed.* 59, 18866–18884. <https://doi.org/10.1002/anie.202005745>
- Henne, K., Kahlisch, L., Brettar, I., Höfle, M.G., 2012. Analysis of Structure and Composition of Bacterial Core Communities in Mature Drinking Water Biofilms and Bulk Water of a Citywide Network in Germany. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 3530–3538. <https://doi.org/10.1128/AEM.06373-11>
- Henze, M., 1995. The activated sludge model No. 2: biological phosphorus removal. *Water Sci.*
- Herbert-Guillou, D., Tribollet, B., Festy, D., 2001. Influence of the hydrodynamics on the biofilm formation by mass transport analysis. *Bioelectrochemistry* 53, 119–125. [https://doi.org/10.1016/S0302-4598\(00\)00121-5](https://doi.org/10.1016/S0302-4598(00)00121-5)
- Hou, J., Shao, G., Adyel, T.M., Li, C., Liu, Z., Liu, S., Miao, L., 2022. Can the carbon metabolic activity of biofilm be regulated by the hydrodynamic conditions in urban rivers? *Sci. Total Environ.* 832, 155082. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.155082>
- Hou, P., Wang, T., Zhou, B., Song, P., Zeng, W., Muhammad, T., Li, Y., 2020. Variations in the microbial community of biofilms under different near-wall hydraulic shear stresses in agricultural irrigation systems. *Biofouling* 36, 44–55. <https://doi.org/10.1080/08927014.2020.1714600>
- Hou, Y., Gan, C., Chen, R., Chen, Ying, Yuan, S., Chen, Yao, 2021. Structural Characteristics of Aerobic Granular Sludge and Factors That Influence Its Stability: A Mini Review. *Water* 13, 2726. <https://doi.org/10.3390/w13192726>

- Huang, B., Gao, S., Xu, Z., He, H., Pan, X., 2018. The Functional Mechanisms and Application of Electron Shuttles in Extracellular Electron Transfer. *Curr. Microbiol.* 75, 99–106. <https://doi.org/10.1007/s00284-017-1386-8>
- Ieropoulos, I., Winfield, J., Greenman, J., 2010. Effects of flow-rate, inoculum and time on the internal resistance of microbial fuel cells. *Bioresour. Technol.* 101, 3520–3525. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.12.108>
- Ieropoulos, I.A., Greenman, J., Melhuish, C., Hart, J., 2005. Comparative study of three types of microbial fuel cell. *Enzyme Microb. Technol.* 37, 238–245. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.03.006>
- Ige, O., Barker, R., Hu, X., Umoru, L., Neville, A., 2013. Assessing the influence of shear stress and particle impingement on inhibitor efficiency through the application of in-situ electrochemistry in a CO₂-saturated environment. *Wear* 304, 49–59. <https://doi.org/10.1016/j.wear.2013.04.013>
- Ikeda, S., Takamatsu, Y., Tsuchiya, M., Suga, K., Tanaka, Y., Kouzuma, A., Watanabe, K., 2021. *Shewanella oneidensis* MR-1 as a bacterial platform for electro-biotechnology. *Essays Biochem.* 65, 355–364. <https://doi.org/10.1042/EBC20200178>
- Islam, M.A., Ehiraj, B., Cheng, C.K., Dubey, B.N., Khan, M.M.R., 2019. Biofilm re-vitalization using hydrodynamic shear stress for stable power generation in microbial fuel cell. *J. Electroanal. Chem.* 844, 14–22. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2019.05.013>
- Jain, A., Zhang, X., Pastorella, G., Connolly, J.O., Barry, N., Woolley, R., Krishnamurthy, S., Marsili, E., 2012. Electron transfer mechanism in *Shewanella loihica* PV-4 biofilms formed at graphite electrode. *Bioelectrochemistry Amst. Neth.* 87, 28–32. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2011.12.012>
- Johnson, L.R., 2008. Microcolony and biofilm formation as a survival strategy for bacteria. *J. Theor. Biol.* 251, 24–34. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2007.10.039>
- Jones, A.-A.D., Buie, C.R., 2019. Continuous shear stress alters metabolism, mass-transport, and growth in electroactive biofilms independent of surface substrate transport. *Sci. Rep.* 9, 2602. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39267-2>
- Juang, D.F., Yang, P.C., Lee, C.H., Hsueh, S.C., Kuo, T.H., 2011. Electrogenic capabilities of gram negative and gram positive bacteria in microbial fuel cell combined with biological wastewater treatment. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 8, 781–792. <https://doi.org/10.1007/BF03326261>
- Kamali, M., Guo, Y., Aminabhavi, T.M., Abbassi, R., Dewil, R., Appels, L., 2023. Pathway towards the commercialization of sustainable microbial fuel cell-based wastewater treatment technologies. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 173, 113095. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2022.113095>
- Kaplan, J.B., 2010. Biofilm Dispersal: Mechanisms, Clinical Implications, and Potential Therapeutic Uses. *J. Dent. Res.* 89, 205–218. <https://doi.org/10.1177/0022034509359403>
- Kiely, P.D., Call, D.F., Yates, M.D., Regan, J.M., Logan, B.E., 2010. Anodic biofilms in microbial fuel cells harbor low numbers of higher-power-producing bacteria than abundant genera. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 88, 371–380. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2757-2>
- Kiran, R., Patil, S.A., 2019. Microbial Electroactive Biofilms, in: Rathinam, N.K., Sani, R.K. (Eds.), *ACS Symposium Series*. American Chemical Society, Washington, DC, pp. 159–186. <https://doi.org/10.1021/bk-2019-1323.ch008>

- Koók, L., Bakonyi, P., Harnisch, F., Kretzschmar, J., Chae, K.-J., Zhen, G., Kumar, G., Rózsenszki, T., Tóth, G., Nemestóthy, N., Bélafi-Bakó, K., 2019. Biofouling of membranes in microbial electrochemical technologies: Causes, characterization methods and mitigation strategies. *Bioresour. Technol.* 279, 327–338. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.02.001>
- Krieg, T., Wood, J.A., Mangold, K.-M., Holtmann, D., 2018. Mass transport limitations in microbial fuel cells: Impact of flow configurations. *Biochem. Eng. J.* 138, 172–178. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.07.017>
- Kristensen, J.M., Nierychlo, M., Albertsen, M., Nielsen, P.H., 2020. Bacteria from the Genus *Arcobacter* Are Abundant in Effluent from Wastewater Treatment Plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 86, e03044-19. <https://doi.org/10.1128/AEM.03044-19>
- Kristiawan, M., Hassan, M.E., Faye, A.E., Sobolik, V., 2019. Experimental investigation of Taylor-Couette-Poiseuille flow at low Taylor and Reynolds numbers. *PLoS ONE* 14, e0212728. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212728>
- Krsmanovic, M., Biswas, D., Ali, H., Kumar, A., Ghosh, R., Dickerson, A.K., 2021. Hydrodynamics and surface properties influence biofilm proliferation. *Adv. Colloid Interface Sci.* 288, 102336. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102336>
- Kumar, A., Hsu, L.H.-H., Kavanagh, P., Barrière, F., Lens, P.N.L., Lapinsonnière, L., Lienhard V, J.H., Schröder, U., Jiang, X., Leech, D., 2017. The ins and outs of microorganism–electrode electron transfer reactions. *Nat. Rev. Chem.* 1, 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41570-017-0024>
- Kumar, R., Singh, L., Zularisam, A.W., 2016. Exoelectrogens: Recent advances in molecular drivers involved in extracellular electron transfer and strategies used to improve it for microbial fuel cell applications. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 56, 1322–1336. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.12.029>
- Kumar, S., Saeed, G., Zhu, L., Hui, K.N., Kim, N.H., Lee, J.H., 2021. 0D to 3D carbon-based networks combined with pseudocapacitive electrode material for high energy density supercapacitor: A review. *Chem. Eng. J.* 403, 126352. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.126352>
- Labraga, L., Bourabaa, N., Berkah, T., 2002. Wall shear stress from a rotating cylinder in cross flow using the electrochemical technique. *Exp. Fluids* 33, 488–496. <https://doi.org/10.1007/s00348-002-0504-x>
- Labrenz, M., Banfield, J.F., 2004. Sulfate-Reducing Bacteria-Dominated Biofilms That Precipitate ZnS in a Subsurface Circumneutral-pH Mine Drainage System. *Microb. Ecol.* 47, 205–217.
- Larcher, D., Tarascon, J.-M., 2015. Towards greener and more sustainable batteries for electrical energy storage. *Nat. Chem.* 7, 19–29. <https://doi.org/10.1038/NCHEM.2085>
- Lê, S., Josse, J., Husson, F., 2008. FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis. *J. Stat. Softw.* 25, 1–18. <https://doi.org/10.18637/jss.v025.i01>
- Légrand, J., Dumargue, P., Coeuret, F., 1980. Overall mass transfer to the rotating inner electrode of a concentric cylindrical reactor with axial flow. *Electrochimica Acta* 25, 669–673. [https://doi.org/10.1016/0013-4686\(80\)87074-5](https://doi.org/10.1016/0013-4686(80)87074-5)
- Levich, V.G., 1962. *Physicochemical hydrodynamics*. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N.J.
- Li, C., Maqbool, T., Kang, H., Zhang, Z., 2022. In-Situ Sludge Reduction in Membrane-Controlled Anoxic-Oxic-Anoxic Bioreactor: Performance and Mechanism. *Membranes* 12, 659. <https://doi.org/10.3390/membranes12070659>
- Li, J., Deng, B., Zhang, B., Shen, X., Kim, C.N., 2015. CFD simulation of an unbaffled stirred tank reactor driven by a magnetic rod: assessment of turbulence models. *Water Sci. Technol.* 72, 1308–1318. <https://doi.org/10.2166/wst.2015.314>

- Li, J., Zhao, X., 2020. Effects of quorum sensing on the biofilm formation and viable but non-culturable state. *Food Res. Int.* 137, 109742. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109742>
- Li, S., Cheng, C., Thomas, A., 2017. Carbon-Based Microbial-Fuel-Cell Electrodes: From Conductive Supports to Active Catalysts. *Adv. Mater.* 29, 1602547. <https://doi.org/10.1002/adma.201602547>
- Li, Y., Xu, D., Chen, C., Li, X., Jia, R., Zhang, D., Sand, W., Wang, F., Gu, T., 2018. Anaerobic microbiologically influenced corrosion mechanisms interpreted using bioenergetics and bioelectrochemistry: A review. *J. Mater. Sci. Technol.* 34, 1713–1718. <https://doi.org/10.1016/j.jmst.2018.02.023>
- Liu, Hong-zhou, Zhang, Y., Yang, S., Wang, N., Liu, Hai-bo, Li, J., 2022. Introducing electrolysis to enhance anaerobic digestion resistance to acidification. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 45, 515–525. <https://doi.org/10.1007/s00449-021-02675-8>
- Liu, Y., Deng, D., Lan, X., 2015. A Highly Efficient Mixed-culture Biofilm as Anodic Catalyst and Insights into Its Enhancement through Electrochemistry by Comparison with *G. sulfurreducens*. *Electrochimica Acta* 155, 327–334. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2014.12.152>
- Liu, Yu, Tay, J.-H., 2002. The essential role of hydrodynamic shear force in the formation of biofilm and granular sludge. *Water Res.* 36, 1653–1665. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(01\)00379-7](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(01)00379-7)
- Liu, Y., Tay, J.H., 2002. The essential role of hydrodynamic shear force in the formation of biofilm and granular sludge. *Water Res.* 36, 1653–1665. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(01\)00379-7](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(01)00379-7)
- Logan, B.E., 2010. Scaling up microbial fuel cells and other bioelectrochemical systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85, 1665–1671. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2378-9>
- Logan, B.E., 2009. Exoelectrogenic bacteria that power microbial fuel cells. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 375–381. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2113>
- Logan, B.E., Rabaey, K., 2012. Conversion of Wastes into Bioelectricity and Chemicals by Using Microbial Electrochemical Technologies. *Science* 337, 686–690. <https://doi.org/10.1126/science.1217412>
- Logan, B.E., Rossi, R., Ragab, A., Saikaly, P.E., 2019. Electroactive microorganisms in bioelectrochemical systems. *Nat. Rev. Microbiol.* 17, 307–319. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0173-x>
- Lovley, D.R., 2012. Electromicrobiology, in: Gottesman, S., Harwood, C.S., Schneewind, O. (Eds.), *Annual Review of Microbiology*, Vol 66. Annual Reviews, Palo Alto, pp. 391–409. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092611-150104>
- Lovley, D.R., Walker, D.J.F., 2019. Geobacter Protein Nanowires. *Front. Microbiol.* 10.
- Luo, T., Abdu, S., Wessling, M., 2018. Selectivity of ion exchange membranes: A review. *J. Membr. Sci.* 555, 429–454. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2018.03.051>
- Lusk, B.G., Parameswaran, P., Popat, S.C., Rittmann, B.E., Torres, C.I., 2016. The effect of pH and buffer concentration on anode biofilms of *Thermincola ferriacetica*. *Bioelectrochemistry* 112, 47–52. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2016.07.007>
- Malkin, S.Y., Rao, A.M., Seitaj, D., Vasquez-Cardenas, D., Zetsche, E.-M., Hidalgo-Martinez, S., Boschker, H.T., Meysman, F.J., 2014. Natural occurrence of microbial sulphur oxidation by long-range electron transport in the seafloor. *ISME J.* 8, 1843–1854. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.41>

- Martinez Ostormujof, L., Teychené, S., Achouak, W., Fochesato, S., Bakarat, M., Rodriguez-Ruiz, I., Bergel, A., Erable, B., 2023. Systemic Analysis of the Spatiotemporal Changes in Multi-Species Electroactive Biofilms to Clarify the Gradual Decline of Current Generation in Microbial Anodes. *ChemElectroChem* 10, e202201135. <https://doi.org/10.1002/celec.202201135>
- Mateo, S., Cañizares, P., Rodrigo, M.A., Fernandez-Morales, F.J., 2018. Driving force behind electrochemical performance of microbial fuel cells fed with different substrates. *Chemosphere* 207, 313–319. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.05.100>
- Mehel, A., Gabillet, C., Djeridi, H., 2005. Bubble Effect on the Structures of Weakly Turbulent Couette Taylor Flow. *J. Fluids Eng.* 128, 819–831. <https://doi.org/10.1115/1.2201641>
- Miller, M.B., Bassler, B.L., 2001. Quorum sensing in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 55, 165–199. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.165>
- Modin, O., Aulenta, F., 2017. Three promising applications of microbial electrochemistry for the water sector. *Environ. Sci. Water Res. Technol.* 3, 391–402. <https://doi.org/10.1039/C6EW00325G>
- Molderez, T.R., PrévotEAU, A., Ceysens, F., Verhelst, M., Rabaey, K., 2021. A chip-based 128-channel potentiostat for high-throughput studies of bioelectrochemical systems: Optimal electrode potentials for anodic biofilms. *Biosens. Bioelectron.* 174, 112813. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112813>
- Monico, R.O., Huisman, S.G., Jannink, T.J.G., van Gils, D.P.M., Verzicco, R., Grossmann, S., Sun, C., Lohse, D., 2014. Optimal Taylor-Couette flow: Radius ratio dependence. *J. Fluid Mech.* 747, 1–29. <https://doi.org/10.1017/jfm.2014.134>
- Moss, C., Jarmatz, N., Hartig, D., Schnoeing, L., Scholl, S., Schroeder, U., 2020. Studying the Impact of Wall Shear Stress on the Development and Performance of Electrochemically Active Biofilms. *Chempluschem* 85, 2298–2307. <https://doi.org/10.1002/cplu.202000544>
- Mueller, J.A., Boyle, W.C., Pöpel, H.J., 2002. Aeration: principles and practice, Water quality management library. CRC Press, Boca Raton.
- Najafpour, G.D., 2007. CHAPTER 5 - Growth Kinetics, in: Najafpour, G.D. (Ed.), *Biochemical Engineering and Biotechnology*. Elsevier, Amsterdam, pp. 81–141. <https://doi.org/10.1016/B978-044452845-2/50005-7>
- Narayanan, C.M., Narayan, V., 2019. Biological wastewater treatment and bioreactor design: a review. *Sustain. Environ. Res.* 29, 33. <https://doi.org/10.1186/s42834-019-0036-1>
- Nejadnik, M.R., van der Mei, H.C., Busscher, H.J., Norde, W., 2008. Determination of the Shear Force at the Balance between Bacterial Attachment and Detachment in Weak-Adherence Systems, Using a Flow Displacement Chamber. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 916–919. <https://doi.org/10.1128/AEM.01557-07>
- Nemri, M., Charton, S., Climent, E., 2016. Mixing and axial dispersion in Taylor–Couette flows: The effect of the flow regime. *Chem. Eng. Sci.* 139, 109–124. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2015.09.022>
- Noël, T., Cao, Y., Laudadio, G., 2019. The Fundamentals Behind the Use of Flow Reactors in Electrochemistry. *Acc. Chem. Res.* 52, 2858–2869. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.9b00412>
- Oliot, M., Chong, P., Erable, B., Bergel, A., 2017. Influence of the electrode size on microbial anode performance. *Chem. Eng. J.* 327, 218–227. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.06.044>

- Pan, J., Tan, L., Fan, Q., Cao, X., Huang, J., Gu, Y., Chen, T., 2023. Effect of different carbon sources on sulfate reduction and microbial community structure in bioelectrochemical systems. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 30, 18312–18324. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-23487-7>
- Pan, Y., Zhu, T., He, Z., 2019. Energy advantage of anode electrode rotation over anolyte recirculation for operating a tubular microbial fuel cell. *Electrochem. Commun.* 106, 106529. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2019.106529>
- Paquete, C.M., Rosenbaum, M.A., Bañeras, L., Rotaru, A.-E., Puig, S., 2022. Let's chat: Communication between electroactive microorganisms. *Bioresour. Technol.* 347, 126705. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.126705>
- Parameswaran, P., Bry, T., Papat, S.C., Lusk, B.G., Rittmann, B.E., Torres, C.I., 2013. Kinetic, electrochemical, and microscopic characterization of the thermophilic, anode-respiring bacterium *Thermincola ferriacetica*. *Environ. Sci. Technol.* 47, 4934–4940. <https://doi.org/10.1021/es400321c>
- Paul, E., Ochoa, J.C., Pechaud, Y., Liu, Y., Liné, A., 2012. Effect of shear stress and growth conditions on detachment and physical properties of biofilms. *Water Res.* 46, 5499–5508. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.07.029>
- Paule, A., Lauga, B., Ten-Hage, L., Morchain, J., Duran, R., Paul, E., Rols, J.L., 2011. A photosynthetic rotating annular bioreactor (Taylor–Couette type flow) for phototrophic biofilm cultures. *Water Res.* 45, 6107–6118. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.09.007>
- Pechaud, Y., Marcato-Romain, C.E., Girbal-Neuhauser, E., Queinnec, I., Bessiere, Y., Paul, E., 2012. Combining hydrodynamic and enzymatic treatments to improve multi-species thick biofilm removal. *Chem. Eng. Sci.* 80, 109–118. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2012.06.014>
- Penteado, E.D., Fernandez-Marchante, C.M., Zaiat, M., Gonzalez, E.R., Rodrigo, M.A., 2018. Optimization of the performance of a microbial fuel cell using the ratio electrode-surface area / anode-compartment volume. *Braz. J. Chem. Eng.* 35, 141–146. <https://doi.org/10.1590/0104-6632.20180351S20160411>
- Pereira, J., de Nooy, S., Sleutels, T., ter Heijne, A., 2022. Opportunities for visual techniques to determine characteristics and limitations of electro-active biofilms. *Biotechnol. Adv.* 60, 108011. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2022.108011>
- Perry, S.C., León, C.P. de, Walsh, F.C., 2020. Review—The Design, Performance and Continuing Development of Electrochemical Reactors for Clean Electrosynthesis. *J. Electrochem. Soc.* 167, 155525. <https://doi.org/10.1149/1945-7111/abc58e>
- Peterson, B.W., He, Y., Ren, Y., Zerdoum, A., Libera, M.R., Sharma, P.K., van Winkelhoff, A.-J., Neut, D., Stoodley, P., van der Mei, H.C., Busscher, H.J., 2015. Viscoelasticity of biofilms and their recalcitrance to mechanical and chemical challenges. *FEMS Microbiol. Rev.* 39, 234–245. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuu008>
- Petrova, O.E., Sauer, K., 2016. Escaping the biofilm in more than one way: Desorption, detachment or dispersion. *Curr. Opin. Microbiol.* 30, 67–78. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.01.004>
- Pham, T.H., Aelterman, P., Verstraete, W., 2009. Bioanode performance in bioelectrochemical systems: recent improvements and prospects. *Trends Biotechnol.* 27, 168–178. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.11.005>
- Pham, T.H., Boon, N., Aelterman, P., Clauwaert, P., De Schamphelaire, L., Vanhaecke, L., De Maeyer, K., Höfte, M., Verstraete, W., Rabaey, K., 2008. Metabolites produced by *Pseudomonas* sp. enable a Gram-positive bacterium to achieve extracellular electron transfer. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77, 1119–1129. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1248-6>

- Philippon, T., Tian, J., Bureau, C., Chaumont, C., Midoux, C., Tournebize, J., Bouchez, T., Barriere, F., 2021. Denitrifying bio-cathodes developed from constructed wetland sediments exhibit electroactive nitrate reducing biofilms dominated by the genera *Azoarcus* and *Pontibacter*. *Bioelectrochemistry* 140, 107819. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2021.107819>
- Picioreanu, C., Loosdrecht, M.C.M. van, Heijnen, J.J., 1998. Mathematical modeling of biofilm structure with a hybrid differential-discrete cellular automaton approach. *Biotechnol. Bioeng.* 58, 101–116. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19980405\)58:1<101::AID-BIT11>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19980405)58:1<101::AID-BIT11>3.0.CO;2-M)
- Picioreanu, C., Vrouwenvelder, J.S., van Loosdrecht, M.C.M., 2009. Three-dimensional modeling of biofouling and fluid dynamics in feed spacer channels of membrane devices. *J. Membr. Sci.* 345, 340–354. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2009.09.024>
- Pimenov, N.V., Merkel, A.Yu., Tarnovetskii, I.Yu., Malakhova, T.V., Samylina, O.S., Kanapatskii, T.A., Tikhonova, E.N., Vlasova, M.A., 2018. Structure of Microbial Mats in the Mramornaya Bay (Crimea) Coastal Areas. *Microbiology* 87, 681–691. <https://doi.org/10.1134/S0026261718050132>
- Pinck, S., Ostorumujof, L.M., Teychené, S., Erable, B., 2020. Microfluidic Microbial Bioelectrochemical Systems: An Integrated Investigation Platform for a More Fundamental Understanding of Electroactive Bacterial Biofilms. *Microorganisms* 8, 1841. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111841>
- PrévotEAU, A., Carvajal-Arroyo, J.M., Ganigué, R., Rabaey, K., 2020. Microbial electrosynthesis from CO₂: forever a promise? *Curr. Opin. Biotechnol., Energy Biotechnology • Environmental Biotechnology* 62, 48–57. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.08.014>
- Purevdorj-Gage, L.B., Stoodley, P., 2004. Biofilm Structure, Behavior, and Hydrodynamics, in: *Microbial Biofilms*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 160–173. <https://doi.org/10.1128/9781555817718.ch9>
- Quan, K., Hou, J., Zhang, Z., Ren, Y., Peterson, B.W., Flemming, H.-C., Mayer, C., Busscher, H.J., van der Mei, H.C., 2022. Water in bacterial biofilms: pores and channels, storage and transport functions. *Crit. Rev. Microbiol.* 48, 283–302. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2021.1962802>
- Rabaey, K., Boon, N., Höfte, M., Verstraete, W., 2005. Microbial Phenazine Production Enhances Electron Transfer in Biofuel Cells. *Environ. Sci. Technol.* 39, 3401–3408. <https://doi.org/10.1021/es048563o>
- Racina, A., Kind, M., 2006. Specific power input and local micromixing times in turbulent Taylor–Couette flow. *Exp. Fluids* 41, 513–522. <https://doi.org/10.1007/s00348-006-0178-x>
- Ren, H., Torres, C.I., Parameswaran, P., Rittmann, B.E., Chae, J., 2014. Improved current and power density with a micro-scale microbial fuel cell due to a small characteristic length. *Biosens. Bioelectron.* 61, 587–592. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.05.037>
- Renslow, R.S., Babauta, J.T., Dohnalkova, A.C., Boyanov, M.I., Kemner, K.M., Majors, P.D., Fredrickson, J.K., Beyenal, H., 2013. Metabolic spatial variability in electrode-respiring *Geobacter sulfurreducens* biofilms. *Energy Environ. Sci.* 6, 1827–1836. <https://doi.org/10.1039/C3EE40203G>
- Rimboud, M., Pocaznoi, D., Erable, B., Bergel, A., 2014. Electroanalysis of microbial anodes for bioelectrochemical systems: basics, progress and perspectives. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 16, 16349–16366. <https://doi.org/10.1039/C4CP01698J>

- Rizk, N., Ait-Mouheb, N., Molle, B., Roche, N., 2021. Treated wastewater reuse in micro-irrigation: effect of shear stress on biofilm development kinetics and chemical precipitation. *Environ. Technol.* 42, 206–216. <https://doi.org/10.1080/09593330.2019.1625956>
- Rochex, A., Godon, J.-J., Bernet, N., Escudié, R., 2008. Role of shear stress on composition, diversity and dynamics of biofilm bacterial communities. *Water Res.* 42, 4915–4922. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.09.015>
- Rodesney, C.A., Roman, B., Dhamani, N., Cooley, B.J., Katira, P., Touhami, A., Gordon, V.D., 2017. Mechanosensing of shear by *Pseudomonas aeruginosa* leads to increased levels of the cyclic-di-GMP signal initiating biofilm development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 114, 5906–5911. <https://doi.org/10.1073/pnas.1703255114>
- Ross, T.K., Wragg, A.A., 1965. Electrochemical mass transfer studies in annuli. *Electrochimica Acta* 10, 1093–1106. [https://doi.org/10.1016/0013-4686\(65\)80034-2](https://doi.org/10.1016/0013-4686(65)80034-2)
- Rousseau, R., Délia, M.-L., Bergel, A., 2014. A theoretical model of transient cyclic voltammetry for electroactive biofilms. *Energy Environ. Sci.* 7, 1079–1094. <https://doi.org/10.1039/C3EE42329H>
- Rousseau, Raphaël, Etcheverry, L., Roubaud, E., Basséguy, R., Délia, M.-L., Bergel, A., 2020. Microbial electrolysis cell (MEC): Strengths, weaknesses and research needs from electrochemical engineering standpoint. *Appl. Energy* 257, 113938. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2019.113938>
- Rousseau, Raphael, Etcheverry, L., Roubaud, E., Basseguy, R., Delia, M.-L., Bergel, A., 2020. Microbial electrolysis cell (MEC): Strengths, weaknesses and research needs from electrochemical engineering standpoint. *Appl. Energy* 257, 113938. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2019.113938>
- Sánchez, C., Dessì, P., Duffy, M., Lens, P.N.L., 2020. Microbial electrochemical technologies: Electronic circuitry and characterization tools. *Biosens. Bioelectron.* 150, 111884. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.111884>
- Santhosh, C., Velmurugan, V., Jacob, G., Jeong, S.K., Grace, A.N., Bhatnagar, A., 2016. Role of nanomaterials in water treatment applications: A review. *Chem. Eng. J.* 306, 1116–1137. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.08.053>
- Santoro, C., Arbizzani, C., Erable, B., Ieropoulos, I., 2017. Microbial fuel cells: From fundamentals to applications. A review. *J. Power Sources* 356, 225–244. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2017.03.109>
- Saur, T., Morin, E., Habouzit, F., Bernet, N., Escudié, R., 2017. Impact of wall shear stress on initial bacterial adhesion in rotating annular reactor. *PLOS ONE* 12, e0172113. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172113>
- Schrimpf, M., Esteban, J., Warmeling, H., Färber, T., Behr, A., Vorholt, A.J., 2021. Taylor-Couette reactor: Principles, design, and applications. *AIChE J.* 67, e17228. <https://doi.org/10.1002/aic.17228>
- Schröder, U., Harnisch, F., Angenent, L.T., 2015. Microbial electrochemistry and technology: terminology and classification. *Energy Environ. Sci.* 8, 513–519. <https://doi.org/10.1039/C4EE03359K>
- Schrott, G.D., Ordoñez, M.V., Robuschi, L., Busalmen, J.P., 2014. Physiological Stratification in Electricity-Producing Biofilms of *Geobacter sulfurreducens*. *ChemSusChem* 7, 598–603. <https://doi.org/10.1002/cssc.201300605>

- Schulthess, R.V., Gujer, W., 1996. Release of nitrous oxide (N₂O) from denitrifying activated sludge: Verification and application of a mathematical model. *Water Res.* 30, 521–530. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(95\)00204-9](https://doi.org/10.1016/0043-1354(95)00204-9)
- Seh, Z.W., Kibsgaard, J., Dickens, C.F., Chorkendorff, I.B., Norskov, J.K., Jaramillo, T.F., 2017. Combining theory and experiment in electrocatalysis: Insights into materials design. *Science* 355, eaad4998. <https://doi.org/10.1126/science.aad4998>
- Silverman, D.C., 2004. The Rotating Cylinder Electrode for Examining Velocity-Sensitive Corrosion—A Review. *Corrosion* 60, 1003–1023. <https://doi.org/10.5006/1.3299215>
- Simões, L.C., Gomes, I.B., Sousa, H., Borges, A., Simões, M., 2022. Biofilm formation under high shear stress increases resilience to chemical and mechanical challenges. *Biofouling* 38, 1–12. <https://doi.org/10.1080/08927014.2021.2006189>
- Sleutels, T.H.J.A., Darus, L., Hamelers, H.V.M., Buisman, C.J.N., 2011. Effect of operational parameters on Coulombic efficiency in bioelectrochemical systems. *Bioresour. Technol.* 102, 11172–11176. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.09.078>
- Sobolík, V., Benabes, B., Cognet, G., 1995. Study of Taylor-Couette flow using a three-segment electrodiffusion probe. *J. Appl. Electrochem.* 25, 441–449. <https://doi.org/10.1007/BF00260686>
- Solano, C., Echeverz, M., Lasa, I., 2014. Biofilm dispersion and quorum sensing. *Curr. Opin. Microbiol., Cell regulation* 18, 96–104. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.02.008>
- Song, F., Koo, H., Ren, D., 2015. Effects of Material Properties on Bacterial Adhesion and Biofilm Formation. *J. Dent. Res.* 94, 1027–1034. <https://doi.org/10.1177/0022034515587690>
- Stewart, P.S., 1993. A model of biofilm detachment. *Biotechnol. Bioeng.* 41, 111–117. <https://doi.org/10.1002/bit.260410115>
- Stoodley, P., Lewandowski, Z., Boyle, J.D., Lappin-Scott, H.M., 1999. Structural deformation of bacterial biofilms caused by short-term fluctuations in fluid shear: An in situ investigation of biofilm rheology. *Biotechnol. Bioeng.* 65, 83–92. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19991005\)65:1<83::AID-BIT10>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19991005)65:1<83::AID-BIT10>3.0.CO;2-B)
- Strycharz, S.M., Malanoski, A.P., Snider, R.M., Yi, H., Lovley, D.R., Tender, L.M., 2011. Application of cyclic voltammetry to investigate enhanced catalytic current generation by biofilm-modified anodes of *Geobacter sulfurreducens* strain DL1 vs. variant strain KN400. *Energy Environ. Sci.* 4, 896–913. <https://doi.org/10.1039/C0EE00260G>
- Sun, D., Chen, J., Huang, H., Liu, W., Ye, Y., Cheng, S., 2016. The effect of biofilm thickness on electrochemical activity of *Geobacter sulfurreducens*. *Int. J. Hydrog. Energy* 37, 16523–16528. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.04.163>
- Sydow, A., Krieg, T., Mayer, F., Schrader, J., Holtmann, D., 2014. Electroactive bacteria—molecular mechanisms and genetic tools. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 8481–8495. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6005-z>
- Syron, E., Casey, E., 2008. Membrane-aerated biofilms for high rate biotreatment: Performance appraisal, engineering principles, scale-up, and development requirements. *Environ. Sci. Technol.* 42, 1833–1844. <https://doi.org/10.1021/es0719428>
- Tejedor-Sanz, S., Fernández-Labrador, P., Hart, S., Torres, C.I., Esteve-Núñez, A., 2018. *Geobacter* Dominates the Inner Layers of a Stratified Biofilm on a Fluidized Anode During Brewery Wastewater Treatment. *Front. Microbiol.* 9.
- Telgmann, U., Horn, H., Morgenroth, E., 2004. Influence of growth history on sloughing and erosion from biofilms. *Water Res.* 38, 3671–3684. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.05.020>

- ter Heijne, A., Pereira, M.A., Pereira, J., Sleutels, T., 2021. Electron Storage in Electroactive Biofilms. *Trends Biotechnol.* 39, 34–42. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2020.06.006>
- Thauer, R. K., Jungermann, K., Decker, K., 1977. Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriol. Rev.* 41, 100–180. <https://doi.org/10.1128/br.41.1.100-180.1977>
- Thauer, R K, Jungermann, K., Decker, K., 1977. Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriol. Rev.* 41, 100–180.
- Thormann, K.M., Saville, R.M., Shukla, S., Pelletier, D.A., Spormann, A.M., 2004. Initial Phases of Biofilm Formation in *Shewanella oneidensis* MR-1. *J. Bacteriol.* 186, 8096–8104. <https://doi.org/10.1128/jb.186.23.8096-8104.2004>
- Torres, C.I., Krajmalnik-Brown, R., Parameswaran, P., Marcus, A.K., Wanger, G., Gorby, Y.A., Rittmann, B.E., 2009. Selecting Anode-Respiring Bacteria Based on Anode Potential: Phylogenetic, Electrochemical, and Microscopic Characterization. *Environ. Sci. Technol.* 43, 9519–9524. <https://doi.org/10.1021/es902165y>
- Tsagkari, E., Connelly, S., Liu, Z., McBride, A., Sloan, W.T., 2022. The role of shear dynamics in biofilm formation. *Npj Biofilms Microbiomes* 8, 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41522-022-00300-4>
- Valentini, F., Amine, A., Orlanducci, S., Terranova, M.L., Palleschi, G., 2003. Carbon Nanotube Purification: Preparation and Characterization of Carbon Nanotube Paste Electrodes. *Anal. Chem.* 75, 5413–5421. <https://doi.org/10.1021/ac0300237>
- Vilas Boas, J., Oliveira, V.B., Marcon, L.R.C., Pinto, D.P., Simoes, M., Pinto, A.M.F.R., 2015. Effect of operating and design parameters on the performance of a microbial fuel cell with *Lactobacillus pentosus*. *Biochem. Eng. J.* 104, 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.05.009>
- Walker, D.J.F., Martz, E., Holmes, D.E., Zhou, Z., Nonnenmann, S.S., Lovley, D.R., 2019. The Archaeum of *Methanospirillum hungatei* Is Electrically Conductive. *mBio* 10, e00579-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.00579-19>
- Walsh, F.C., Kear, G., Nahlé, A.H., Wharton, J.A., Arenas, L.F., 2017. The rotating cylinder electrode for studies of corrosion engineering and protection of metals—An illustrated review. *Corros. Sci.* 123, 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.corsci.2017.03.024>
- Wang, H., Ren, Z.J., 2013. A comprehensive review of microbial electrochemical systems as a platform technology. *Biotechnol. Adv.* 31, 1796–1807. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.10.001>
- Wang, Y.-R., Gong, L., Jiang, J.-K., Chen, Z.-G., Yu, H.-Q., Mu, Y., 2017. Response of anodic biofilm to hydrodynamic shear in two-chamber bioelectrochemical systems. *Electrochimica Acta* 258, 1304–1310. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2017.11.187>
- Weissman, J.L., Hou, S., Fuhrman, J.A., 2021. Estimating maximal microbial growth rates from cultures, metagenomes, and single cells via codon usage patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 118, e2016810118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2016810118>
- Wilhelm, L., Besemer, K., Fasching, C., Urich, T., Singer, G.A., Quince, C., Battin, T.J., 2014. Rare but active taxa contribute to community dynamics of benthic biofilms in glacier-fed streams. *Environ. Microbiol.* 16, 2514–2524. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12392>
- Wilking, J.N., Zaburdaev, V., De Volder, M., Losick, R., Brenner, M.P., Weitz, D.A., 2013. Liquid transport facilitated by channels in *Bacillus subtilis* biofilms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 848–852. <https://doi.org/10.1073/pnas.1216376110>

- Xing, D., Zuo, Y., Cheng, S., Regan, J.M., Logan, B.E., 2008. Electricity Generation by *Rhodospseudomonas palustris* DX-1. *Environ. Sci. Technol.* 42, 4146–4151. <https://doi.org/10.1021/es800312v>
- Yan, X., Du, Q., Mu, Q., Tian, L., Wan, Y., Liao, C., Zhou, L., Yan, Y., Li, N., Logan, B.E., Wang, X., 2021. Long-Term Succession Shows Interspecies Competition of *Geobacter* in Exoelectrogenic Biofilms. *Environ. Sci. Technol.* 55, 14928–14937. <https://doi.org/10.1021/acs.est.1c03010>
- Yang, G., Huang, L., Yu, Z., Liu, X., Chen, S., Zeng, J., Zhou, S., Zhuang, L., 2019. Anode potentials regulate *Geobacter* biofilms: New insights from the composition and spatial structure of extracellular polymeric substances. *Water Res.* 159, 294–301. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.05.027>
- Yap, S., Scarascia, G., Hong, P., 2017. Bacterial cell numbers and community structures of seawater biofilms depend on the attachment substratum. *DESALINATION WATER Treat.* 97, 41–71. <https://doi.org/10.5004/dwt.2017.21600>
- Ying, X., Guo, K., Chen, W., Gu, Y., Shen, D., Zhou, Y., Liang, Y., Wang, Y., Wang, M., Feng, H., 2017. The impact of electron donors and anode potentials on the anode-respiring bacteria community. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101, 7997–8005. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8518-8>
- Yu, J., Park, H., Park, Y., Lee, T., 2022. Power Generation and Microbial Community Shift According to Applied Anodic Potential in Electroactive Biofilm Reactors Treating Synthetic and Domestic Wastewater. *Energies* 15, 9459. <https://doi.org/10.3390/en15249459>
- Zelinsky, A.G., Pirogov, B.Ya., 2008. Effective thickness of the diffusion layer during hydrogen ion reduction in aqueous hydrochloric acid solutions. *Russ. J. Electrochem.* 44, 585–593. <https://doi.org/10.1134/S1023193508050133>
- Zhao, J., Li, F., Cao, Y., Zhang, X., Chen, T., Song, H., Wang, Z., 2021. Microbial extracellular electron transfer and strategies for engineering electroactive microorganisms. *Biotechnol. Adv.* 53, 107682. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107682>
- Zhou, B., Hou, P., Xiao, Y., Song, P., Xie, E., Li, Y., 2021. Visualizing, quantifying, and controlling local hydrodynamic effects on biofilm accumulation in complex flow paths. *J. Hazard. Mater.* 416, 125937. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125937>
- Zhou, M., Zhai, Y., Dong, S., 2009. Electrochemical Sensing and Biosensing Platform Based on Chemically Reduced Graphene Oxide. *Anal. Chem.* 81, 5603–5613. <https://doi.org/10.1021/ac900136z>
- Zhou, S., An, W., Zhao, K., Lin, L., Yang, S., Zhang, Y., Xu, M., 2023. Protection of electroactive biofilms against hypersaline shock by quorum sensing. *Water Res.* 233, 119823. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2023.119823>
- Zhu, X., Yates, M.D., Hatzell, M.C., Ananda Rao, H., Saikaly, P.E., Logan, B.E., 2014. Microbial Community Composition Is Unaffected by Anode Potential. *Environ. Sci. Technol.* 48, 1352–1358. <https://doi.org/10.1021/es404690q>

ANNEXES

INFLUENCE DE L'HYDRODYNAMIQUE SUR LES REACTIONS ELECTROCHIMIQUES EN REACTEUR DE COUETTE-TAYLOR

Supplementary 2A : Influence of the inlet flow without rotation

The eCTR was equipped with electrodes with large surface areas, which covered the entire inner (working electrode) and outer (auxiliary electrode) cylinders. In microbial systems, the electrochemical reactions can consequently drastically affect the concentration of the reactive species, so that the stationary state may not be reached in batch conditions. It would therefore have been necessary to feed the reactor continuously with solution in order to keep the concentration of the reactive species constant and allow the establishment of steady state. The first objective of the eCTR characterization was to verify that the continuous axial flow induced by the recirculation did not significantly disturb the hydrodynamics. This check was carried out without rotation of the inner cylinder in order to be in the most sensitive conditions possible. Only one small axial velocity was tested ($Re = 5.8 \cdot 10^{-3}$, which is low considering the velocities studied in the literature (Ross and Wragg, 1965)), with the objective of bringing a continuous feed of nutrients for further biological applications.

Cyclic voltammetry (CV) was performed at $5 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ in phosphate solution that contained hexacyanoferrate (III) and hexacyanoferrate (II), each at 1 mM. The CV records (current intensity as a function of potential) were compared using the oxidative part ($I > 0 \text{ A}$) because the reductive part may be biased by the reduction of oxygen, which occurs in a similar potential range as the reduction of hexacyanoferrate (III). The CV records were compared with two characteristic values: the current at the peak (I_p) and the limiting current (I_L) measured at the upper limit of the potential scan from 0.55 to 0.6 V/SCE (see Figure 2.3). Eight electrodes were individually addressed in this experiment (electrodes c-e-h-j-m-o-r-t; see Figure 2.1B). The eight electrodes gave highly reproducible CV records (Figure S2 1: CV cycle and recirculation effect on eight working electrodes (c-e-h-j-m-o-r-t) acting as anodes oxidizing hexacyanoferrate II, for the values of A) I_p and B) I_L calculated. Figure S2 1 in Supplementary data) with the standard deviation lower than 4% and 5% for the I_p and I_L values, respectively.

CVs were recorded in batch condition (no solution flow) and in continuous flow of $700 \text{ mL} \cdot \text{h}^{-1}$ (corresponding to a superficial velocity of $4.4 \text{ cm} \cdot \text{h}^{-1}$). No significant difference was observed on the general shape of the CV recorded with or without continuous flow. In batch condition, I_p and I_L were 2.8 ± 0.2 and $0.74 \pm 0.07 \text{ mA}$, respectively; while in continuous mode they were 2.8 ± 0.2 and $0.71 \pm 0.07 \text{ mA}$, respectively. A lower value for I_L with axial flow is surprising, since the accessibility to electroactive species normally increases with flow. Nonetheless, they can be ignored depending on the overlap of the standard deviations. On the other hand, I_p values were constant despite the axial flow. It can be concluded that the small axial velocity of $4.4 \text{ cm} \cdot \text{h}^{-1}$ due to the solution flow had no significant effect on the current produced by the electrodes.

Consequently, all the experiments were conducted with a continuous solution flow of $700 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$, assuming that the convective part of the mass transport was fully controlled by the rotation of the inner cylinder and ignoring the influence of the small axial flow.

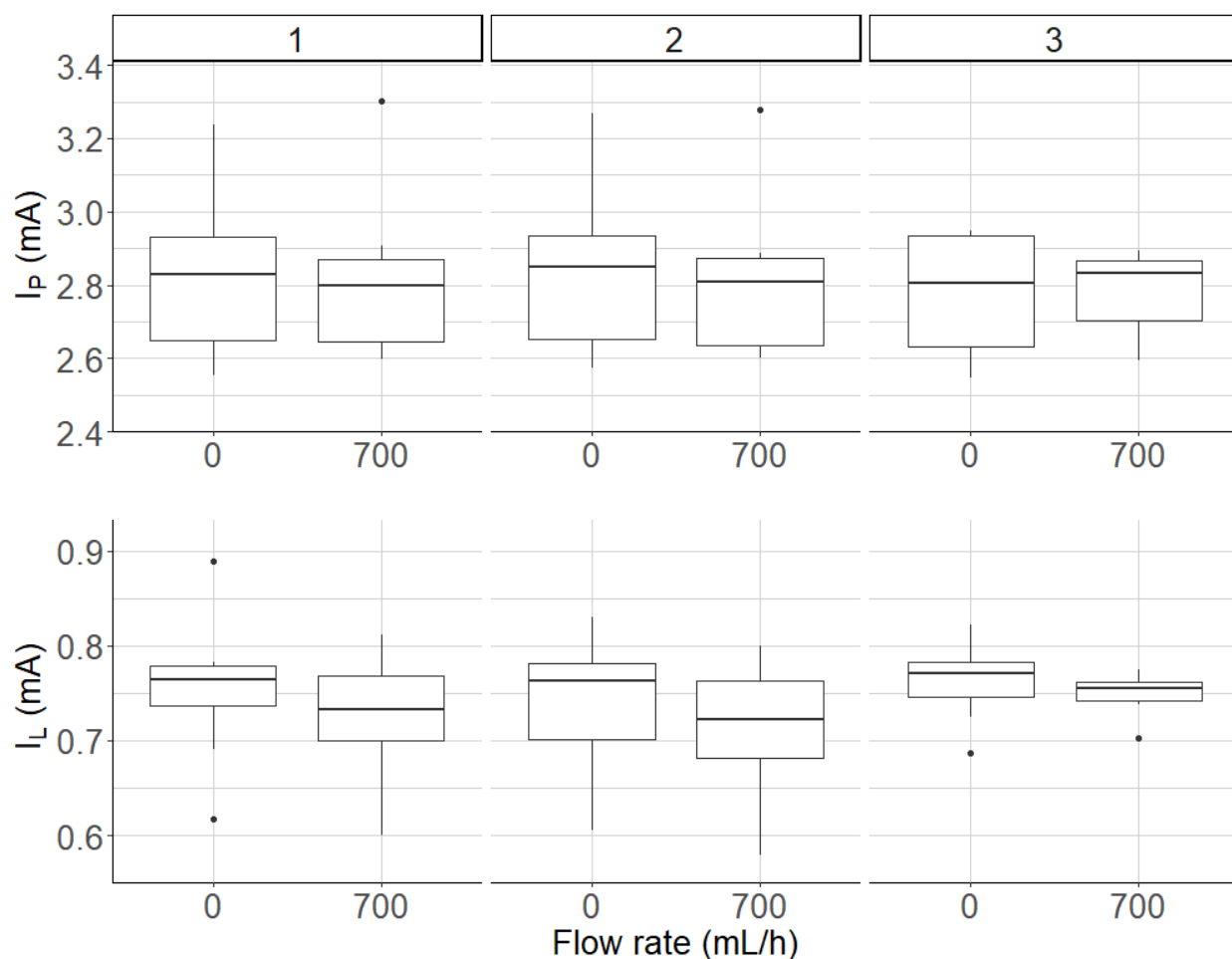


Figure S2 1: CV cycle and recirculation effect on eight working electrodes (c-e-h-j-m-o-r-t) acting as anodes oxidizing hexacyanoferrate II, for the values of A) I_P and B) I_L calculated.

I_P was considered the maximum of each anodic curve. I_L is the mean value of the oxidative plateau of the curves from 0.55 to 0.6V/SCE.

Supplementary 2B: Relation between fluid velocity and current

The molar flux density of a solute i is the sum of three components due to diffusion, migration and convection (Bird et al., 2006). Generally, solutions used in electroanalytical studies contain a supporting salt and/or a charged buffer compound at a high concentration, as was the case here (NaH_2PO_4 and Na_2HPO_4), so that the migration flux can be ignored for solutes. Furthermore, for a low solute concentration, the diffusion flux can be expressed according to Fick's law. So the molar flux density (\vec{N}_i , $\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$) of a solute i at low concentration can be written as:

$$\vec{N}_i = -D_i \overrightarrow{\text{grad}} C_i + C_i \vec{U} \quad (\text{S } 1)$$

where D_i is the effective diffusive coefficient ($\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$), C_i is the concentration ($\text{mol}\cdot\text{m}^{-3}$) and \vec{U} is the fluid velocity ($\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$).

At steady state and in the absence of a reaction in solution, the differential mass balance equation for the species i is:

$$\text{div } \vec{N}_i = 0 \quad (\text{S } 2)$$

and leads to:

$$\text{div}(-D_i \overrightarrow{\text{grad}} C_i + C_i \vec{U}) = 0 \quad (\text{S } 3)$$

At steady state, the current \vec{I} (A) is proportional to the molar flux of the electroactive species at the electrode surface. When only one electroactive species i is oxidized at the electrode surface, as was the case here, the current is expressed as:

$$\vec{I} = n_e F S \vec{N}_{i|electrode} \quad (\text{S } 4)$$

where n_e is the number of electrons produced per molecule of electroactive species, F is the Faraday constant ($96\,485\text{ C}\cdot\text{mol}^{-1}$) and S is the surface area of the electrode (m^2).

Nernst model

The Nernst model divides the solution space into two zones: a stagnant boundary layer against the electrode surface and a perfectly stirred bulk beyond the stagnant layer (Figure S2 1A). The concentration is uniformly equal to C_b in the bulk. Eq. (S 3) can thus be solved very simply in the stagnant layer, in which $U = 0$, and, combined with Eq. (S 4), gives:

$$I = n_e D_i F S \frac{C_b - C_s}{\delta_N} \quad (\text{S } 5)$$

where C_b and C_s are the concentrations of the electroactive species in the bulk and at the electrode surface, respectively (mol.m^{-3}), and δ_N is the thickness of the Nernst layer (m). The limiting current I_L is defined as the maximum value of the current that can be reached when only the diffusion transport is rate-limiting, i.e., when the electrochemical reaction is so fast in relation to mass transport that the electroactive species reacts at the electrode surface as soon as it reaches it, resulting in $C_s = 0$. According to Eq. (S 5), within the framework of Nernst's model, the limiting current is:

$$I_L = n_e F S \frac{D_i}{\delta_N} C_b \quad (\text{S } 6)$$

The Nernst model expresses the convective mass transfer coefficient K_L as a function of δ_N according to:

$$K_L = \frac{D_i}{\delta_N} \quad (\text{S } 7)$$

In a CTR, the Nernst layer thickness δ_N depends on the rotation speed. More sophisticated models are needed to obtain a theoretical relationship between the layer thickness and the rotation speed.

Gabe & Robinson for laminar flows

Under laminar flow conditions, Gabe & Robinson (Gabe and Robinson, 1972a) considered that the annulus geometry of a CTR can be approached as a straight channel for a small length M ($M \ll 2\pi R_i$) parallel to the flow. They defined the x- and y-axes as parallel and perpendicular to the channel length, respectively. They assumed that mass transport was ensured only by the fluid flow along the x-axis and only by diffusion along the y-axis, so that Eq. (S 3) becomes:

$$-D_i \frac{d^2 C_i}{dy^2} + U \frac{dC_i}{dx} = 0 \quad (\text{S } 8)$$

in which the fluid velocity U is given by Eq (2.4). They used a change in variable to transform the equation in one dimension. Then, they obtained an expression for the current:

$$I = \frac{3^{4/3}}{2\Gamma(1/3)} n_e F S D_i^{2/3} (c_b - c_s) M^{-1/3} \left(\frac{1 + R_i^2 / R_o^2}{1 - R_i^2 / R_o^2} \right)^{1/3} \omega^{1/3} \quad (\text{S } 9)$$

where Γ is the Gamma function and M the width of the electrode (m).

Gabe & Robinson for turbulent flows

Under turbulent flow conditions, Gabe & Robinson (Gabe and Robinson, 1972b) used the three-zone model from Prandtl-von Karman (Figure S2 1B), in which the layer next to the electrode surface (zone I) is considered a Nernst boundary layer and zone III, the furthest from the electrode surface, is considered in fully developed turbulence. Considering a planar geometry, the Nernst approach applied to zone I gives:

$$I = n_e F S D_i \frac{C_I - C_s}{r} \quad (\text{S } 10)$$

where C_I is the concentration (mol.m^{-3}) of the electroactive species in zone I at the distance r (m) from the electrode surface. This equation gives the concentration profile in zone I:

$$C_I = C_s + \frac{I r}{n_e F S D_i} \quad (\text{S } 11)$$

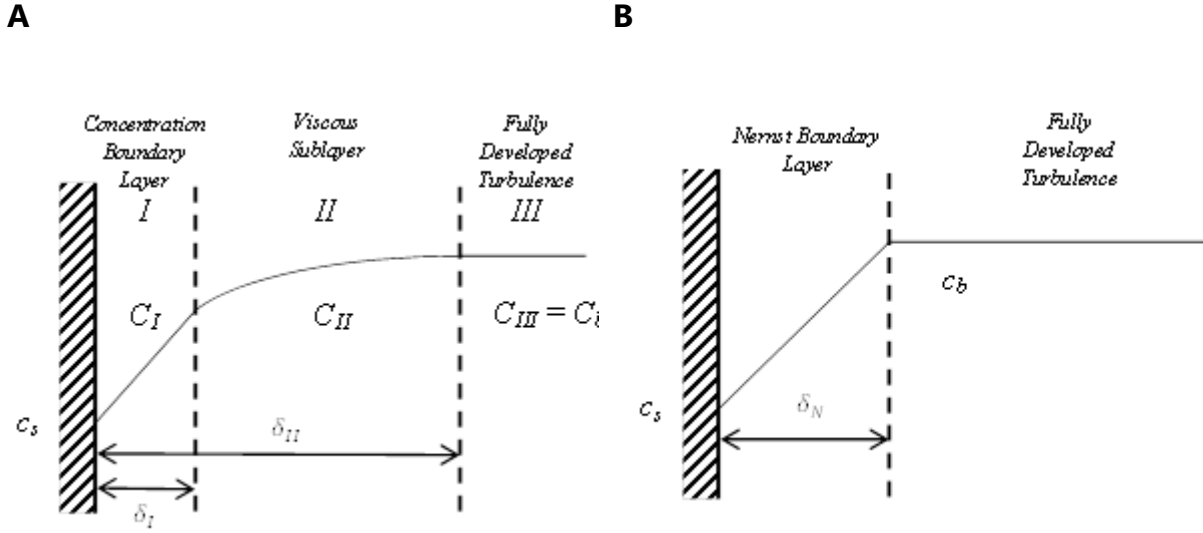


Figure S2 2: Models of mass transport near the electrode surface. The electrode is the surface of the inner cylinder of the CTR.

A) Nernst model. B) three-zone model according to Prandtl-von Karman (from Gabe and Robinson, (1972b)).

In the intermediary viscous layer (zone II), Gabe and Robinson, (1972b) assumed that mass transport is achieved by convection and eddy diffusion, so that Eq. (S 1) is transformed to:

$$\text{div} (-D_{turb} \overrightarrow{\text{grad}} C_i + C_i \overrightarrow{U}) = 0 \quad (\text{S } 12)$$

where D_{turb} ($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) is the apparent eddy viscosity and varies with the flow velocity. Assuming that U is constant in zone II and equal to ωR_i , D_{turb} could be expressed as:

$$D_{turb} = \frac{br^3 \omega^2 R_i}{\nu} \quad (\text{S } 13)$$

where r is distance from the electrode surface (m), ν the cinematic viscosity ($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) and b a constant. Solving Eq. (S 11) gives the concentration profile in zone II:

$$C_{II} = C_b + \frac{I\nu}{2n_e F S b \omega^2 R_i} \left(\frac{1}{\delta_{II}^2} - \frac{1}{r^2} \right) \quad (\text{S } 14)$$

where δ_{II} is the thickness of zone II. At the interface between zones I and II, i.e., at $r = \delta_I$, Eq. (S 11) and (S 14) must give the same concentration value. Writing this gives a relationship between δ_I and δ_{II} and considering that $\frac{\delta_I^3}{\delta_{II}^2} \ll \delta_I$ leads to the expression

of the current as:

$$I = n_e F S \left(\frac{BR_i}{\nu} \right)^{1/3} (\omega D_i)^{2/3} (C_b - C_s) \quad \text{(S 15)}$$

where $B = \left(\frac{2}{3} \right)^3 b$.

Supplementary 2C: Supplementary data for Figure 2.2.

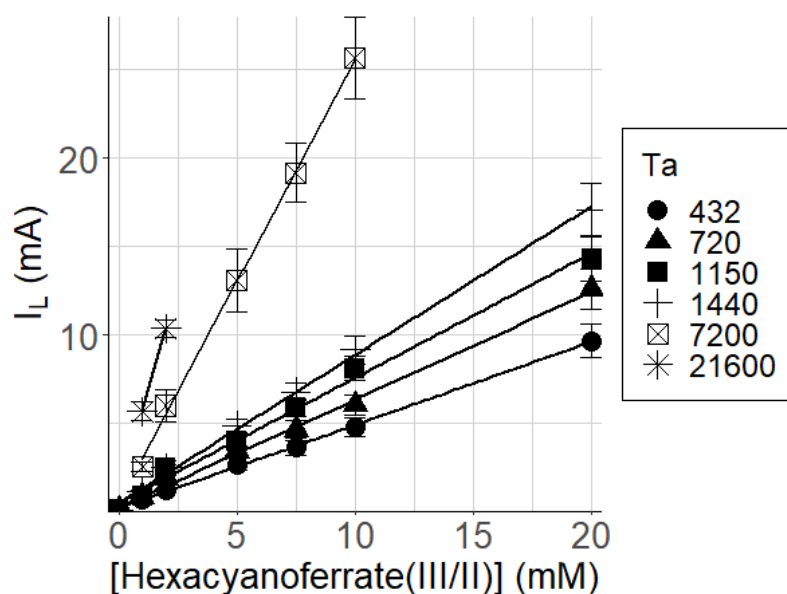


Figure S2 3: I_L values as a function of the hexacyanoferrate (III/II) concentration.

Mean and standard deviations resulted from the measurements of 15 electrodes (except electrode t in Figure 2.1B).

Table S2 1: Correspondence of the R^2 value obtained from the correlation between I_L and the hexacyanoferrate (III/II) concentration for the different Taylor values and the number of experimental points used for the correlation.

Ta	0	144	432	720	936	1,150	1,440	2,200	3,600	7,200	14,400	21,600	28,800
Slope	0.21	0.32	0.47	0.61	0.70	0.71	0.85	1.0	1.5	2.5	3.6	4.7	6.2
Intersect	0.07	0.1	0.2	0.2	0.3	0.5	0.4	0.6	0.4	0.4	1.3	0.95	0.4
R^2	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.99	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	-	0.99
N	105	195	105	195	105	105	195	90	105	150	120	30	45

SUIVI LONG TERME ET EN CONDITIONS HYDRODYNAMIQUE CONTROLEES DE BIOFILMS ANODIQUES ALIMENTES A L' AIDE D'EAUX USEES

Annexe 4A : Exemple de chutes de pH lors de la période de suivi et impact de la mise en recirculation du réacteur sur le pH et la quantité d'électricité produite par les bio-anodes polarisées

Des chutes de pH en sortie de réacteur ($\text{pH} < 7$) corrélées à une diminution brutale de la quantité d'électricité surviennent à la suite de certains renouvellements d'alimentation. Un exemple de changement d'alimentation au jour 228 du suivi (phase 6) est montré sur la Figure A4 1.

Afin de ramener le pH à sa valeur nominale de 7,6 (valeur moyenne au cours de l'expérimentation), l'alimentation a été arrêtée et le réacteur mis en recirculation (boucle fermée) pour chacune de ces périodes (Figure S1, à partir du jour 230). Le retour au pH nominal (Figure A4 1B) s'accompagne d'un rétablissement progressif de la quantité d'électricité (Figure A4 1A). L'alimentation a été systématiquement renouvelée à la fin de la mise en recirculation du réacteur.

Lors de ces périodes de mise en recirculation en boucle fermée, différentes hypothèses peuvent être émises quant aux remontées de pH observées, à savoir la consommation d'espèces acides tels que des produits d'hydrolyse (acides gras volatils) qui pourraient s'être formés et accumulés dans le réacteur, ou la consommation d'oxygène dissous qui se serait introduit en trop grande quantité dans le réacteur à cause d'une fuite ou lors du renouvellement de l'alimentation et dont le transfert serait amélioré par les plus grandes vitesses de rotation, et ce, malgré un bullage à l'azote du tank d'alimentation. Des mesures complémentaires seraient nécessaires pour caractériser précisément ces phénomènes.

La Figure A4 1 permet aussi de rendre compte de l'effet court terme du bullage à l'azote sur les valeurs de courant et de pH au sein du réacteur, responsable des variations périodiques répétées de ces deux variables. La mise en route du bullage est associée à des pics de courant et de pH qui retournent progressivement aux valeurs pré-bullage après son arrêt.

Les variations liées au bullage d'azote pourraient être expliquées par un strippage (ou désorption) des gaz dissous tels que l'oxygène, pouvant s'être infiltrés dans le réacteur, ou le dioxyde de carbone produit biologiquement. Rappelons qu'aucun tampon pH n'a été rajouté à l'alimentation, et que par conséquent le pouvoir tampon du système est fortement influencé par l'alcalinité de l'eau décantée employée (non-mesurée) en comparaison à des études en milieu synthétiques avec ajout de tampon phosphate (Jones and Buie, 2019; Torres et al., 2009).

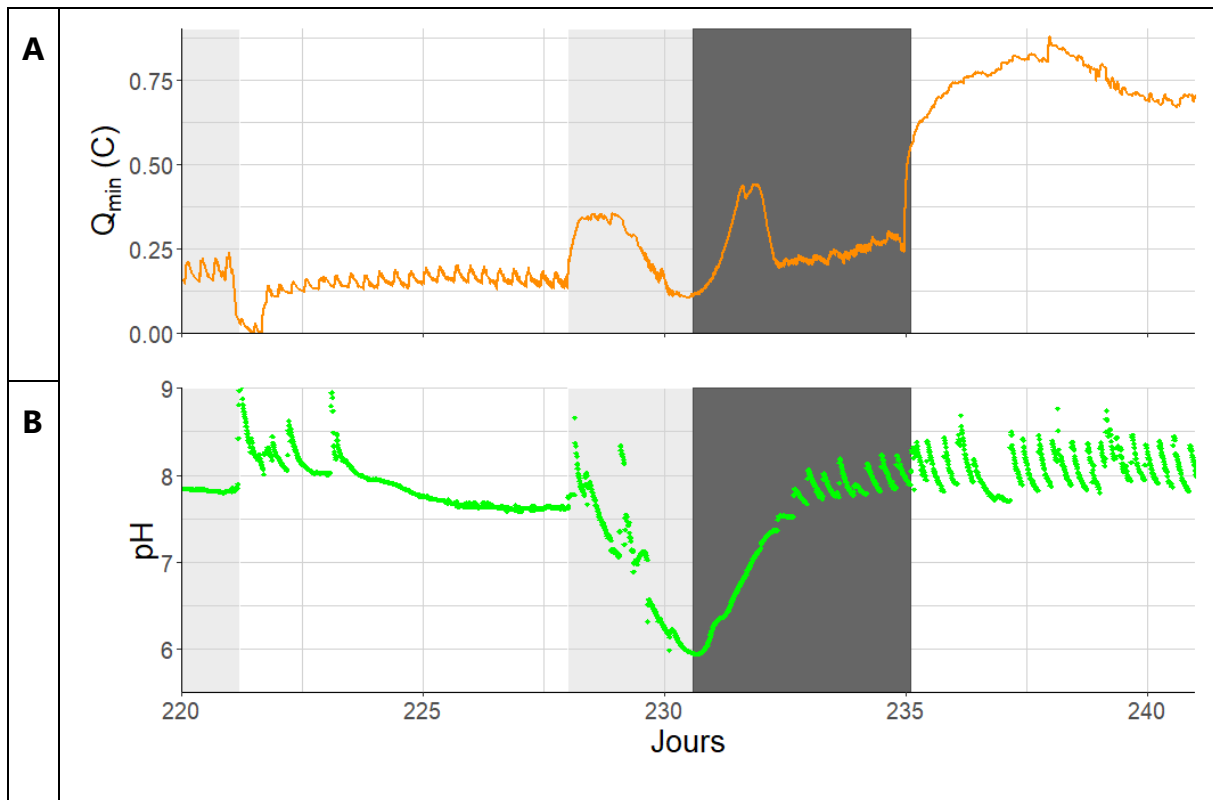


Figure A4 1: Evolution de A) la quantité d'électricité produite par minute et B) du pH dans le réacteur lors des périodes de recirculation.

Cas spécifique du jour 220 au jour 240 (2,4 Pa).

Annexe 4B : Détail du calcul du bilan d'oxygène en considérant le réacteur de Couette-Taylor exposé à l'air ambiant.

Equation du bilan de la concentration d'oxygène dans un bioréacteur :

$$\frac{dC}{dt} = K_L a (C^* - C) - Q_{O_2} [X] + \frac{C_{TA}}{\bar{t}} \quad (\text{A } 1)$$

où dC/dt la variation de la concentration d'O₂ au cours du temps (gO₂.L⁻¹.j⁻¹), $K_L a$ le coefficient de transfert volumétrique d'O₂ à la surface libre liquide/gaz du réacteur ramené au volume liquide (j⁻¹), C^* la concentration d'O₂ dissout à saturation (gO₂.L⁻¹), C la concentration d'O₂ dissout (gO₂.L⁻¹), Q_{O_2} la vitesse spécifique de consommation d'O₂ par la biomasse (gO₂.g[X]⁻¹.j⁻¹), $[X]$ la concentration en biomasse (g[X].L⁻¹), C_{TA} la concentration d'O₂ dans le tank d'alimentation (gO₂.L⁻¹) et \bar{t} le temps de séjour hydraulique (j).

Hypothèses réalisées :

- Valeur de $K_L a$ prise égale à 2 j⁻¹ (Schulthess and Gujer, 1996), aucune étude de la littérature ne renseigne sur les valeurs de $K_L a$ en fonction de la vitesse de rotation par rapport à la surface libre en réacteur de Couette-Taylor et sa valeur a été pondérée par Ω/Ω_{100RPM} pour rendre compte de l'effet de la vitesse de rotation sur le transfert.
- Valeur de C^* prise égale à 9 mg.L⁻¹
- Transfert maximal de l'O₂ de la phase liquide au substrat ($C = 0$)
- DCO consommée uniquement par l'électrode ou convertie en O₂ par la biomasse ($1 \text{ gO}_2 = \frac{1}{0,4} \text{ gDCO}$) (Henze, 1995)
- Pas d'introduction dans le système *via* l'alimentation grâce au bullage du tank ($C_{TA} = 0$)

L'étude de dC/dt montre que la vitesse de transfert de l'O₂ est inférieure à la vitesse de consommation de l'oxygène par la biomasse sur la durée de l'expérimentation (Figure A4 2). Elle ne peut pas expliquer complètement l'hypothèse de la consommation de la biomasse due à des entrées d'O₂ dans le réacteur, et d'autres mécanismes sont donc en œuvre.

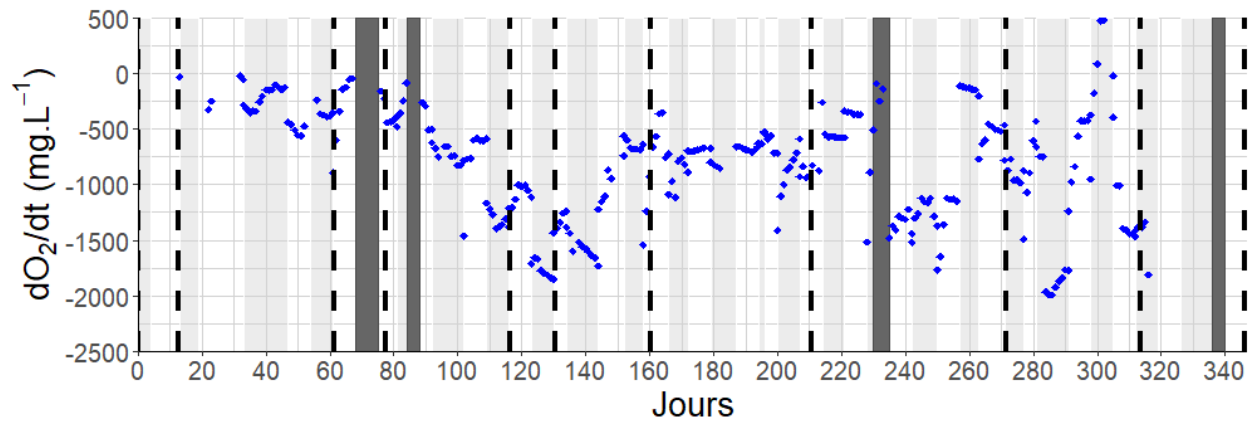


Figure A4 2 : Evolution de la concentration d'O₂ consommée par la respiration par rapport au transfert lié à un apport considéré maximal par la surface libre du liquide.

Annexe 4C : Analyse des courbes issues des mesures par voltammétrie cycliques pour des bio-électrodes spécifiques

CV des électrodes polarisées à -300 mV/ECS pour le palier de contrainte de cisaillement de 2,4 Pa

Le potentiel de -300 mV/ECS donne deux allures de courbe de CV différentes. En effet, deux pics de limitation par la diffusion semblent apparaître (Figure A4 3). Un pic correspondant à l'acétate vers -0,2 V/ECS (Pic 1) et un second pic vers 0,1 V/ECS (Pic 2), potentiellement révélateur d'un autre couple redox identifié aussi sur les autres répliques à -300 mV/ECS. La nature du couple redox mis en œuvre n'a cependant pas été identifiée précisément. Il pourrait s'agir d'une oxydation incomplète de l'acétate (formiate) ou d'un couple totalement différent (composé azoté, soufré...). Une caractérisation moléculaire serait nécessaire pour valider ces hypothèses.

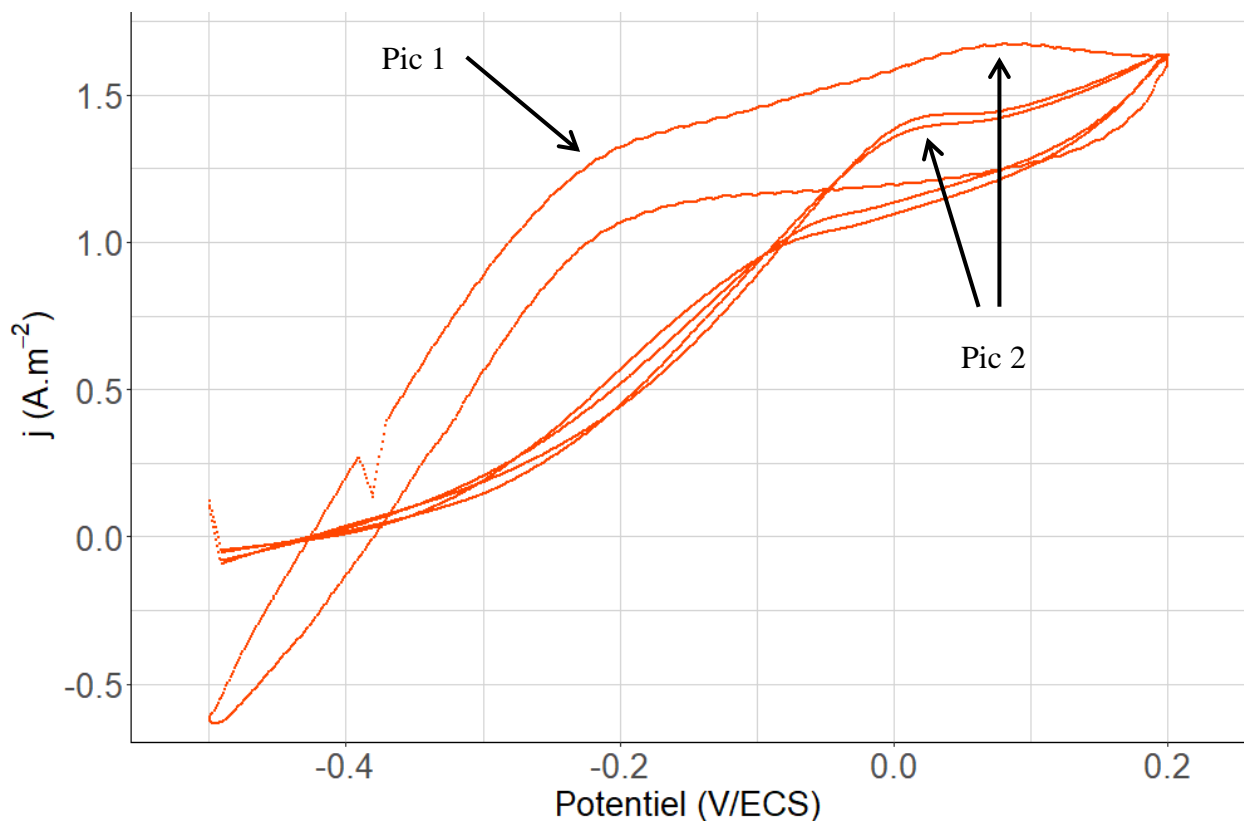


Figure A4 3 : CV des électrodes polarisées à -300 mV/ECS au jour 271 (2,4 Pa).

CV des électrodes non-polarisées laissées en OCP (Open Circuit Potentiel) pour le palier de contrainte de cisaillement de 2,4 Pa

Les CV des électrodes laissées en circuit ouvert représentent une condition contrôle, permettant un développement de biofilm sans potentiel appliqué. Logiquement, aucune catalyse électrochimique ne devrait alors être observée. Cependant, la contrainte de 2,4 Pa révèle un pic de limitation par diffusion (Figure A4 4) et donc une catalyse électrochimique mais avec une valeur de densité de courant limite plus faible que pour les autres électrodes polarisées. Son apparition et sa disparation rapide (pas de pics observés pour les autres contraintes de cisaillement) rendent compte d'un phénomène ponctuel, nécessitant plus de résultats pour comprendre sa cause.

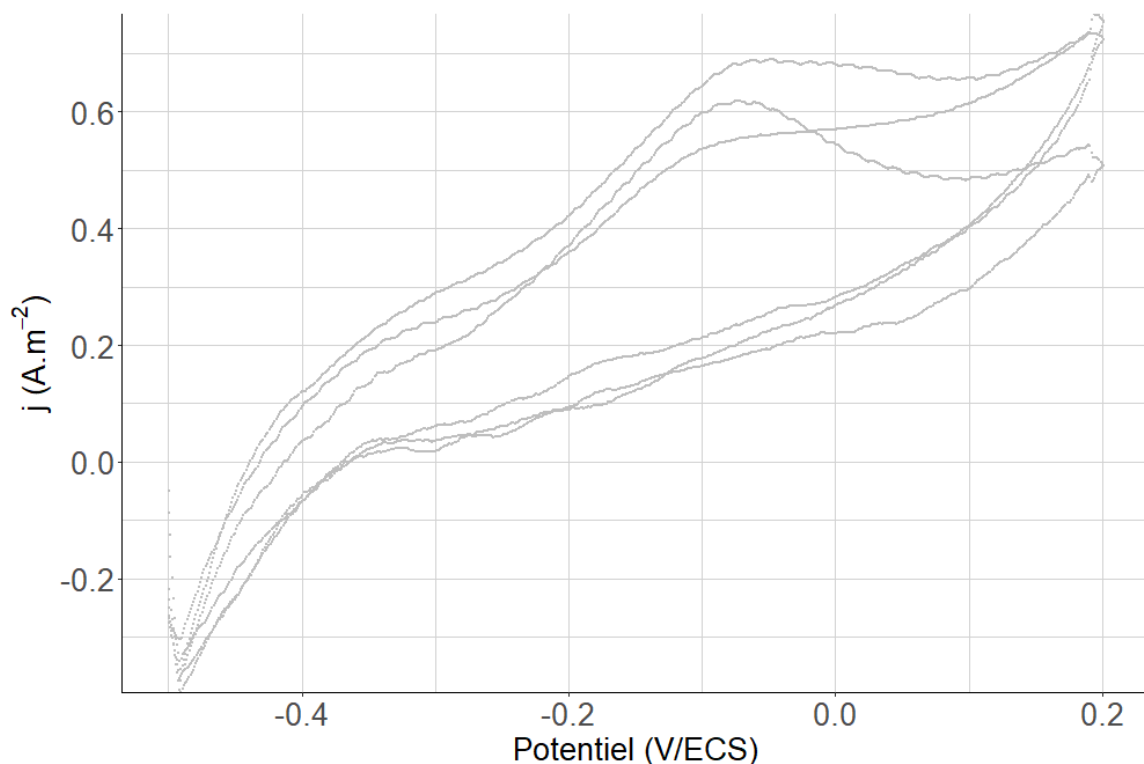


Figure A4 4 : CV des électrodes non-polarisées laissées en OCP au jour 271 (2,4 Pa).

Annexe 4D : Valeurs des p values correspondant aux tests de Wilcoxon effectués pour la comparaison des distributions des valeurs de densités de courants moyennes des CA et limites des CV de la Figure 17.

Afin de comparer les distributions des valeurs issues des CA et CV un test de Wilcoxon a été effectué entre chaque valeur de potentiel. Les données utilisées pour les CA ont été les courants mesurés chaque minute pour chaque réplica des jours 77 à 347. Pour les CV, les données ont été obtenues en considérant les courants limites des plateaux d'oxydation et à défaut les courants maximums pour les 8 prélèvements effectués des jours 77 à 347 de chaque triplica.

Table A4 1 : Résultats des p-valus issues des tests de Wilcoxon réalisés pour les comparaisons des distribution par potentiel des densités de courants mesurées sur les CA.

NS pour non-significatif.

CA	-300 mV/ECS	-150 mV/ECS	0 mV/ECS	150 mV/ECS
-300 mV/ECS		0,018	NS	<0.001
-150 mV/ECS	0,018		0,016	<0.001
0 mV/ECS	NS	0,016		<0.001
150 mV/ECS	<0.001	<0.001	<0.001	

Table A4 2 : Résultats des p-valus issues des tests de Wilcoxon réalisés pour les comparaisons des distribution par potentiel des densités de courants limites extraites des CV.

NS pour non-significatif.

CV	-300 mV/ECS	-150 mV/ECS	0 mV/ECS	150 mV/ECS	OCP
-300 mV/ECS		NS	NS	0,03	0,05
-150 mV/ECS	NS		NS	NS	NS
0 mV/ECS	NS	NS		NS	NS
150 mV/ECS	0,03	NS	NS		NS
CP	0,05	NS	NS	NS	