

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة سعيدة ,د. مولاي طاهر

Université Saida ,Dr. MOULAY Tahar



كلية العلوم الطبيعية و الحياة

Faculté des Sciences de nature et de la vie

قسم البيولوجيا

Département de Biologie

**Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master**

En Sciences biologiques

**Spécialité : Microbiologie Appliquée**

**Intitulé :**

**Contribution à la création d'un prototype d'une biopile**

**Microbienne**

Présenté par :

1. Melle : Adjir Fatima Zohra.
2. Melle : Mazouzi zouaouia

Soutenu le :

Devant le jury composé de :

Président

Mr. Benabbou Taha  
Ahmed

MCA Université  
USMT

Examineur

Mr. Bellil Yahia

MCA Université  
USMT

Rapporteur

Mr. Benreguieg Mokhtar

Pr Université  
USMT

Corapporteur

Mr. Sahabi Toufik

MCA Université USMT

Année universitaire 2023/2024

## Dédicace

*Je dédie ce travail à mon père. Belaid*

*Que je n'ai jamais eu la chance de connaître, mais dont l'absence a façonné ma vie. Ton esprit et ton héritage vivent en moi et me motivent chaque jour.*

*Je dédie ma mère Tedjini Moulete*

*Pour son amour inconditionnel et son soutien indéfectible en l'absence de mon père. Tu as toujours été mon pilier, et c'est grâce à toi que j'ai pu surmonter les défis de la vie. Merci pour tout ce que tu as fait pour moi.*

*La personne la plus chère à mon cœur mon frère Boumediene qui est donne de l'amour du soutien et du confort tout au long de mes études.*

*Mes chers frères: Bouanani, Mohamed, Abd el wakil pour son engagement indéfectible.*

*Toute ma famille: Mazouzi et Tedjini.*

*Ma chère sœur et binôme « FATHMA » et toute sa famille Merci ma chérie pour l'amitié et tous les moments agréables que nous avons passés ensemble.*

*Tous mes amis: Karima, Imane, Nesrine, Naïma, Amouna ....et tous ceux qui me sont chers et que j'ai omis de citer Et sans oublier mes enseignants qui m'ont soutenu durant toutes mes années d'études.*

*Hayat*

---

## *Dédicace*

*A l'aide de dieu tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie, j'ai pu réaliser ce travail qui je dédie :*

*A la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur; maman Amina que j'adore.*

*A mon père Bentabet, l'homme d'exception, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir*

*A mes charmantes sœurs: LiNa et Dania Le secret de la joie dans ma vie.*

*A mes très chers frères Mohamed , Thamer, Anes , Tarek, Abd el malek , Thabe , Foucef , Imade , Islame , que dieu les protèges.*

*A ma famille : Adjir , Sadri, Sadek.*

*A mon très cher fiancé Maamer Sadak,*

*Son soutien moral, sa gentillesse sans égal, son profond attachement m'ont permis de réussir mes études.*

*Je cite en particulier: Ma chère copine et binôme*

*Hayat, pour sa patience envers mes crises, sa gentillesse et sa compréhension, merci pour cette belle amitié*

*A mes amis: Nabila , Sarah, wedad , fatima, faiza*

*A mes docteurs: Dr . Mostefai Mohamed el Amine et Dr . Rahmani. H.*

---

*A ma grand-mère, mes oncles et mes tantes. Que Dieu leur donne une longue et joyeuse vie.*

*A tous les cousins, les voisins et les amis que j'ai connu jusqu'à maintenant. Merci pour leurs amours et leurs encouragements.*

*Une dédicace supplémentaire*

*Je vous aime trop.*

*Fatima zohra*

---

## *Remerciement*

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

*Nous tenons à remercier nos encadrants, Mr .Benregeuig Mokhtar pour nous avoir donné l'opportunité de travailler sur ce projet, pour leur grand soutien scientifique et moral, pour les conseils, les suggestions et les encouragements qu'ils nous ont apportés tout au long de la réalisation de ce mémoire.*

*Nous tenons à remercier Dr .Sahabi Toufik, MCA également de la faculté des Sciences, Département de physique pour sa disponibilité et pour toute sa gentillesse et sa serviabilité.*

*Je remercie Mr Hammad Ahmed, technicien au laboratoire.*

*Nous voudrions également remercier les membres du jury qui nous ont fait L'honneur d'évaluer notre travail.*

*Nous voudrions aussi exprimer notre vive reconnaissance envers tous les enseignants du département de Microbiologie.*

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

---

## Liste des abréviations

CO : mono-oxyde de carbone CO<sub>3</sub> carbonate

SOFC : pile à combustible à oxyde électrolyte solide

Mv : milli volt

PAFC: Pile à combustible à acide phosphorique

PEMFC : Pile à Combustible à Membrane Echangeuse de Protons

AFC : Pile à combustible alcaline API: Appareillage et Procédé d'Identification

CH<sub>4</sub>: Méthane

GN : Gélose nutritive

LB:Luria Bertani

VF: viande fois

ONPG : Ortho-Nitro-Phényl-Galactopyranoside

VP : La réaction de Voges Proskauer

TDA: Tryptophane désaminase

ODC : Ornithine décarboxylase

LDC : Lysine décarboxylase

ADH : Arginine dihydrolase.

H<sub>2</sub>S Sulfure d'hydrogène

GLU: Glucose

MAN: Mannitol

SAC: Saccharose

SOR: Sorbitol

RHA: Rhamnose

INO: Inositol

MEL: Melibiose

AMY: Amygdaline

EA: Electro actif

% : pour cent

KOH: Hydroxyde de potassium

CO<sub>2</sub> : Dioxyde de carbone

°C: degré Celsius

---

**Liste des tableaux**

<b>Tableau1</b> : les types de piles à combustible.....	9
<b>Tableau2</b> : Facteurs environnementaux et microbiologiques influençant l'attachement microbien et la structure du biofilm.....	29
<b>Tableau3</b> : composition du milieu de culture LB.....	37
<b>Tableau4</b> : la mesure du courant électrique en volt pendant 8jours.....	51
<b>Tableau5</b> : Caractéristiques macroscopiques des colonies bactériennes.....	57
<b>Tableau 6</b> : résultat des plaques API20E , des deux espèces bactériennes sélectionnées.....	60



## Liste des figures

<b>Figure 1:</b> L'expérience de Sir William Grove /Club PAC/.....	2
<b>Figure 2 :</b> Projet Gemini .....	2
<b>Figure 3:</b> schéma de fonctionnement d'une pile à combustible .....	4
<b>Figure 4 :</b> Les éléments constituent la pile à combustible.....	5
<b>Figure 5 :</b> Schémas de piles à combustible .....	18
<b>Figure 6 :</b> Schéma de fonctionnement d'une pile à combustible microbienne.....	19
<b>Figure 7:</b> Évolution du nombre d'articles scientifiques sur les piles à combustible microbiennes.....	20
<b>Figure 8 :</b> Représentation des mécanismes de transfert d'électrons direct via les cytochromes chez <i>G. sulfurreducens</i> vers l'anode .....	21
<b>Figure 9 :</b> les différents modèles de flux d'électrons le long de nanofils microbiens.....	22
<b>Figure 10 :</b> Transfert d'électrons via les pilli chez <i>Geobactersulfurreducens</i> .....	22
<b>Figure 11 :</b> Représentation schématique du mécanisme de transfert d'électrons entre une bactérie et une électrode via des médiateurs endogènes.....	23
<b>Figure 12 :</b> Représentation schématique du mécanisme de transfert d'électrons indirect entre une bactérie et une électrode via des médiateurs exogènes.....	24
<b>Figure 13 :</b> Schéma du mécanisme indirect de transfert d'électrons par l'oxydation d'un produit du métabolisme bactérien.....	25
<b>Figure 14 :</b> Les 5 étapes de maturation d'un biofilm.....	28
<b>Figure15 :</b> Respiration de Fe (III) par <i>Shewanellaspp</i> .....	34
<b>Figure16 :</b> Culture des souches dans le bouillon LB.....	37
<b>Figure17:</b> les deux électrodes utilisées dans le montage.....	38
<b>Figure18 :</b> le montage général des électrodes de la pile microbienne.....	39
<b>Figure19 :</b> Millimètre utilisé pour la mesure du courant électrique.....	39
<b>Figure20 :</b> Aspect du lixiviat du fumier de cheval.....	40

---

<b>Figure21</b> : Prototype d'une biopile à combustible microbienne montée au niveau du laboratoire .....	41
<b>Figure22</b> : présentation de la galerie API 20 E.....	44
<b>Figure23</b> : Observation de souche d'Escherichia Coli après coloration de Gram sous microscope optique.....	48
<b>Figure24</b> : Observation de souche clostridium butyrique après coloration de Gram sous microscope optique .....	49
<b>Figure25</b> : Différence de potentiel mesures en fonction du temps de la biopile.....	53
<b>Figure26</b> : Aspect des colonies dans la gélose Hektoen après L' incubation.....	56
<b>Figure27</b> : Aspect microscopique de l'espèce bactérienne HAV après la coloration de Gram.....	57
<b>Figure28</b> : Aspect microscopique de la souche HAO après la coloration de Gram.....	58
<b>Figure29</b> : exemple d'un résultat de la recherche de la catalase( résultat (+)).....	59
<b>Figure30</b> : Résultats des galeries API 20 E après l'incubation.....	61

---

## Résumé

Les piles à combustible microbienne sont des piles capables de convertir l'énergie chimique de combustibles organiques, directement en énergie électrique. Dans ces piles, l'oxydation du combustible est assurée par des micro-organismes dits "électro-actifs" qui forment des biofilms à la surface de l'anode et jouent le rôle de catalyseur des réactions électrochimiques.

Les travaux qui font l'objet de ce manuscrit ont eu pour objectif de créer un prototype de biopile microbienne à un seul compartiment, aussi simple et économique que possible, en utilisant le lixiviat de fumier de cheval comme source de biocatalyseur. La conception et la mise en marche de cette pile à combustible microbienne, nous a généré une énergie électrique ayant un potentiel qui a atteint la valeur de 40mV. Donc, ce résultat nous a confirmé l'existence d'un biofilm qui a été formé sur la bio anode de la pile.

Afin de mettre en évidence la nature de ce biofilm, une analyse microbiologique servant à l'identification de la communauté microbienne électro-chimiquement active associée à l'anode de la biopile, a été entreprise. Les résultats obtenus ont révélé l'existence, dans le lixiviat du fumier de cheval, deux souches bactériennes, à savoir :

E coli qui est déjà connu par son pouvoir électro-actif et *Providencia rettgeri*.

**Mot clés:** pile à combustible microbienne, membrane, biofilm, bio anode, bactérie électro-active.

## Table des matières

<b>Liste des abréviations.....</b>	<b>I</b>
<b>Liste des tableaux.....</b>	<b>III</b>
<b>Liste des figures .....</b>	<b>IV</b>
<b>Résumé.....</b>	<b>VI</b>
<b>Introduction</b>	
<b>Chapitre I. Généralités sur la technologie des piles à combustible</b>	
I. Historique.....	1
I.2. Définition d'une pile à combustible.....	3
I.3. Principe de fonctionnement.....	3
I.4. Les éléments constituant la pile à combustible.....	4
I.4.1:Les électrodes.....	5
I. 4.2:Les catalyseurs.....	5
I.4.2.1:A l'anode.....	5
I.4.2.2:A l'anode A la cathode.....	6
I. 4.2.3:A l'anode L'électrolyte .....	6
I.4.3:Les plaques bipolaires .....	7
I.5. Différents types de pile à combustible.....	8
I.5. 1: Pile à combustible à électrolyte polymère (PEMFC) .....	10
I.5. 2:Pile à Combustible Alcaline (AFC).....	10
I.5.3: Pile à Combustible à Acide Phosphorique (PAFC)... ..	11
I.5. 4: Pile à combustible à carbonate fondu (MCFC).....	12
I. 5. 5:Pile à combustible à oxyde solide (SOFC).....	12
I.6. Applications des piles à combustible.....	13

---

I.6.1:Applications fixes.....	13
I.6.2:Télécommunications.....	13
I.6.3:Usines de traitement des eaux usées et de certaines boissons.....	14
I.6.4: Dans le domaine des transports.....	14
I.6.5:Avions.....	15
I.6.6:Bateaux.....	15
I.6.7:Unités d'alimentation auxiliaires (APU).....	15
I.6.8:Alimentation portable.....	15
I.6.9:Micro-équipement électrique.....	15
I.6.10: Dans le domaine des turbines à gaz.....	16
I.7: Les piles à combustible biologiques (PCB).....	17
I.7.1. Généralité.....	17
I.7.2. Fonctionnement.....	17
I.7.3. Types de PCB.....	17
I.8: Notions sur les piles à combustible microbiennes PCMs.....	17
I.9. Principe de fonctionnement de la pile à combustible microbienne.....	18
I.10.Les mécanismes de Transfert des électrons.....	19
I.10.1. Le transfert direct.....	20
I.10.2. Le transfert indirect des électrons.....	23
a) Transfert indirect d'électrons par les médiateurs endogènes .....	23
b) Transfert indirect d'électrons par les médiateurs exogènes.....	23
I.10.3. Transfert d'électrons par l'oxydation d'un produit issu du métabolisme bactérien.....	25
I.11:Constituants des piles microbiennes.....	25
A_ Electrodes.....	26

---

B_ Résistance externe.....	26
C_ membrane.....	26
D_ Anolyte.....	26
E_ catholyte.....	26
 <b>Chapitre II. Les Biofilms</b>	
II.1. Introduction .....	27
II.2. Définition .....	27
II.3. La formation d'un biofilm .....	27
II.3.1:Attachement initial.....	28
II.3.2:Attachement irréversible.....	28
II.3.3: La colonisation.....	28
II.3.4: Maturation.....	29
II.3.5: La dispersion du biofilm.....	29
II.4: Les Facteurs environnementaux et microbiologiques influençant l'attachement microbien et la structure du biofilm.....	29
II.5. Intérêts et avantages du biofilm pour les microorganismes.....	30
II. 5.1:Les aspects négatifs des biofilms .....	31
II. 5.2:Les aspects positifs des biofilms.....	32
II.6. Les biofilms électro actifs (EA).....	33
II. 6.1: Le transfer intracellulaire.....	33
II. 6.2:Les transferts extracellulaires d'électrons.....	33
II.7. Le quorum sensing.....	35
 <b>Chapitre III. Matériel et méthodes</b>	
III.1. Objectif de travail .....	36
III.2. Les souches bactériennes. ....	37

---

III.2.1:Choix des matériaux, souches et milieu .....	37
III.2.2:Le milieu .....	37
III.3.recherche des souches microbiennes productrice d'électricité.....	37
III.3.1.Revivification.....	37
III.3.2:le repiquage.....	38
III.3.3: Identification morphologique .....	38
III.3.4: Isolement des souches bactériennes et culture en aérobiose.....	38
III.4. Préparation des bocaux.....	39
III. 5. Préparation des électrodes .....	39
III.5.1: Le montage nécessite l'utilisation de deux électrodes.....	39
III.6. L'architecture de la pile microbienne Piles à combustible microbienne.....	40
III.7. source du biocatalyseur de la biopile microbienne.....	42
III.8. Préparation du lixiviat.....	42
III.9. Analyse microbiologique .....	44
III. 9.1:Isolement des souches bactériennes électro active.....	44
III.9.2:Purification de souches bactériennes.....	44
III. 9.3:Identification de souches bactériennes.....	44
III.9.3.1:Aspect macroscopique.....	44
III.9.3.2:Aspect microscopique: Coloration de Gram.....	45
III.9.3.3:Caractérisation biochimique des isolats.....	45
III.9.3.3.1: Mise en évidence d'enzyme respiratoire : Catalase.....	45
a) Principe.....	45
b) Mode opératoire.....	45
III.9.3.3.2:Caractérisation des souches par la galerie API 20 E.....	45
a) Principe.....	45

b) Technique de préparation de la galerie.....	46
c) Préparation de l'inoculum.....	46
d) Inoculation de la galerie.....	47
e) Lecture et interprétation.....	47
<b>Chapitre IV. Résultats et discussion</b>	
IV.1. Étude macroscopique et microscopique des souches bactériennes.....	48
IV.1.1.: Étude macroscopique de souche A2.....	48
IV.1.2: Étude microscopique de souche A2.....	48
IV.1.3: Étude macroscopique de souche Cg_F.....	49
IV.1.4: Étude microscopique de souche Cg_F.....	49
IV.2. Résultats obtenu.....	51
IV.3. Justification des résultats négatifs de l'expérience.....	52
IV.4. lancement de la biopile fonctionnant avec le lixiviat de fumier de cheval..	53
IV.5. Etude microbiologique de la biopile fonctionnant avec le lixiviat de fumier de cheval.....	56
IV.5.1: Isolements et purifications des espèces bactériennes électro-active.....	56
IV. 5.2: Caractérisations phénotypiques des isolats.....	56
IV.5.2.1: Aspect macroscopique .....	56
IV.5.2.2. Aspect microscopique .....	57
a- Résultats de la coloration de Gram pour les colonies vertes en aérobiose.....	57
b- Résultats de la coloration de Gram pour les colonies jaunes saumon en aérobiose.....	58
IV. 5.3: Caractéristiques biochimiques des isolats .....	58



IV.5.3.1:Mise en évidence d'enzyme respiratoire.....	58
IV. 5.4:Résultats des plaques API 20 E.....	59
<b>Conclusion générale</b> .....	63
<b>Annexe</b> .....	65
<b>Référence Bibliographique</b> .....	68

Partie

*Bibliographique*

## **Introduction :**

Depuis longtemps notre consommation d'énergies primaires disponibles dans la nature, telles que le pétrole, le charbon et le gaz, ne cesse d'augmenter. Cette énorme croissance énergétique résultant de l'explosion démographique et du boom économique des pays émergents (Chine, Inde, Brésil, etc.) conduit à un épuisement de ces sources d'énergie non renouvelables. Même les réserves d'uranium, source de l'énergie nucléaire, seront épuisées d'ici quelques dizaine d'années (dans environ 60 ans). De plus, ces énergies sont polluantes ; le pétrole et le gaz rejettent le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) dans l'air et contribuent à l'effet de serre. Cette pollution atmosphérique serait à l'origine des changements climatiques. Quant à l'énergie nucléaire, elle pose encore plus de problèmes puisqu'elle est dangereuse et nous menace de contaminations radioactives.( Fritz Dufour, (2018)).

Pour lutter contre l'effet de serre, et pour prévoir le remplacement du pétrole, le développement de nouvelles énergies renouvelables est devenu une priorité à l'échelle des nations . Le développement des piles à combustible (PAC) est une composante majeure des nombreuses technologies mises en œuvre ces dernières années dans le domaine des énergies renouvelables pour satisfaire les besoins en énergie électrique tout en limitant la pollution. (Jean-Baptiste, (2003)).

Une pile à combustible (PAC) peut être définie comme un système électrochimique qui permet de convertir l'énergie chimique d'un combustible (espèce réduite) et d'un comburant (espèce oxydée) et la transformer en énergie électrique. La production d'électricité est possible grâce à l'échange d'électrons issus des réactions électrochimiques d'oxydo-réduction favorables aux électrodes. Le combustible réducteur s'oxyde à l'anode et les électrons issus de cette oxydation circulent à travers un circuit électrique externe vers la cathode où ils se combinent à un oxydant, généralement l'oxygène, qui est réduit.( Lachaize, J. (2004)).

Cependant, Grove ne découvre le principe de fonctionnement de la pile à combustible qu'en 1839 . En 1953, Francis Thomas Bacon propose une pile à combustible hydrogène/oxygène fonctionnant à haute pression . A la fin des années 1960, il est possible de fabriquer des piles à combustible d'une puissance de 15 kW (alimentant notamment un modèle de tracteur Allis- Chalmers ). L'intérêt de la pile à combustible est alors tel que la

NASA l'intègre à ses projets Gemini puis Apollo. Mais, en raison du coût très élevé des matériaux qui la composent, elle n'a jamais été commercialisée et est donc peu connue du grand public. (SELLALI, Mehdi).

Les grands constructeurs automobiles possèdent leur prototype de véhicule à hydrogène, que ce soit à combustion directe (BMW) ou à pile à combustible (GM, PSA, Nissan, Daimler Chrysler, Toyota, Honda, etc).

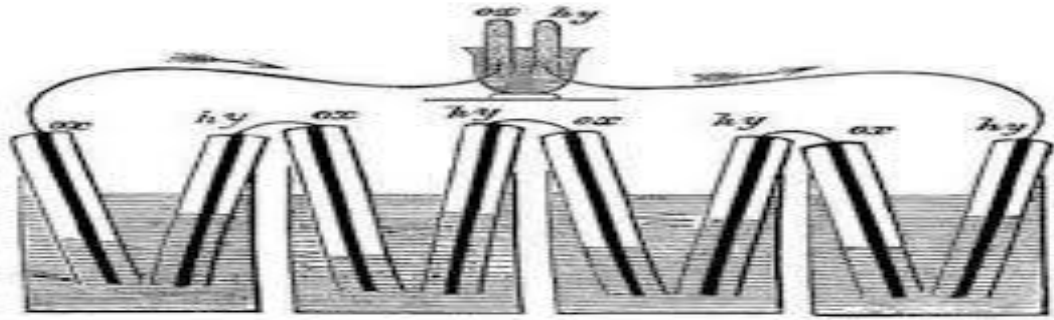
L'objectif de ce mémoire est de créer un prototype de biopile microbienne à un seul compartiment, aussi simple et économique que possible, en utilisant le lixiviat de fumier de cheval comme source de biocatalyseur.

## Généralités sur la technologie des piles à combustible

### I.1.Historique:

La découverte du principe de la pile à combustible remonte à 1839. Toutefois elle ne resta pendant de nombreuses années qu'une simple curiosité scientifique, son utilisation n'étant alors pas une nécessité. Cette découverte s'est effectuée en plusieurs étapes. En effet, à la période des précurseurs succéda un relatif abandon de près d'un siècle avant une « redécouverte » vers la fin du 20<sup>e</sup> siècle de cette technique, relancée par les préoccupations environnementales liées à l'aggravation de l'effet de serre. Le premier pas vers la pile à combustible a été réalisé en 1806 par le chimiste et physicien anglais Sir Humphry Davy qui en réalisant l'électrolyse de l'eau pure obtient distinctement de l'hydrogène et de l'oxygène dont il constate qu'ils sont les seuls produits. L'électrolyse de l'eau consistant, à l'aide d'un courant électrique (décomposer l'eau en hydrogène et oxygène gazeux), certains scientifiques se sont alors intéressés à effectuer le processus inverse afin de générer un courant électrique à partir de l'hydrogène et de l'oxygène. Néanmoins, la découverte du principe de la pile à combustible n'intervient qu'en 1839 quand le scientifique suisse Christian Friedrich Schönbein observe en réalisant une électrolyse que lorsqu'il coupe l'alimentation, les produits donnent lieu pendant quelques secondes à un courant électrique de sens inverse à celui appliqué pour réaliser l'expérience. (SALLEMINE Heythem).

En 1839, lors d'une conférence scientifique à Birmingham, Schönbein rencontre l'avocat et chimiste anglais Sir William Robert Grove qui travaillaient à l'époque sur les batteries électriques. Par la suite, les deux hommes entretiennent une correspondance et mettent en commun leurs découvertes. Ceci débouche sur la célèbre expérience de Grove avec une pile à combustible: il s'agissait d'une cellule hydrogène-oxygène avec des électrodes de platine poreux et de l'acide sulfurique comme électrolyte. Nous sommes en 1845, Grove génère un courant sur le principe inverse de l'électrolyse de l'eau, c'est la première pile à combustible. (Pickup, I., & Baron, P. (1998)).



**Figure 1:**L'expérience de Sir William Grove /Club PAC/. (Prado, S. S. (2022)).

Par la suite, la pile à combustible resta plus ou moins en latence durant près d'un siècle et après quelques légères améliorations par différents scientifiques du début du 20ème siècle, c'est Francis T. Bacon qui en 1935 enclenche le progrès le plus important en réalisant un prototype de pile à combustible remplaçant l'électrolyte acide par un électrolyte alcalin. L'avantage de ce dernier est d'être moins corrosif pour les électrodes. Cette pile à combustible aboutira en 1953 sur la création d'un premier générateur électrique de 1kW. Le principe physique est établi, des dizaines de laboratoires et d'industriels vont se lancer dans les piles à combustible. Néanmoins les coûts restant très élevés, ils sont un obstacle important à son utilisation, hormis pour la NASA qui peut se permettre de tels investissements. Ainsi elle l'utilise, avec succès, comme générateur électrique pour les missions Gemini et Apollo en 1963 et 1968. (SALEM, M. M., & HOUARI, M).



**Figure 2:**Projet Gemini.

Dans les années 1980 alors que les États-Unis et le Japon vont poursuivre de manière très active leurs recherches, l'Europe (à l'exception de l'Allemagne) va se désintéresser de ces travaux. Ainsi, depuis sa découverte la pile à combustible a connu de nombreuses améliorations (perfectionnement des électrodes, optimisation de la température de fonctionnement ...), mais le principe reste le même.( Tasso, G. (1995)).

### ***1.2. Définition d'une pile à combustible:***

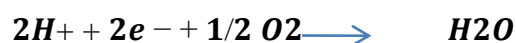
Une pile à combustible est un générateur électrochimique d'énergie qui permet de transformer de l'énergie chimique en énergie électrique et en énergie thermique. Un générateur électrochimique est un générateur de tension continue et rechargeable. Parmi toutes les piles à combustible, nous avons choisi d'étudier la pile à combustible à hydrogène. Une pile à hydrogène est composée de dihydrogène et de dioxygène. Le dioxygène est une molécule composée de deux atomes d'oxygène, notée O<sub>2</sub>. Et le dihydrogène est une molécule comportant deux atomes d'hydrogène, de formule chimique H<sub>2</sub>. (Saisset, R. (2004)).

### **1.3. Principe de fonctionnement:**

La pile à combustible est un générateur fonctionnant grâce à l'oxydation de l'hydrogène sur une électrode associée à la réduction de l'oxygène sur l'autre électrode. La pile à combustible a besoin seulement de l'hydrogène et l'oxygène pour son fonctionnement. Dans le côté de l'anode l'hydrogène se décompose selon la demi réaction (l'oxydation de l'hydrogène).



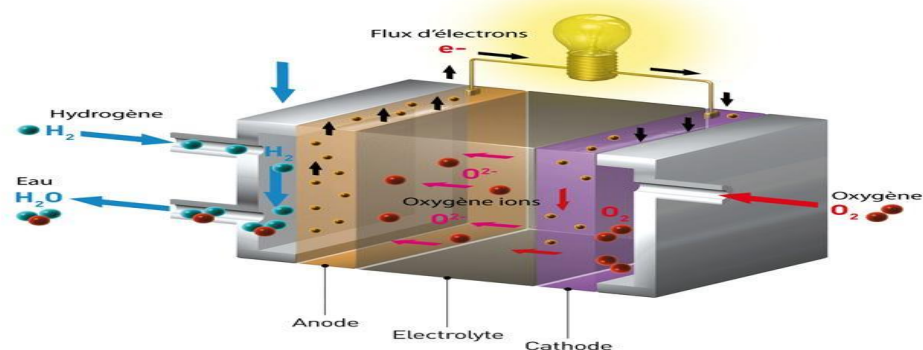
Il y a libération de deux électrons qui vont circuler dans l'électrode vers la charge extérieure. Les ions hydrogène H<sup>+</sup> ou proton vont migrer vers la cathode à travers l'électrolyte. Les électrons passent ensuite par le circuit extérieur et arrivent à la cathode. Dans le côté de la cathode l'oxygène se décompose selon la demi réaction (la réduction de l'oxygène):



En séparant ces deux demi-réactions pour un électrolyte non conducteur d'électrons. Les électrons libérés par la décomposition de l'hydrogène passent par le circuit extérieur, par contre les ions H<sup>+</sup> (les protons) peuvent traverser l'électrolyte. Le bilan global de la réaction se produisant dans une pile à combustible est:



L'eau formé est un liquide dans les conditions normales de température et de pression (0°C et 1 atm ou 273K et 1013 hpa) Comme le montre dans la figure 3 suivante.



**Figure 3:** schéma de fonctionnement d'une pile à combustible (Thounthong, P. (2005)).

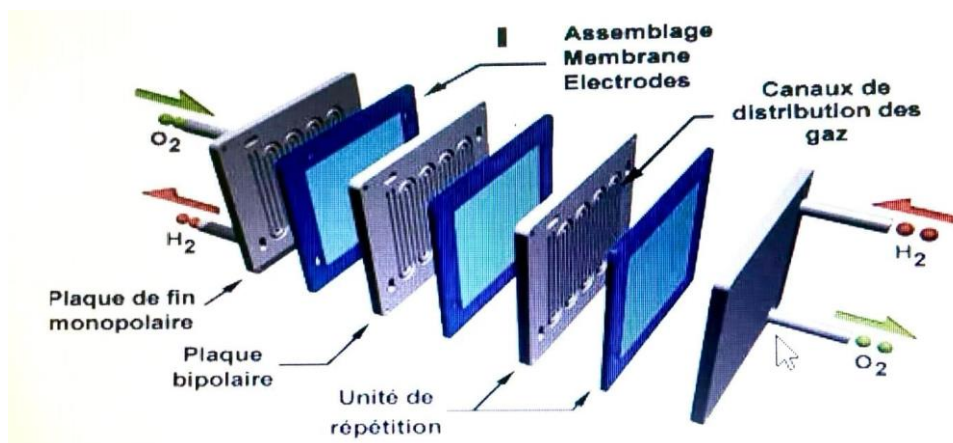
Les électrolytes peuvent être liquides ou solides, certains fonctionnent à haute température et d'autres à basse température tendent à exiger des catalyseurs en métal noble, typiquement du platine, destiné à améliorer les réactions aux électrodes.

En principe, pour le fonctionnement de la pile à combustible on utilise un assortiment de carburants et d'oxydants. L'hydrogène a été reconnu comme le carburant le plus efficace parce qu'il a la plus haute réactivité électrochimique que les autres carburants, tels que les hydrocarbures ou les alcools. L'oxygène est le meilleur oxydant grâce à sa haute réactivité et son abondance dans l'air. (BENHAKKOU, Hidayat Allah et ABID, Katar Nada ).

#### ***1.4. Les éléments constituant la pile à combustible:***

Chaque type de pile a sa structure géométrique propre figure (I.2,) cependant les composants principaux restent les mêmes. Le cœur de la pile est constitué des électrodes, l'électrolyte (La membrane), des backings (couche de diffusion entourant les électrodes) et des plaques bipolaires L'eau formé est un liquide dans les conditions normales de température et de pression (0°C et 1 atm ou 273K et 1013 hpa) Comme le montre la figure 4 suivante:





**Figure 4:** Les éléments constituent la pile à combustible .( Hankache, W. (2008)).

L'agencement exact de ces composants entre eux ainsi que la nature des composants dépend du type de pile. Leur rôle reste cependant le même.

#### **I.4.1: Les électrodes:**

Les électrodes sont le siège des réactions électrochimiques : une oxydation à l'anode et une réduction à la cathode. Ces réactions dépendent de plus de l'état de surface des électrodes et de la facilité avec laquelle les réactions se réalisent. Pour que l'hydrogène (ou tout autre carburant) soit oxydé, un catalyseur est nécessaire. De même pour l'oxygène, il a pour rôle de faciliter les échanges électroniques. Une température plus élevée permettrait en théorie de faciliter ces échanges, mais cela impose des contraintes sur les matériaux. Les électrodes qui transportent les ions et les électrons sont le lieu des réactions. Par conséquent, ces éléments doivent être poreux, conducteur et posséder une grande surface d'échange.(Touahir, A. (2008) ).

#### **I.4.2: Les catalyseurs:**

##### **I.4.2.1: A l'anode:**

Pour les piles de basse et moyenne température, on utilise des métaux précieux : platine Pt, rhodium Rh, ruthénium Ru ou palladium Pd; ou du Nickel de Raney .Les métaux précieux sont répartis sur les électrodes en charbon actif à très grande surface spécifique (noir d'acétylène). Actuellement on utilise surtout du platine : celui-ci est réparti sous forme de particules de faible taille (2 nm). La réaction de dissociation de l'hydrogène est assez complexe. Ces électrodes sont très sensibles au CO et au soufre, ce qui constitue un vrai problème si on utilise de l'hydrogène issu du reformage, on assiste alors à une diminution de la densité de courant surfacique et donc de la puissance. De nombreux

travaux portent actuellement sur le remplacement du platine jugé trop cher ou la diminution de la quantité nécessaire : alliages de platine (Pt/Ru, Pt/Mb, Pt/Sn), Pour les piles de haute température, on peut utiliser des métaux moins chers (Fer, Nickel, Cobalt) afin d'éviter le problème d'empoisonnement au CO.(Dadda, B. (2015)).

#### **I.4.2.2:A l'anode A la cathode:**

Pour les piles de basse et moyenne température, on utilisera aussi des métaux précieux et certains métaux de transition usuels (Chrome, Nickel), ou bien du charbon actif avec de l'or ou de l'argent. Pour les piles de haute température, on peut utiliser soit du Nickel fritté ou des oxydes mixtes. La réaction de l'oxygène est aussi assez complexe. (Mahcene, H. (2012)).

#### **I.4.2.3:A l'anode L'électrolyte:**

Varie en fonction du type de pile : KOH pour les piles AFC, membrane échangeuse d'ions pour les PEMFC ou les DMFC, acide phosphorique pour les PAFC, carbonates fondus pour les MCFC et oxydes solides pour les SOFC. Il permet que les ions (et pas les électrons) transitent de l'anode vers la cathode. Ces électrolytes déterminent la température de fonctionnement de la pile. Les caractéristiques de chaque type de pile sont leur conductivité ionique, leur étanchéité aux gaz, leur stabilité face aux réactifs chimiques, leurs propriétés mécaniques. A cela s'ajoute d'autres contraintes selon le type de pile, le niveau de la température, les composants des gaz, les espèces ioniques passant à travers l'électrolyte ainsi que les conditions de pression. Quant à l'électrolyte, il doit être dense et imperméable aux différents gaz utilisés. L'imperméabilité aux gaz est nécessaire pour éviter tout contact entre l'oxygène et l'hydrogène qui serait préjudiciable au bon fonctionnement de la cellule. L'électrolyte est également un bon conducteur ionique pour assurer la migration des ions. En revanche, il ne doit pas conduire les électrons pour ne pas mettre la pile en court-circuit en créant un contact électrique entre l'anode et la cathode.(Ouagueni, F. (2021)).

**I.4.3:Les plaques bipolaires:**

Ces plaques sont accolées aux supports De l'anode et de la cathode. Elles ont, aussi plusieurs rôles.

**a)Rôles:**

Canaliser les gaz venant de l'extérieur.

Collecter le courant.

Gérer les flux d'eau.

Généralement en graphite, ces plaques doivent être conductrices du courant, mais aussi permettre une diffusion homogène des gaz jusqu'aux électrodes ainsi qu'intervenir dans la gestion de l'eau à évacuer ou à apporter pour humidifier (pour les piles de type PEMFC).

Elles doivent être résistantes aux agressions du milieu (acide ou basique) et aussi être imperméables aux gaz réagissant (sous peine de provoquer un court-circuit chimique).

La structure de ces ensembles est intéressante : des canaux y sont gravés pour permettre le passage des réactifs. Réalisés par usinage, ils sont très chers.

A ces composants essentiels qui forment le cœur de la pile s'ajouteront ensuite des auxiliaires nécessaires au bon fonctionnement. Il s'agit des réservoirs pour le carburant et l'eau, du compresseur pour l'air, de l'humidificateur, des pompes pour le carburant et l'eau, des échangeurs de chaleur pour refroidir la pile, de l'onduleur pour transformer le courant continu.(Escard, J. G. (1918) ).

**I.5. Différents types de pile à combustible:**

Une variété de piles à combustible est à différents stades de développement. La classification la plus courante des piles à combustible est celle du type d'électrolyte utilisé dans les piles et comprend :

- 1) la pile à combustible à électrolyte polymère (PEFC).
- 2) la pile à combustible alcaline ( AFC).
- 3) la pile à combustible à acide phosphorique (PAFC).
- 4) la pile à combustible à carbonate fondu (MCFC) .
- 5) pile à combustible à oxyde solide (SOFC).

En gros, le choix de l'électrolyte dicte la plage de température de fonctionnement de la pile à combustible. La température de fonctionnement et la durée de vie utile d'une pile à combustible dictent les propriétés physico-chimiques et thermomécaniques des matériaux utilisés dans les composants de la cellule (c'est-à-dire les électrodes, l'électrolyte, l'interconnexion, le collecteur de courant, etc.). La température de fonctionnement joue également un rôle important dans la détermination du degré de traitement du carburant requis. Dans les piles à combustible à basse température, tout le carburant doit être converti en hydrogène avant d'entrer dans la pile à combustible. De plus, le catalyseur de l'anode des piles à combustible à basse température (principalement du platine) est fortement empoisonné par le CO. Dans les piles à combustible à haute température, le CO et même le CH<sub>4</sub> peuvent être convertis en hydrogène ou même en interne directement oxydé électrochimiquement. Le (tableau 1 ) donne un aperçu des principales caractéristiques des principaux types de piles à combustible.

**Tableau1** : les types de piles à combustible.(Riviere, E. (2016)).

	PEMFC	AFC	PAFC	MCFC	SOFC
Électrolyte	Membrane es échange ses d'ions polymère s hydratées	Hydroxyde de potassium mobilisé ou immobilisé dans une matrice d'amiante	Acide Phosphorai que Liquide Immobilisé dans Sic	Carbonate e fondu liquide immobilise ai dans LiAlO2	Pérovskites (céramique
Électrodes	carbone	Métaux de transition	carbone	Nickel et oxyde de nickel	Pérovskite et pérovskite / cermet métallique
Catalyseur	platine	platine	Platine	Matériau d'électrode	Matériau d'électrode
Interconnexion	Carbone ou métal	Métal	Graphite	Acier inoxydable ou nickel	Nickel, céramique ou acier
Température de fonctionnement	40 – 80 °C	65°C – 220 °C	205 °C	650 °C	600-1000 °C
Porteur de charge	H+	OH-	H+	CO3-	O-
Reformeur externe pour carburants hydrocarbures	oui	oui	Oui	Non, pour certain carburant s	Non, pour certains carburants et conceptions de cellules
Conversion par déplacement externe du CO en hydrogène	Oui, plus purification n pour éliminer les traces de CO	Oui, plus purification pour éliminer le CO et le CO2	Oui	Non	Non
Composants de la cellule principale	À base de carbone	À base de carbone	À base de graphite	À base d'inox. Céramique e	À base d'inox. Céramique e
Produit Gestion de l'eau	Évapora tif	Évapora tif	Évapora tif	Produit gazeux	Produit gazeux
Product Heat Management	.Process Gas + Liquid Cooling Medium.	Gaz de procédé + circulation d'électrolyte	Gaz de procédé + Milieu de refroidiss ement liquide ou génératio n de vapeur	Reformag e interne + gaz de procédé	Reformag e interne + gaz de procédé

**I.5. 1: Pile à combustible à électrolyte polymère (PEMFC):**

L'électrolyte de cette pile à combustible est une membrane échangeuse d'ions (polymère d'acide sulfonique fluoré ou autre polymère similaire) qui est un excellent conducteur de protons. Le seul liquide dans cette pile à combustible est l'eau. En règle générale, les électrodes en carbone avec électro-catalyseur en platine sont utilisées à la fois pour l'anode et la cathode et avec des interconnexions en carbone ou en métal. La gestion de l'eau dans la membrane est essentielle pour des performances efficaces ; la pile à combustible doit fonctionner dans des conditions où elle ne s'évapore pas plus vite qu'elle n'est produite car la membrane doit être hydratée. En raison de la limitation de la température de fonctionnement imposée par le polymère, généralement inférieure à 100 °C, mais plus généralement autour de 60 à 80 °C, et en raison de problèmes de l'équilibre hydrique, un gaz riche en H<sub>2</sub> avec peu ou pas de CO (un poison à basse température) est utilisé. Une charge de catalyseur plus élevée (Pt dans la plupart des cas) que celle utilisée dans les PAFC est nécessaire pour les deux anodes et cathode. Un traitement approfondi du carburant est nécessaire avec d'autres carburants, car l'anode est facilement empoisonnée par des niveaux même infimes de CO, d'espèces soufrées et d'halogènes. Les PEMFC sont recherchées pour une grande variété d'applications, en particulier pour l'alimentation principale des piles à combustible des véhicules (FCV). En raison du grand intérêt pour les FCV et l'hydrogène, l'investissement dans le PEMFC au cours des dernières années, dépasse facilement tous les autres types de piles à combustible combinés. Bien qu'un développement significatif du PEMFC pour les applications stationnaires ait eu lieu, de nombreux développeurs se concentrent sur les applications automobiles et portables. (Yasser, D., Auger, F., Wang, Z., & Shao, L. (2023, July)).

**I.5. 2: Pile à Combustible Alcaline (AFC):**

L'électrolyte de cette pile à combustible est concentré (85 % en poids) de KOH dans les piles à combustible fonctionnant à haute température (~250 °C), ou moins concentré (35 à 50 % en poids) de KOH pour des fonctionnements à température ((~250 °C), ou moins concentré (35 à 50 % en poids) de KOH pour des fonctionnements à température (<120 °C). L'électrolyte est retenu dans une matrice (généralement de l'amiante) et une large gamme d'électro-catalyseurs peut être utilisée (par exemple, Ni, Ag, oxydes métalliques, spinelles et métaux nobles). L'approvisionnement en combustible est limité

---

aux constituants non réactifs à l'exception de l'hydrogène. Le CO est un poison et le CO<sub>2</sub> réagira avec le KOH pour former du K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, modifiant ainsi l'électrolyte. Même la petite quantité de CO<sub>2</sub> dans l'air doit être considérée comme un poison potentiel pour la pile alcaline. Généralement, l'hydrogène est considéré comme le combustible préféré pour l'AFC, bien que certaines piles à combustible à carbone direct utilisent des électrolytes alcalins (différents). L'AFC a été l'une des premières piles à combustible modernes à être développée, à partir de 1960. L'application à l'époque était de fournir de l'énergie électrique à bord du véhicule spatial Apollo. L'AFC a connu un succès considérable dans les applications spatiales, mais son application terrestre a été mise au défi par sa sensibilité au CO<sub>2</sub>. Pourtant, certains développeurs aux États-Unis et en Europe poursuivent l'AFC pour les applications mobiles et à système fermé (pile à combustible réversible). (Lamy, C., & Léger, J. M. (1994)).

### **I.5. 3:Pile à Combustible à Acide Phosphorique (PAFC):**

L'acide phosphorique, concentré à 100 %, est utilisé comme électrolyte dans cette pile à combustible, qui fonctionne généralement entre 150 et 220 °C. À des températures plus basses, l'acide phosphorique est un mauvais conducteur ionique et l'empoisonnement au CO de l'électro-catalyseur au Pt dans l'anode devient grave. La stabilité relative de l'acide phosphorique concentré est élevée par rapport aux autres acides courants, par conséquent, le PAFC est capable de fonctionner à l'extrémité supérieure de la plage de température de l'acide (100 à 220 °C). De plus, l'utilisation d'acide concentré (100 %) minimise la pression de vapeur d'eau, de sorte que la gestion de l'eau dans la cellule n'est pas difficile. La matrice la plus couramment utilisée pour retenir l'acide est le carbure de silicium, et l'électro-catalyseur à la fois dans l'anode et la cathode est le Pt. Les PAFC sont principalement développés pour des applications stationnaires. Aux États-Unis et au Japon, des centaines de systèmes PAFC ont été produits, vendus et utilisés dans des tests et des démonstrations sur le terrain. C'est encore l'un des rares systèmes de pile à combustible disponibles à l'achat. Le développement du PAFC avait ralenti au cours des dix dernières années, au profit des PEMFC dont on pensait qu'ils avaient un meilleur potentiel de coût. Cependant, le développement du PAFC se poursuit. (Baril, J., Max, J. J., & Chapados, C. (2000)).

---

**I.5. 4: Pile à combustible à carbonate fondu (MCFC):**

L'électrolyte de cette pile à combustible est généralement une combinaison de carbonates alcalins, qui est retenue dans une matrice céramique de  $\text{LiAlO}_2$ . La pile à combustible fonctionne à 600 à 700 °C où les carbonates alcalins forment un sel fondu hautement conducteur, les ions carbonates assurant la conduction ionique. Aux températures de fonctionnement élevées des MCFC, le Ni (anode) et l'oxyde de nickel (cathode) sont adéquats pour favoriser la réaction. Les métaux nobles ne sont pas nécessaires au fonctionnement et de nombreux hydrocarbures courants peuvent être reformés en interne. Le développement du MCFC s'est concentré sur les applications stationnaires et marines plus importantes, où la taille et le poids relativement importants du MCFC et le temps de démarrage lent ne sont pas un problème. Les MCFC sont pour une utilisation avec une large gamme de carburants conventionnels et renouvelables. La technologie de type MCFC est également envisagée pour DCFC. Après le PAFC, les MCFC ont été démontrés le plus largement dans les applications fixes, avec des dizaines de projets. Alors que le nombre de développeurs MCFC et le niveau d'investissement sont réduits, le développement et les démonstrations se poursuivent. (Lachichi, A. (2005)).

**I.5. 5:Pile à combustible à oxyde solide (SOFC):**

L'électrolyte de cette pile à combustible est un oxyde métallique solide et non poreux, généralement du  $\text{ZrO}_2$  stabilisé au  $\text{Y}_2\text{O}_3$ . La cellule fonctionne à 600- 1000 °C où la conduction ionique par les ions oxygène a lieu. Typiquement, l'anode est en cermet Co- $\text{ZrO}_2$  ou Ni- $\text{ZrO}_2$ , et la cathode est en  $\text{LaMnO}_3$  dopé au Sr. Au début, la conductivité limitée des électrolytes solides nécessitait un fonctionnement de la cellule à environ 1000 °C, mais plus récemment, les cellules à électrolyte mince avec des cathodes améliorées ont permis une réduction de la température de fonctionnement à 650-850°C. Certains développeurs tentent de pousser les températures de fonctionnement SOFC encore plus bas. Cela a permis le développement de SOFC compacts et performants qui utilisaient des matériaux de construction relativement peu coûteux. Des efforts concertés de développement de piles, en particulier par le biais du programme SECA du DOE américain, ont considérablement fait progresser les connaissances et le développement des SOFC planaires à électrolyte mince. Grâce à l'amélioration des performances, les SOFC sont désormais envisagées pour un large éventail d'applications, notamment la production



---

d'électricité stationnaire, l'alimentation mobile, l'alimentation auxiliaire pour les véhicules et les applications spécialisées.(Dumaisnil, K. (2015 ).

### **I.6. Applications des piles à combustible:**

Les piles à combustible ont d'abord été utilisées dans des applications spatiales, puis ont commencé à se développer et à se répandre davantage dans les cercles militaires, où les piles à combustible étaient alors utilisées comme source de secours en raison de leur grande fiabilité. Actuellement, tous les constructeurs automobiles commercialisent leurs nouveaux produits hybrides utilisant des piles à combustible, en plus de l'utilisation des piles à combustible, qui se répandent dans les bus, les trains, les avions et les mini vélos.

Les piles à combustible se sont également répandues dans de petites applications telles que les téléphones cellulaires, les ordinateurs portables et autres. La possibilité d'utiliser des piles à combustible pour alimenter les hôpitaux, les banques et les distributeurs de billets est en cours. Les applications des piles à combustible sont nombreuses, avec le développement de la technologie, les domaines de leur utilisation se multiplient.(Léger, J. M. (1994)).

#### **I.6.1:Applications fixes:**

Actuellement, plusieurs systèmes de piles à combustible ont été installés dans le monde dans des hôpitaux, des hôtels, des bureaux et des écoles, en plus d'utiliser des piles à combustible comme postes électriques connectés au réseau électrique public pour fournir un support au réseau ou des postes électriques indépendants dans zones difficiles à connecter au réseau. Les systèmes de pile à combustible fonctionnent à une efficacité de 15 % sans bruit et sans pollution de l'air. Lorsque les piles à combustible sont utilisées dans un système de cogénération où l'énergie thermique résultante est utilisée, l'efficacité peut être portée à 85 %.(Miraoui, A. (2009)).

#### **I.6.2:Télécommunications:**

Avec l'utilisation croissante des ordinateurs, d'Internet et des réseaux de communication, la nécessité d'une plus grande source fiable est apparue L'eau formé est un liquide dans les conditions normal de température et dépression (0C° et 1 atm ou 273K et 1013 hpa) .

Les piles à combustible ont prouvé que leur fiabilité peut être remplacée. Quant aux économies réalisées avec les piles à combustible pour fournir une puissance allant jusqu'à 5

kW, elles sont silencieuses et respectueuses de l'environnement, et elles peuvent être conçues pour être durable, c'est-à-dire qu'elles peuvent résister aux conditions météorologiques environnantes. Elles sont actuellement utilisées comme source d'alimentation principale ou comme source de support dans les tours cellulaires et les nœuds de commutation et de télécommunications.(Lejeune, E. (2023).

#### **I.6.3: Usines de traitement des eaux usées et de certaines boissons:**

Des piles à combustible sont désormais installées dans les usines de traitement des eaux usées du monde entier et cette technologie s'est avérée efficace pour réduire les émissions car elle utilise le gaz méthane de ces sites comme combustible. Il a également été installé dans plusieurs usines de production de certaines boissons.(Lefèvre, G. (2004).

#### **I.6.4: Dans le domaine des transports:**

- **Bus** : Au cours des dernières années, beaucoup de bus à pile à combustible ont été utilisés en Europe, en Amérique du Nord et du Sud, en Asie de l'Est et en Australie. Le haut rendement des piles à combustible en plus des très faibles polluants car l'hydrogène est produit à partir de sources renouvelables a considérablement amélioré la qualité de l'air, en particulier dans les zones considérées comme l'une des plus polluées au monde comme la Chine.(Rousseau, I. (2018)).

- **Vélos moteur** : Malgré leur petite taille, de nombreux vélos moteurs sont considérés comme polluant l'air, leurs gaz d'échappement sont très polluants par rapport à leur petite taille. Il produit du monoxyde de carbone et des hydrocarbures en quantités similaires à celles d'un camion diesel. Par conséquent, les vélos moteurs qui fonctionnent avec des piles à combustible sont une solution appropriée pour des pays comme l'Inde et l'Asie où de nombreuses personnes utilisent des vélos moteur comme moyen de transport.(Rérat, P. (2018)).

#### **\_Ascenseurs et mécanismes de transport dans les usines Chariots élévateurs/Manutention:**

En plus de la fonction de réduction des émissions de gaz nocifs, les ascenseurs fonctionnant avec des piles à combustible se caractérisent par le fait qu'ils nécessitent beaucoup moins d'entretien que les mécanismes fonctionnant à l'électricité, car ils doivent recharger leurs batteries périodiquement ou les remplacer. Elles s'endommagent rapidement car le travail dans ce domaine doit être arrêté et redémarré rapidement et

fréquemment, de sorte que les piles à combustible sont considérées comme ayant d'excellentes performances et une sortie électrique stable, en plus de cela, elles ne souffrent pas de la chute de tension qui se produit. (Riopel, D. (1985)).

#### **I.6.5:Avions:**

L'attention est portée sur la technologie des piles à combustible qui alimentent militairement les avions en raison de leur faible bruit, de leur petite taille et de la possibilité de les utiliser dans les airs. L'une des plus grandes entreprises développant cette technologie est Boeing. La figure montre un avion allemand basé sur des piles à combustible survolant la ville de Hambourg L'eau formé est un liquide dans les conditions normal de température et dépression (0C° et 1 atm ou 273K et 1013 hpa) .(KY, J. R. (2021)).

#### **I.6.6:Bateaux :**

L'Islande s'est engagée à convertir sa vaste flotte de pêche pour utiliser les piles à combustible comme source d'alimentation auxiliaire à la fin de 2015 afin d'ouvrir la voie à l'ensemble de la flotte pour passer aux piles à combustible comme source principale. Les moteurs à pile à combustible sont plus efficaces que les moteurs à combustion, en plus de leurs autres avantages de réduction de la pollution .(Coriat, B., & Lantenois, C. (2011)).

#### **I.6.7:Unités d'alimentation auxiliaires (APU):**

Les camions transportent à bord de nombreux appareils électriques tels que des radiateurs, des climatiseurs, des ordinateurs, des téléphones, des réfrigérateurs et des micro-ondes. Pour faire fonctionner ces équipements lorsque le camion est à l'arrêt, le moteur doit être démarré .(Villani, P. (2019)).

#### **I.6.8:Alimentation portable:**

Les piles à combustible peuvent nous fournir de l'énergie là où le réseau électrique n'est pas disponible. Elles sont utilisées dans des situations d'urgence et dans des applications militaires. Elles sont plus efficaces que les batteries, durent plus longtemps et sont plus légères.(Hankache, W. (2008)).

#### **I.6.9:Micro-équipement électrique:**

Les piles à combustible sont l'une des sources d'énergie les plus appropriées pour les petits appareils électroniques en raison de leur petite taille et de leur capacité à générer une

grande quantité d'énergie électrique pour leur petite taille. Les piles à combustible sont désormais utilisées dans les téléphones portables, les ordinateurs portables, les montres et d'autres petites applications.

Les chargeurs proposés sur le marché permettent désormais de recharger l'ordinateur pour une autonomie une vingtaine d'heures et le téléphone portable pour une autonomie de trente jours. Ils ont également été utilisés dans les détecteurs de fumée, les alarmes et les caméras de surveillance. Beaucoup de ces équipements sont exposés chaque année à l'exposition sur les piles à combustible FC EXPO qui se tient chaque année à Tokyo. Sony a présenté un chargeur portable, qui est un appareil hybride entre une pile à combustible et une batterie au lithium. Toshiba a présenté, à travers le salon "Hanovre", le Notebook (ordinateur portable) équipé d'une mini pile à combustible, et il permet à l'appareil de fonctionner pendant une semaine entière sans s'arrêter sans assistance ni connexion à aucune autre source d'alimentation L'eau formé est un liquide dans les conditions normal de température et de pression ( $0\text{C}^\circ$  et 1 atm ou 273K et 1013 hpa) .(Thounthong, P. (2005)).

#### **I.6.10: Dans le domaine des turbines à gaz:**

Les turbines à gaz sont celles qui produisent le mouvement de rotation nécessaire pour faire tourner le générateur et ainsi générer de l'électricité, améliorant ainsi le rendement de l'électricité générée. Une étude publiée par le centre (BBC marketing/technology) a confirmé que les ventes de piles à combustible en 2003 atteignaient 1,3 milliard de dollars, alors qu'elles atteignaient 355 millions de dollars en 1998, soit une augmentation de 30 % et cela confirme la tendance à l'utilisation universelle des piles à combustible dans diverses applications. Par conséquent, la recherche s'oriente vers l'obtention de nouveaux matériaux pouvant être utilisés dans ces cellules au lieu de matériaux coûteux, et les travaux sont toujours basés sur le développement de cellules, la réduction de leur prix, de leur poids, de leur taille et l'augmentation de leur efficacité et de leur énergie, ils conviennent à de nombreuses applications et autres processus.(Amine, S. (2024)).

**I.7: Les piles à combustible biologiques (PCB):****I.7.1.Généralité:**

Les piles à combustible biologiques (PCB) constituent une technologie prometteuse pour la production d'énergie propre et durable.

Elles exploitent l'énergie chimique issue de la matière organique pour générer de l'électricité, contrairement aux piles à combustible classiques qui utilisent des combustibles comme l'hydrogène ou le gaz naturel. (Ressam, I. (2017)).

**I.7. 2. Fonctionnement :**

Les PCB se composent de deux électrodes, une anode et une cathode, séparées par une membrane.

Des biocatalyseurs, tels que des enzymes, sont présents sur les électrodes et permettent de dégrader la matière organique en composants plus simples. Cette dégradation génère des électrons qui circulent dans un circuit externe, créant ainsi un courant électrique. (Kuhn, V. (2015)).

**I.7.3 Types de PCB :**

Il existe différents types de PCB, classés selon le type de biocatalyseur utilisé :

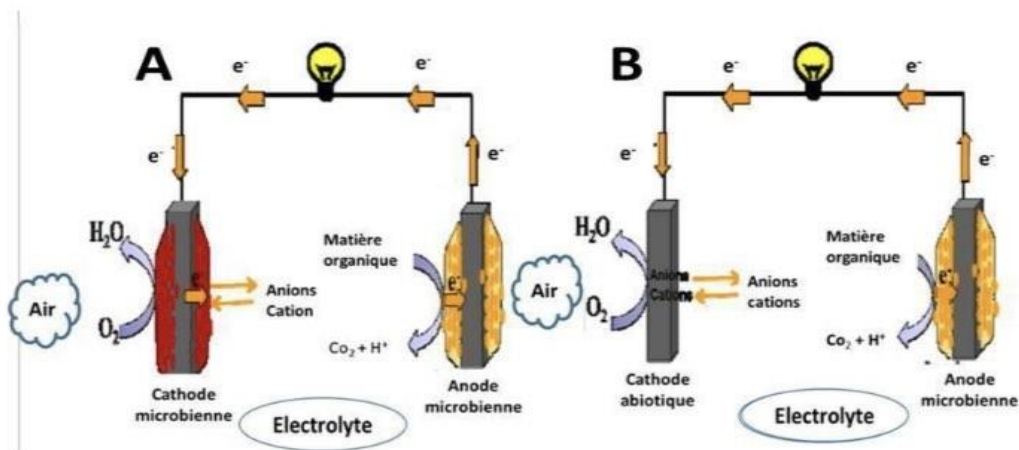
- PCB à enzymes: Elles utilisent des enzymes pour oxyder le combustible et générer des électrons.
- PCB à microbes: Elles exploitent des micro-organismes vivants pour dégrader la matière organique et produire de l'électricité.
- PCB à photosynthèse artificielle: Elles imitent le processus de photosynthèse naturelle pour convertir l'énergie lumineuse en électricité.
- PCB mitochondrie

**I.8:Notions sur les piles à combustible microbiennes PCMs:**

La pile à combustible microbiennes (PCM) est un dispositif électrochimique qui permet de transformer directement en énergie électrique, l'énergie chimique contenue dans des composés organiques ou inorganiques par une réaction d'oxydation (généralement la réaction anodique) assurée par des microorganismes, le plus souvent des bactéries (anode biologique) qualifiés d'exo-électrogènes. Ces bactéries sont organisées en biofilm à la

surface de l'anode qui représente un catalyseur électroactif (Adekunle, 2014 ; Benghernit, 2017 ; Dumas, 2007 ; Zhao et al. 2017).

Les piles à combustible microbienne peuvent être complètement microbiennes lorsque la catalyse des réactions aux deux électrodes se fait grâce à des microorganismes (Figure5A). ou semi microbiennes dans le cas où la catalyse à la cathode est réalisée par des catalyseurs minéraux (Figure5B).



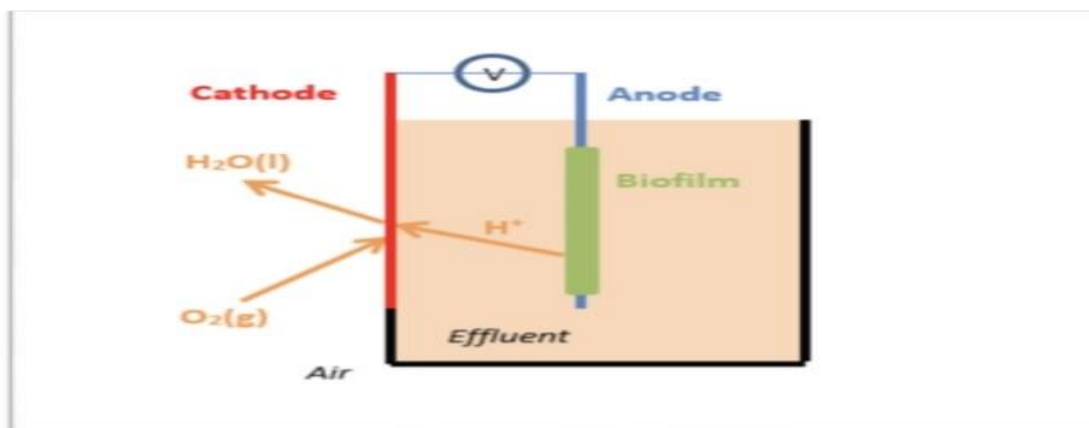
**Figure 5** : Schémas de piles à combustible.,

A : totalement microbienne

B : semi\_microbienne (Ketep, 2012).

### **I.9.Principe de fonctionnement de la pile à combustible microbienne :**

Le principe est similaire aux piles à combustibles à la différence de " l'utilisation de microorganismes comme catalyseurs." Ceux-ci forment un biofilm à l'anode (Figure6), et oxydent les matières organiques grâce à une propriété intéressante qui est celle de la respiration intracellulaire des microorganismes, processus leur permettant de subvenir à leur besoins énergétiques. Pendant la métabolisation, les substrats sont oxydés, produisant ainsi des électrons et des protons à l'intérieur de la bactérie. Ceux-ci sont par la suite éjectés de la cellule par une multitude de réactions complexe (les réactions de la chaîne respiratoire) et transférés ensuite à la cathode le lieu de la réduction soit de manière directe ou indirecte (Benghernit, 2016; Dumas, 2007 ; Ketep, 2012; Pierre et al., 2015).



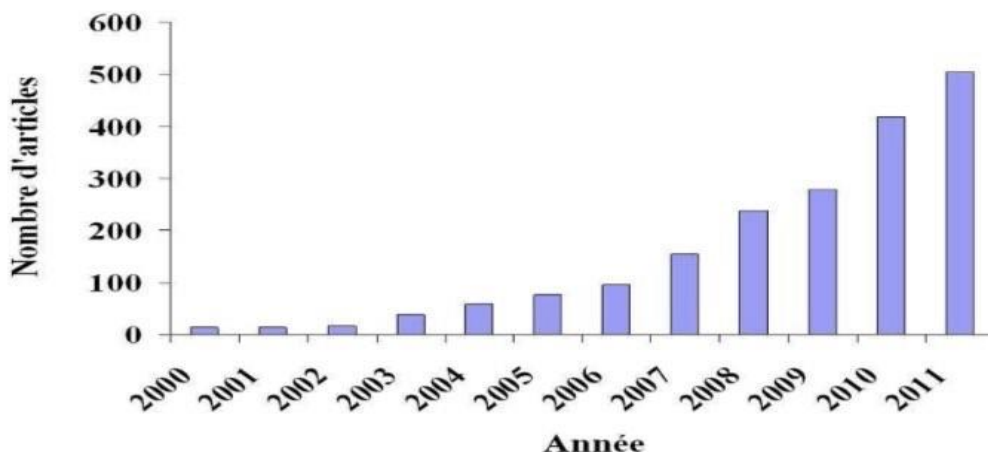
**Figure 6:** Schéma de fonctionnement d'une pile à combustible microbienne (Pierre étal., 2015).

Le biofilm est l'agrégation de ces microorganismes sur la surface de l'anode, qui dégrade le substrat.

Les protons libérés dans l'effluent se déplacent jusqu'à la cathode où ils sont consommés, pour produire de l'eau en présence de dioxygène.

#### **I.10. Les mécanismes de Transfert des électrons :**

La compréhension des mécanismes de transfert électronique entre la bactérie et l'électrode apparaît aujourd'hui comme essentielle dans le développement des piles à combustible microbiennes. Le nombre des articles de revue s'intéressant à ce sujet à la cour du 20<sup>ième</sup> siècle augmente chaque année. En 2011, 504 articles scientifiques ont été publiés par rapport aux 13 articles scientifiques en 2000 selon les données issues de Web of Knowledge. Donc Il faut noter que cette production scientifique qui augmente exponentiellement est un signe fort du nouvel engouement pour cette technologie (Figure 13) (Dumas, 2007; Pocaznoi, 2012).



**Figure 7:** Évolution du nombre d'articles scientifiques sur les piles à combustible microbiennes (Pocaznoi, 2012).

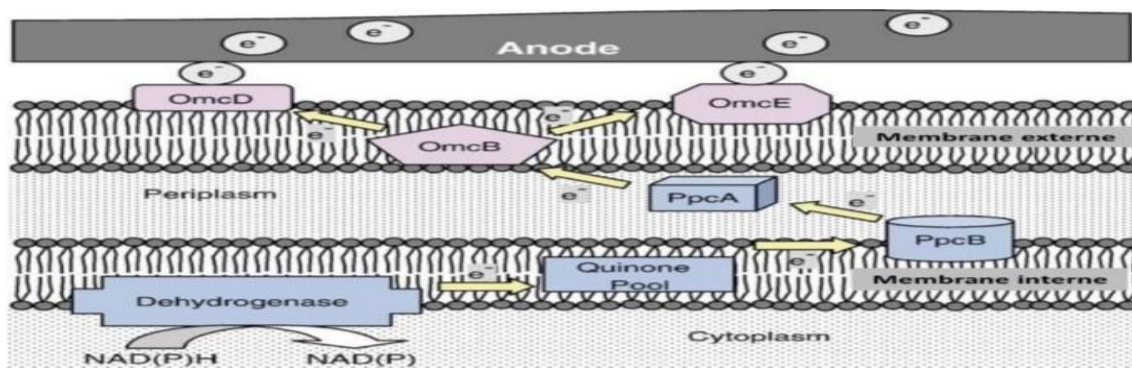
Le transfert d'électrons entre la bactérie et l'électrode peut se faire de manière directe, via les composants de la membrane cellulaire, ou de façon indirecte, soit par l'oxydation abiotique de produits issus de la fermentation biologique.

#### **I.10.1. Le transfert direct :**

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

Ce mécanisme de transfert direct via les cytochromes a été clairement démontré chez *Geobactersulfurreducens* (Figure8) grâce à des expériences réalisées avec des mutants pour lesquels le gène codant pour les cytochromes C a été délété ou surexprimé. Le fait que leur génome est parfaitement connu avait facilité l'expérience (Bergel, 2012 ; Dumas, 2007 ; Ketep , 2012; Oliot, 2017 ; Pocaznoi, 2012).

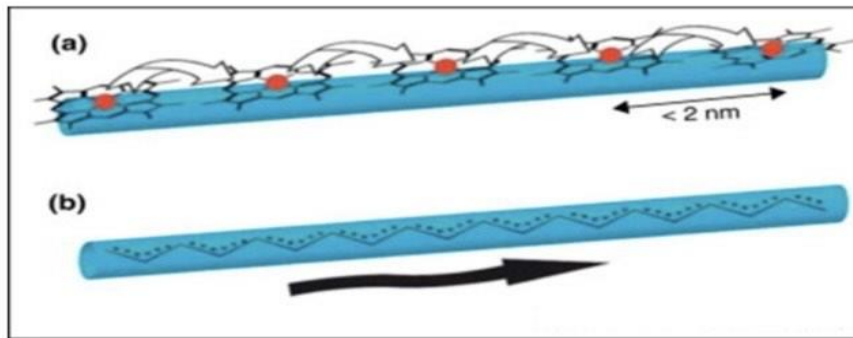




**Figure 8:** Représentation des mécanismes de transfert d'électrons direct via les cytochromes chez *G. sulfurreducens* vers l'anode (Bergel, 2012).

OmcB, OmcD, OmcE : les cytochromes de type C; PpcA, PpcB : les cytochromes périplasmique.

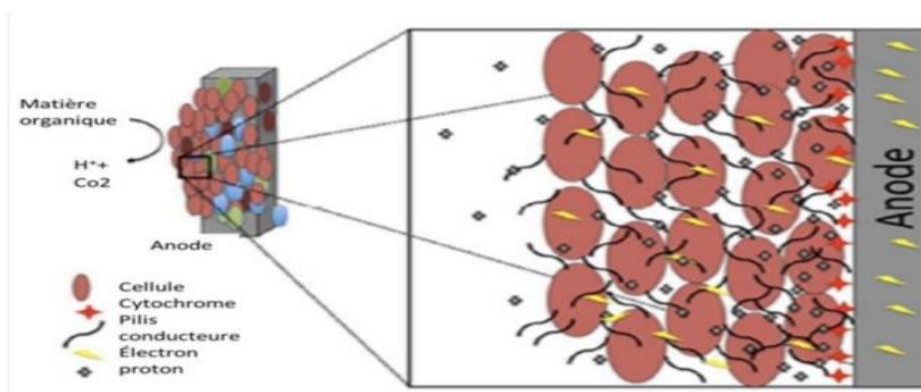
En 2005 un nouveau mécanisme de transfert direct a été décrit. Il s'agit de celui réalisé par les pili qui sont connus chez de nombreuses cellules microbiennes et qui participent à plusieurs fonctions au sein des biofilms tel que l'échange de matériel génétique. Le plus important c'est que certains de ces pili possèdent des propriétés de conduction électrique, plus précisément ce sont des nano-fils électriques ou bien "Nanowires" qui assurent le transfert d'électrons directement de la cellule vers l'électrode. Ce mécanisme était étudiés en détail uniquement chez deux microorganismes *Shewanellaoneidensis* et *Geobactersulfurreducens* (Malvankaret lovley, 2014 ; Ketep, 2012 ; Pocaznoi, 2012 ; Zhao et al., 2017).



**Figure 9 :** les différents modèles de flux d'électrons le long de nanofils microbiens (Malvankar and Lovley., 2014), :(a)chez *S. oneidensis*, (b) chez *G.sulfurreducens*.

Des études à ce jour ont suggéré que la fonction des nanofils dans ces deux organismes est remarquablement différente (Figure 9). Chez *S.oneidensis*Le modèle actuel pour la conduction électrique le long des nano fils est le saut d'électrons entre les cytochromes (Figure 9a) malgré que la composition des filament est encore non spécifiée mais sont plus épais

(diamètre de 50 à 150 nm) que les pili chez *G. sulfurreducens*(diamètre de 3 à 5 nm) qui ont une conductivité semblable à celle du métal (Figure 9b), mais les deux ont la même capacité de former un réseau conducteur à l'intérieur du biofilm en se connectant aux autres bactéries (Figure ) (Malvankar and Lovley., 2014 ; Pocznoi, 2012).



**Figure 10 :** Transfert d'électrons via les pili chez *Geobactersulfurreducens*(Pocznoi, 2012)

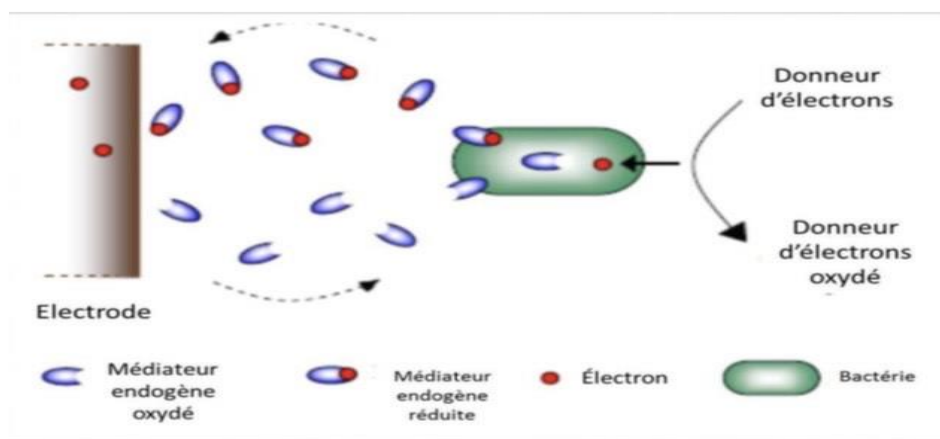
### I.10.2. Le transfert indirect des électrons :

Le transfert indirect des électrons de la cellule microbienne vers l'anode est un transfert à distance, assuré par des molécules endogènes ou exogènes qui jouent le rôle de médiateurs électrochimiques (Oliot, 2017; Pocaznoi, 2012). Il est important de préciser qu'un médiateur électrochimique est une molécule capable de s'oxyder et de se réduire en cycles successifs.

Sous sa forme oxydée le médiateur est capable de pénétrer dans la cellule bactérienne en traversant la membrane cellulaire, d'accepter des électrons d'un ou plusieurs porteurs d'électrons à l'intérieur de la cellule, de sortir de cette dernière sous forme réduite pour se réoxyder à la surface de l'anode en lui transférant les électrons (Ketep, 2012).

#### a) Transfert indirect d'électrons par les médiateurs endogènes :

De nombreuses bactéries sont capables de produire elles-mêmes leur médiateur électrochimique tel que les médiateurs endogènes produits par *Shewanellaoneidensis* sous forme de flavines (riboflavine et de riboflavine-5'-phosphate) qui représente la voie majeure pour les transferts extracellulaires de cette espèce (Pinck, 2014). Et on a aussi *Pseudomonasaeruginosa* qui produit de la pyocyanine, un pigment identifié comme responsable de l'activité électrochimique de cette bactérie (Oliot, 2017).



**Figure11** : Représentation schématique du mécanisme de transfert d'électrons entre une bactérie et une électrode via des médiateurs endogènes (De Almeida Cournet, 2010).

#### b) Transfert indirect d'électrons par les médiateurs exogènes :

De nombreuses bactéries sont incapables d'échanger les électrons avec une électrode comme par exemple : *Escherichia coli*, *Proteusvulgaris*, *Actinobacillusuccinogenes*,

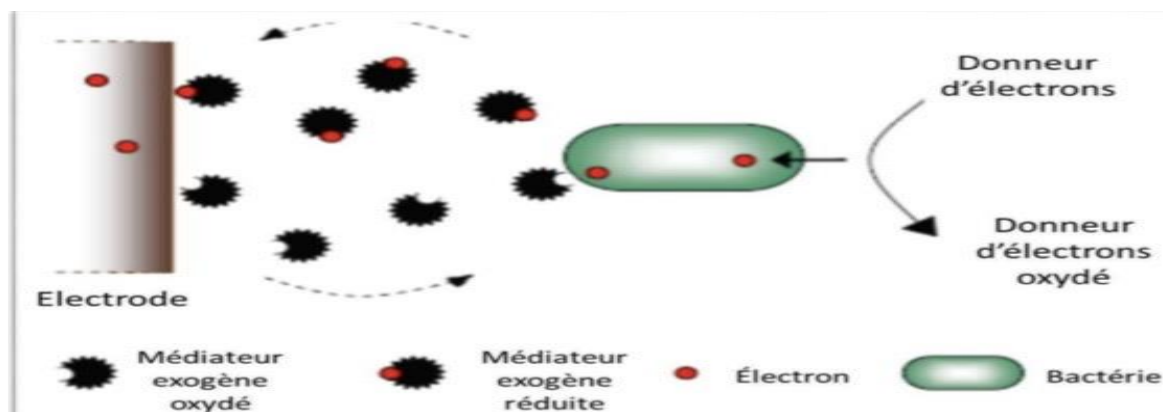
Erwiniadissolvens, Pseudomonas spp, Bacillus spp., etc. Elles nécessitent donc l'utilisation de médiateurs artificiels ajoutés dans les cultures microbiennes pour le transfert électronique (Figure 11).

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

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

- Sa forme oxydée doit facilement pénétrer à travers la membrane.
- les cinétiques des réactions d'oxydation à l'électrode doivent être rapides.
- son potentiel d'oxydo réduction doit être proche de celui du métabolite réducteur .

Aucune de ses formes oxydées ne doit interférer avec d'autres processus métaboliques (Ketep, 2012).



**Figure 12:** Représentation schématique du mécanisme de transfert d'électrons indirect entre une bactérie et une électrode via des médiateurs exogènes (De Almeida Cournet, 2010).

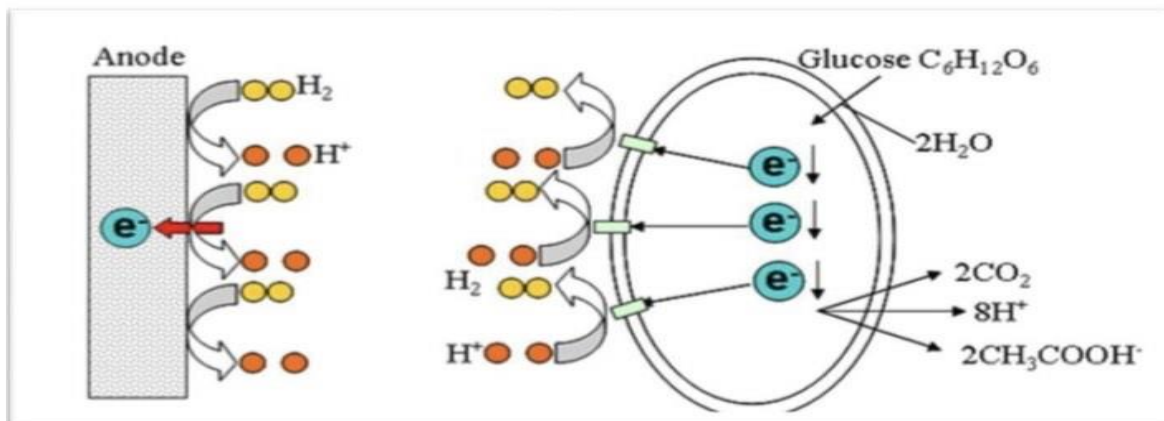
Un médiateur électrochimique accepte les électrons de composants réduits de la cellule et s'oxyde de façon abiotique à l'anode à laquelle il transmet les électrons. Le médiateur effectue plusieurs cycles successifs de réduction-oxydation. Dans la plupart des cas, les cellules qui utilisent des médiateurs électrochimiques n'oxydent pas le substrat (glucose) complètement en CO<sub>2</sub>.

### I.10.3. Transfert d'électrons par l'oxydation d'un produit issu du métabolisme bactérien :

Certains microorganismes produisent des composés métaboliques riches en énergie tels que l'hydrogène, l'éthanol, le formate, ou l'ammonium capables de s'oxyder abiotiquement à l'anode.

C'est dans les années 60 qu'ont été mis au point les premiers biofilms anodiques faisant intervenir l'utilisation de l'hydrogène par les microorganismes. Cependant, la production de courant était faible. Il y a quelques années, les travaux de Niessen ont permis d'obtenir de fortes densités de courant en utilisant des bactéries du genre *Clostridium* (*C.beijerinckii*, *C. butyricum*) ou *Escherichia coli* K12 productrices d'hydrogène.

Les résultats ont encore été améliorés jusqu'à 3 mA/cm<sup>2</sup> en utilisant des électrodes recouvertes par du carbure de tungstène qui est en outre un électrocatalyseur moins coûteux (Ketep, 2012). D'autres produits du métabolisme bactérien, comme le sulfate, sont utilisés par les biofilms électroactifs. Le sulfate est réduit par des bactéries sulfato-réductrices en HS- ou S<sup>2-</sup> (fonction du pH) qui eux s'oxydent directement à l'anode en S<sup>0</sup> (Dumas, 2007).



**Figure13** : Schéma du mécanisme indirect de transfert d'électrons par l'oxydation d'un produit du métabolisme bactérien (Pocaznoi, 2012).

### I.11: Constituants des piles microbiennes :

De façon générale les composants des piles microbiennes étudiés à échelle du laboratoire sont les électrodes, la résistance externe, la membrane échangeuse d'ions, le compartiment anodique (anolyte) et le compartiment cathodique (catholyte).

---

a- **Electrodes** : Les électrodes utilisées peuvent être sous forme de fil, de grille, de feuille, de plaque, d'éponge, de feutre, de barreau, de tube ou de granules. Les matériaux rencontrés dans les piles microbiennes sont le carbone et le graphite, l'acier inoxydable, le platine et le carbone vitreux réticulé. L'objectif est d'avoir une aire d'électrode la plus grande possible.(Quezada, B. C. (2009)).

b- **Résistance externe** : Les électrodes sont connectées au-travers d'une résistance externe qui dissipe l'énergie produite par la pile. Le courant produit par la pile est faible pour des valeurs élevées de résistance et vice-versa, suivant la loi d'ohm ( $I = U/R$ ). La performance d'une pile est mesurée en variant la résistance externe et en mesurant la puissance produite pour chaque résistance. Un nombre important de travaux reportent l'utilisation d'une résistance de 1000 ohms comme valeur standard pour faire débiter les piles sur de longues périodes; certains autres préfèrent utiliser la valeur de la résistance que génère la puissance maximale.(Chouard, N. (2011)).

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

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

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

**II.1. Introduction:**

La technologie des piles à combustible microbiennes fait intervenir des microorganismes qui forment des biofilms électrocatalytiques à la surface des électrodes. Il est donc utile de rappeler quelques notions de base sur les biofilms.

**II.2. Définition:**

Un biofilm est un assemblage de microorganismes, contenu dans une matrice extracellulaire de type exopolymérique, qui est attaché par une adhésion irréversible à une surface solide ou associé à une interface solide/liquide ou encore air/liquide .

Cet assemblage de microorganismes peut être composé uniquement par des bactéries mais dans le cas d'environnements aquatiques, il peut être initié par des diatomées et être composé de bactéries, d'algues, de protozoaires et de champignons.

Dans tous les cas, les biofilms ont des structures très hétérogènes, composés essentiellement de cellules bactériennes et de substances extra-polymériques (EPS). Cette substance représente 50 à 90 % du carbone organique total du biofilm et est composée majoritairement de polysaccharides et de protéines (soit 75 – 89 % de la composition en EPS du biofilm) .

La matrice extracellulaire permet au biofilm d'adopter une structure en trois dimensions contenant des micro-colonies de cellules bactériennes, d'espèce unique ou multiespèces, qui sont séparées les unes des autres par des vides interstitiels encore appelés voies d'eau, canaux ou pores. Ces vides favorisent la circulation des nutriments par le flux de liquide provenant du milieu dans lequel s'est formé le biofilm mais également l'échange des produits métabolites avec le milieu extérieur.(BERGEL, A. (2012)).

**II.3. La formation d'un biofilm:**

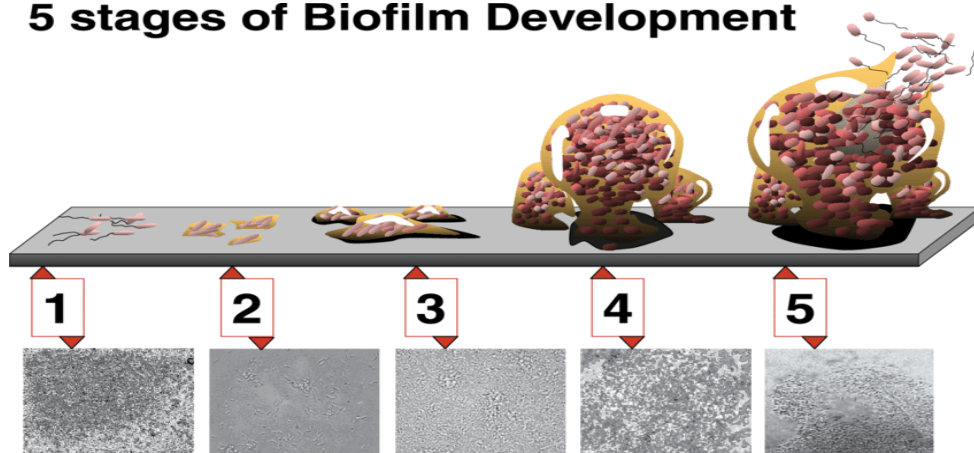
La formation d'un biofilm bactérien sur une surface solide est un phénomène complexe dans lequel des processus physiques, chimiques et biologiques sont impliqués .(Haras, D. (2005) )

La constitution d'un biofilm mature nécessite plusieurs étapes (Figure 14) :

- attachement réversible des bactéries,
- adhésion irréversible et production d'EPS,
- formation des micro-colonies,

- maturation du biofilm et mise en place de la structure tridimensionnelle du biofilm,
- détachement du biofilm.

### 5 stages of Biofilm Development



**Figure 14:** Les 5 étapes de maturation d'un biofilm. (Davis, 2008).

( 1: attachement initial; 2: attachement irréversible; 3: colonisation et croissance; 4 maturation ; 5: dispersion. )

#### II.3.1: Attachement initial :

Durant les phases préliminaires de transport et d'adhésion, les bactéries, en forme planctonique, se déplacent sous l'effet de l'hydrodynamique ou par nage dirigée, grâce à leurs appendices de mobilité appelées « flagelles ». Pour adhérer à une surface. Les liaisons mises en jeu à ce stade sont non covalentes donc fragiles. Cette adhésion primaire des bactéries peut donc être réversible (Imane, B. (2019)).

#### II.3.2: Attachement irréversible :

Sous-entend l'installation des microorganismes sur la surface d'adhésion. Les bactéries sécrètent des polysaccharides et des protéines possédant des propriétés adhésives. L'adhésion devient irréversible avec la production de ces macromolécules appelées glycocalyx ou glycolemmes et la formation de nombreuses liaisons de faible énergie de nature ioniques, hydrophobes ou hydrogènes entre les bactéries et le substrat .(Daumas, S. (1987) ).

#### II.3.3: La colonisation :

A cette étape, les micro-organismes se divisent pour former des micro-colonies qui vont recouvrir toute ou une partie de la surface. Le taux de recouvrement dépend de la nature et des propriétés de la surface d'adhésion ainsi que de la nature des bactéries. Les bactéries adhérentes



produisent des exo-polymères qui forment la matrice du biofilm, favorisant son maintien et sa plasticité. (Roux, Ghigo, (2006)).

### II.3.4: La maturation :

La maturation, résultat de la formation des canaux qui permettent la circulation des nutriments et de l'oxygène dans les régions profondes du biofilm, ainsi que l'évacuation des produits issus de l'activité métabolique. À cette étape, le biofilm s'étend et s'épaissit jusqu'à former une structure macroscopique tridimensionnelle .(Lubey, P. (1959) ).

### II.3.5: La dispersion du biofilm :

Cette étape est liée à un retour vers l'état planctonique dû au vieillissement, à des carences ou à des stress liés à l'environnement (manques des nutriments ou des accepteurs d'électrons, modification de pH, l'application des forces physiques sur le biofilm). Les bactéries ainsi libérées vont pouvoir coloniser de nouvelles surfaces. (Cambon, (2021)).

## II.4: Les Facteurs environnementaux et microbiologiques influençant l'attachement microbien et la structure du biofilm:

**Tableau 2** : Facteurs environnementaux et microbiologiques influençant l'attachement microbien et la structure du biofilm.(Saur, T. (2014)).

Caractéristiques du milieu	Composition microbiologique	Caractéristiques de la surface ou de l'interface
<p>-pH</p> <p>-Température</p> <p>-Intensité lumineuse</p> <p>-Concentration en nutriments</p> <p>-Concentration en polymères</p> <p>-Hydrodynamique</p>	<p>-Appendices extracellulaires (flagelles ou fimbriae)</p> <p>-Surface cellulaire (protéines, lipopolysaccharides, exopolysaccharides,...)</p> <p>-Hydrophobicité de la surface cellulaire</p> <p>-Historique de colonisation primaire</p>	<p>-Rugosité de la surface</p> <p>-Hydrophobicité de la surface</p>

---

La structure du biofilm dépend toutefois de nombreux facteurs environnementaux et microbiologiques . Ainsi, l'intensité lumineuse, la vitesse d'écoulement de l'eau (hydrodynamique), l'historique de la colonisation primaire, l'âge du biofilm, les conditions de croissance, les propriétés de surface et d'interface, la disponibilité des nutriments, la composition microbiologique du biofilm, la présence ou non d'appendices extracellulaires (flagelles, fimbriae,...), l'hydrophobicité de la surface cellulaire, le pH et la température du milieu sont autant de facteurs pouvant affecter la structure du biofilm. Par exemple, le biofilm sera plus épais sur une surface solide rugueuse et plus hydrophobe. Tous ces paramètres vont donc plus ou moins favoriser l'attachement, l'adhésion et la croissance de microorganismes pour évoluer en biofilm (Tableau 2).

### **II.5. Intérêts et avantages du biofilm pour les microorganismes:**

Les communautés microbiennes associées sous la forme de biofilm bénéficient sans conteste de la protection contre plusieurs stress environnementaux grâce à leur enveloppement par la matrice extracellulaire. Cette matrice qui constitue en fait un gel polymérique autour des cellules bactériennes est une barrière physique et fournit une protection contre, par exemple, les radiations UV, les modifications de pH, les chocs osmotiques et la dessiccation .

Elle a le pouvoir aussi de séquestrer des métaux, des cations ou des toxines qui pourraient être nuisibles pour les cellules bactériennes. De plus, elle peut retarder ou empêcher l'accès de molécules antimicrobiennes issues du milieu en régulant les transports par diffusion ou en interagissant chimiquement avec ces molécules .

Les nutriments, les composés organiques ou encore le O<sub>2</sub> sont absorbés par la matrice du biofilm et peuvent ainsi se concentrer dans le biofilm augmentant leur disponibilité pour les microorganismes.

Le flux liquide qui circule dans les vides interstitiels du biofilm permet également d'augmenter l'échange des nutriments et des produits issus des processus métaboliques des microorganismes avec le milieu extérieur et ce dans toutes les couches du biofilm. Le biofilm est composé de micro-colonies, en général contenant plusieurs espèces bactériennes. La multiplicité des espèces et leur proximité dans le biofilm sont autant de facteurs qui favorisent la communication intercellulaire et donc la coopération métabolique .

Cette coopération est essentielle pour le bon développement du biofilm. En effet, la plupart des processus métaboliques comme par exemple la dégradation de la matière organique

---

nécessitent l'action combinée de plusieurs espèces bactériennes. Un des processus clé de cette communication intercellulaire est le quorum seing. (Lebeaux, Lucet,(2016)).

Il permet par une modulation de l'expression génétique des bactéries d'obtenir des changements phénotypiques permettant un meilleur ajustement aux conditions environnementales pendant la croissance du biofilm. Cette régulation de paramètres est possible par la sécrétion de molécules dites signal encore appelées auto-inducteurs. Le quorum sensing permet aux bactéries du biofilm de réguler leur densité de population. Par exemple, lors du détachement des bactéries, une sécrétion d'auto-inducteurs peut permettre le ralentissement de la formation de la matrice pour libérer les bactéries. Le quorum sensing intervient dans de nombreux processus métaboliques comme la biosynthèse d'enzymes extracellulaires, le développement et la croissance du biofilm, le développement de nouvelles compétences génétiques, la symbiose.

La proximité des microorganismes dans les biofilms permet le transfert de gènes entre les espèces bactériennes. Ce transfert permet d'assurer une meilleure stabilité du consortium bactérien qu'est le biofilm par des améliorations génétiques telles que la résistance aux antibiotiques ou aux métaux. Il participe également à l'évolution et à la diversité des espèces génétiques des familles bactériennes existantes par l'acquisition des bactéries de nouveaux gènes. Le mécanisme de transfert le plus important est celui de la conjugaison des plasmides.(Doberva, M. (2016)).

### **II.7.1:Les aspects négatifs des biofilms :**

Les biofilms peuvent provoquer divers problèmes dans de nombreux secteurs industriels ou dans le domaine de la santé. Ils sont, par exemple, à l'origine de dégradations de matériaux (corrosion) ou de graves problèmes sanitaires.

Concernant les problèmes de santé, il a été montré que les biofilms sont à l'origine de 60% des infections chez l'Homme.

Le développement des biofilms sur le matériel médical (seringues, cathéters, prothèses, implants...) ou sur les tissus corporels (yeux, oreilles, dents, poumons, os...) est le responsable direct de ces problèmes dans le domaine médical.

La bactérie la plus étudiée dans ce domaine est *Pseudomonas aeruginosa*. L'organisation de ce type de bactéries en biofilm est à l'origine des infections pulmonaires chroniques chez les patients atteints de mucoviscidose.

---

Les biofilms posent également des problèmes dans de nombreux secteurs industriels. Dans l'industrie pétrolière par exemple, la colonisation des systèmes d'injection d'eau peut entraîner une acidification du pétrole qui rend ce dernier inutilisable. Lorsque le développement des biofilms s'effectue dans les canalisations d'eau potable, il présente également un problème majeur car l'ajout de chlore ne permet pas d'éliminer totalement les bactéries fixées sur la surface. Les biofilms sont aussi capables d'induire des problèmes dans le milieu marin. Des problèmes de corrosion directe ou indirecte de différents matériaux. Notons la formation de biofilms sur les coques des navires, appelé phénomène de « biofouling » (ou « biocolmatation »), qui conduit à une augmentation significative du poids et qui peut provoquer une augmentation des forces de frottement, d'où une diminution de la vitesse des bateaux.

Cela entraîne des surcoûts énergétiques importants qui se traduisent par une surconsommation de carburant et ainsi des pertes économiques importantes et des problèmes environnementaux résultants des émissions de CO<sub>2</sub> par exemple. L'industrie agro-alimentaire n'est pas épargnée par les problèmes induits par les biofilms contaminant des produits dans divers secteurs tels que les laiteries, les sucreries, les brasseries, etc.

En gros, tout équipement non stérilisé abrite des micro-organismes qui peuvent s'organiser en biofilms en quelques heures dans des conditions favorables, permettant ainsi aux bactéries de devenir résistantes aux agents extérieurs grâce à la protection physique apportée par cette organisation. Lutter contre le développement des biofilms est un enjeu important dans les différents domaines médicaux ou industriels. Leur élimination nécessite souvent la mise en jeu de composés nocifs qui polluent les sols et l'eau. Cependant les biofilms peuvent aussi jouer des rôles positifs dans plusieurs domaines.

### **II.7.2: Les aspects positifs des biofilms:**

Les biofilms jouent un rôle essentiel dans de nombreux processus : ils contribuent à la production et à la dégradation de la matière organique, au recyclage de l'azote, du soufre et de nombreux métaux. Dans le cas de la bio-minéralisation, l'eau accumulée dans les nappes souterraines et lors de son passage dans les sous-sols, subit une épuration naturelle par l'action des biofilms qui permettent la fixation de l'azote et du carbone.

Dans le cas de la bio-rémediation, les biofilms servent au traitement des déchets en transformant les matières organiques et inorganiques toxiques ou indésirables en sous-produits bénins.

---

On peut citer comme exemple la réduction ou l'oxydation des contaminants de l'eau. Ainsi, les nitrates et nitrites peuvent être réduits biologiquement en azote, aussi le perchlorate en eau et chlore et les solvants chlorés en éthylène et chlore. Les biofilms sont aussi utilisés pour la biolixiviation des minerais pour mobiliser les métaux lourds d'un sol ou d'un déchet. Dans le secteur de l'industrie agroalimentaire, les biofilms sont utilisés pour différents raisons, par exemple, les bactéries lactiques interviennent dans la fabrication de fromages, du vin, des yaourts. Un des meilleurs exemples pour mettre en évidence l'effet bénéfique des biofilms en lieu avec ce travail de thèse, est leur utilisation dans le domaine du traitement des eaux usées qui s'effectue grâce à l'utilisation de biofilms électro actifs (EA), qui ont la capacité de transférer des électrons, issus de l'oxydation des matières organiques, à une surface d'électrode solide (anode) permettant ainsi la production de « bioélectricité ». (Roux, (2006)).

### **II.8. Les biofilms électro actifs (EA):**

L'électro activité d'une cellule bactérienne est définie par sa capacité à échanger des électrons avec des accepteurs ou des donneurs externes en état naturel. Un biofilm électro actif désigne un biofilm capable de réaliser ces échanges. Ces transferts d'électrons sont générés par le catabolisme, ils sont de deux types : intracellulaire et extracellulaire (Pinck, 2014).

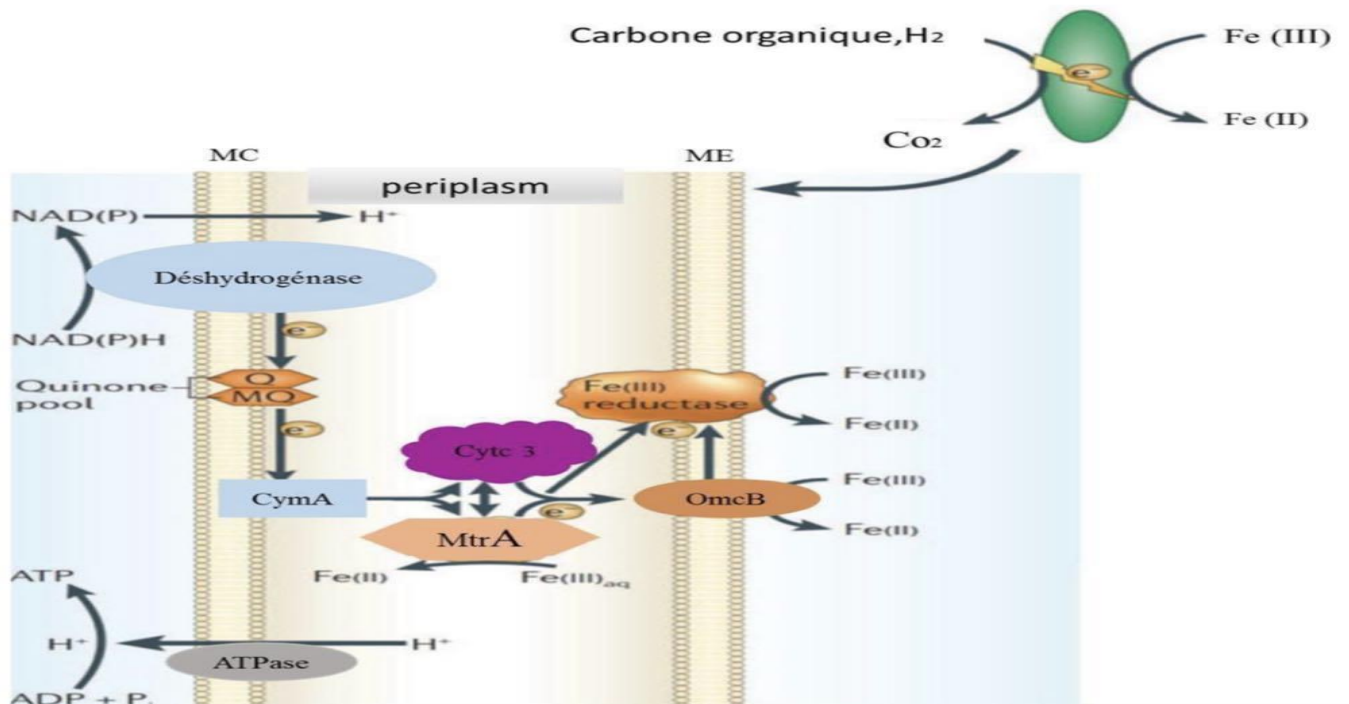
#### **II.8.1: Le Transfer intracellulaire :**

Les transferts intracellulaires d'électrons ont lieu au cours des mécanismes du métabolisme énergétique de la bactérie et participent aux réactions d'oxydo-réduction des molécules nécessaires à son fonctionnement (Pinck, 2014).

#### **II.8.2: Les transferts extracellulaires d'électrons :**

Ce type de transfert d'électrons se fait en règle générale de la cellule vers un accepteur final extracellulaire. Un exemple très étudié de ce mécanisme est la respiration extracellulaire du Fe (III) par *Shewanella* spp (Figure 15). Un pool de quinone permet le transfert des électrons produits au niveau de la membrane interne lors des réactions de déshydrogénase vers le cytochrome A (CymA), un cytochrome C. Les électrons traversent ensuite le périplasme via d'autres cytochromes C catalysant des réactions

d'oxydo-réductions comme la protéine MtrA pour ensuite être transférés aux niveaux d'OmcB et de la réductase terminale sur la membrane externe (Pinck , 2014). Dans le milieu extracellulaire aura alors lieu la réduction de Fe (II) par ces protéines de la membrane externe.



**Figure 15:** Respiration de Fe (III) par *Shewanella* spp (Pinck , 2014).

Représentation du mécanisme responsable des transferts d'électrons au cours de la respiration

extracellulaire de Fe(III), MC : membrane cytoplasmique ; ME : membrane externe ; OmcB et MtrA : cytochrome de type C.

**II.9. Le quorum sensing :**

Dans le biofilm, les bactéries communiquent entre elles par un phénomène de quorum sensing. C'est l'un des processus clé dans la formation des biofilms, Le quorumsensing permet aux bactéries d'adopter un comportement spécifique à la vie en communauté, par régulation de leur expression génétique en réponse à la densité cellulaire via la production d'auto- inducteurs. Lorsque la concentration des molécules signaux atteint une valeur seuil,

des régulateurs transcriptionnels sont activés et exercent un contrôle sur des gènes spécifiques (Roux et Ghigo, 2006).

Le quorum sensing intervient lors du détachement des bactéries, une sécrétion d'auto- inducteurs peut permettre le ralentissement de la formation de la matrice pour libérer les Cellules. Aussi dans de nombreux processus métaboliques comme la biosynthèse d'enzymes extracellulaires, le développement et la croissance du biofilm, le développement des nouvelles compétences génétiques et la symbiose (Roux et Ghigo, 2006).

### **III.1. Objectif de travail:**

À la lumière de la revue de littérature, l'objectif de ce travail est d'établir les principales bases scientifiques, permettant de réaliser des piles biologiques « biopiles » fonctionnelles et performantes, alimentées au fumier de cheval. Ce travail qui est fondé sur la conception d'une biopile combustible microbienne, vise plusieurs objectifs, à savoir :

Réaliser cette biopile microbienne en créant un prototype à deux compartiments, qui sera aussi simple et économique que possible.

Suivre la charge électrique qui peut être détecté par millimètre.

Analyser la communauté microbienne associée à l'anode de la biopile, et ayant une activité électrochimique (Isolement et identification). Cette communauté existait déjà dans le lixiviat du fumier de cheval, qu'on a choisi comme source de bactéries. La présente étape est une étape stratégique servant à identifier les bactéries qui ont la capacité de produire de l'énergie électrique.

Tester le rendement de chaque espèce bactérienne isolée à partir du biofilm formé sur l'anode, en utilisant des biopiles avec une seule espèce.



### III.2. Les souches bactériennes:

#### III.2.1: Choix des matériaux, souches et milieu :

deux souches bactériennes codé (A2,Cg\_F) font l'objet de cette étude .

Ce sont des souches sauvage isolé au paravent par notre encadrent Mr,Benreguiég Mokhtar.

#### III.2.2: Le milieu:

Le milieu de culture utilisé est le milieu LB « LuriaBertani » Sa composition est présentée dans le Tableau 3. Le pH du milieu est ajusté à 7-7,02 .

Le milieu LB est un milieu riche qui permet la croissance de toute les bactéries d'où son choix dans ce travail.

**Tableau 3:** composition du milieu de culture LB (les quantités pour 1L).

composants	Concentration g/l
Trypton	10
Extrait de levure	5
NaCl	5

### III.3. Recherche des souches microbienne productrice d'électricité :

#### III.3.1. Revivification :

La revivification des souches a pour objectif l'obtention d'une culture jeune et pure.

A l'aide d'un écouvillon stérile nous avons ensemencer en stries quelques colonies des souches conservées (A2 et Cg\_f) en surface dans des boites de pétrie contenant GN et Vf préalablement coulée et solidifiée dans des boites de pétri.

Les boites de pétri sont incubées à 37C° pendant 24 heures.

### **III.3.2:le repiquage:**

Le repiquage consiste à prendre quelques colonies des boites de pétrie contenant les souches conservées et les mettre dans un tube à essai stérile contenant 5ml de Bouillon nutritif Préalablement préparé. Après incubation à 37°C (température optimale de croissance de ces Bactéries) pendant 24 heures, la croissance est appréciée par l'apparition d'un trouble dans le milieu.

### **III.3.3: Identification morphologique :**

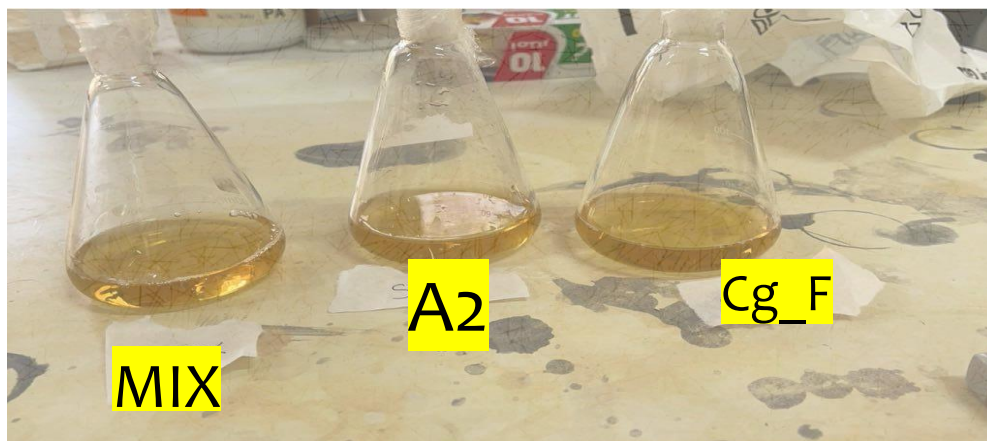
Après l'obtention de la souche bactérienne pure à étudier, nous avons procédé à son identification selon son aspect macroscopique et microscopique. D'abord nous avons effectué la coloration Gram. Une fois les bactéries fixées, nous avons commencé par déposer quelques gouttes de violet phéniqué. On Laisse agir 4 à 6 secondes et on égoutte sans rincer. Par la suite, quelques gouttes de lugol sont déposées. Puis, nous avons lavé la lame avec l'alcool jusqu'à la disparition du violet. Enfin, nous avons ajouté une goutte de la solution de Fuchsine. Une fois la lame séchée nous avons observé au microscope optique.

### **III.3.4: Isolement des souches bactériennes et culture en aérobiose :**

Dans des erlens de 50 ml des précultures de chaque souche ainsi que celle du mélange (Mix) des deux souches, sont réalisées comme suit : (Figure16)

- Premier erlen : 30 ml de milieu LB + la souche A2.
- Deuxième erlen : 30 ml de milieu LB +Cg\_F .
- Troisième erlen : 30 ml de milieu LB + le mix (+ ).

Les précultures sont incubées à 30°C sous agitation à une vitesse de 150 rpm jusqu'à ce que la densité optique (Do) mesurée à 600 nm atteigne 0.3-0.6. Ces valeurs correspondent à la phase exponentielle de la croissance bactérienne, étape pendant laquelle les cellules bactériennes atteignent le maximum de leurs activités métaboliques et biochimiques (Dumas, 2007). Ensuite 100 ul de chaque préculture utilisée pour inoculer de grands volumes (150 ml) de LB qui feront le système électrochimique.



**Figure16:**Culture des souches dans le bouillon LB.

#### **III.4. Préparation des bocaux :**

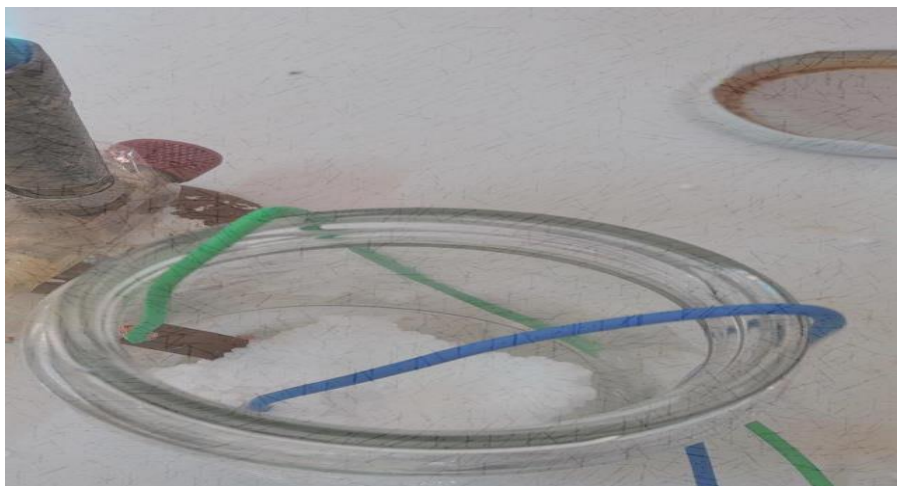
Pour le montage de la pile, des bocaux en verre d'un volume d'environ 500 ml ont été utilisés comme récipient du système. Les ustensiles ont été stérilisés dans un four pasteur à une température de 180 °C pendant 1 heure.

#### **III.5. Préparation des électrodes :**

##### **III.5: Le montage nécessite l'utilisation de deux électrodes :**

a. L'anode : Dans des conditions stériles; le polystyrène est coupée en morceaux (3 morceaux) proportionnellement à la surface de la base du bocal utilisé. chaque morceau est relié avec un fil de connexion en titane.

b. La cathode : la plaque de cuivre a été coupée en petits morceaux d'environ 3cm de longueur et 1cm de diamètre. Elle est ensuite soudée à l'extrémité du fil de titane à l'aide d'un fer à souder. Cet ensemble représente la cathode.



**Figure17:** les deux électrodes utilisées dans le montage.

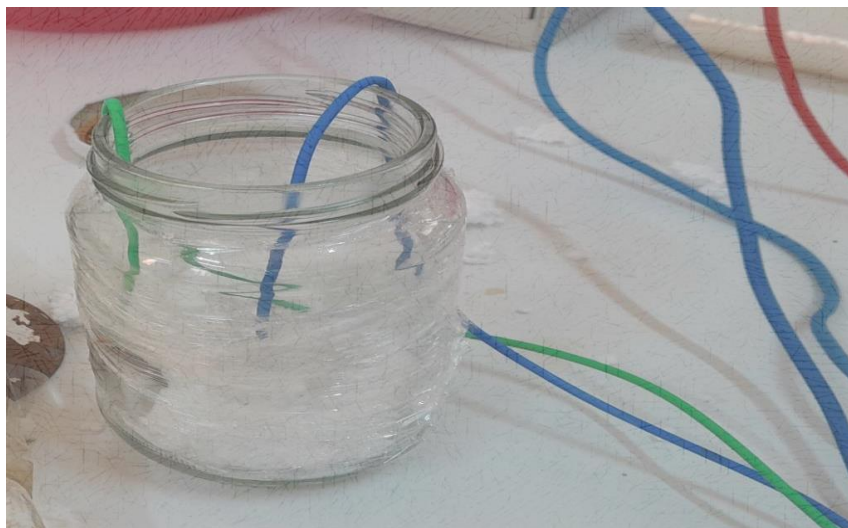
### **III.6. L'architecture de la pile microbienne :**

- Dans des conditions d'asepsie le polystyrène est placé au fond des bocaux en verre. Le fil de titane déjà relié à l'anode est alors attaché au bord de l'ouverture du bocal de verre comme indiqué dans la (figure 18) et par le même principe on place la cathode.

- Après la fixation des électrodes, les cultures bactériennes déjà préparées sont versées dans le système. Au total, trois bocaux et donc trois piles semi microbienne (due que la plaque de cuivre est une cathode abiotique) sont construites : A2, Cg\_F et le mix des deux souches.

- En utilisant un millivolt, une première mesure du courant est réalisée pour confirmer qu'il n'y a pas de contact direct entre les deux pôles de la pile et donc pour éviter tout éventuel court-circuit.

- finalement, les trois bocaux sont hermétiquement fermés par du parafilm pour éliminer le plus possible le passage d'oxygène.



**Figure18:**le montage général des électrodes de la pile microbienne.



**Figure 19:** Millivolt utilisé pour la mesure du courant électrique.

**Piles à combustible microbienne:****III.7. Source du biocatalyseur de la biopile microbienne :**

Comme source de biocatalyseur utilisé pour oxyder la matière organique présente dans le compartiment anodique, nous avons choisi le lixiviat de fumier de cheval, provenant d'une ferme située au niveau de la commune de youb, wilaya de Saida.

**III.8. Préparation du lixiviat :**

En s'inspirant du modèle du professeur en botanique Potter (1911), le but de la préparation de la solution de lixiviat est le passage de la phase solide du fumier de cheval à la phase liquide, permettant ainsi la mise en suspension des bactéries électro-actives dont nous cherchons.

Cette préparation comprend les étapes suivantes :

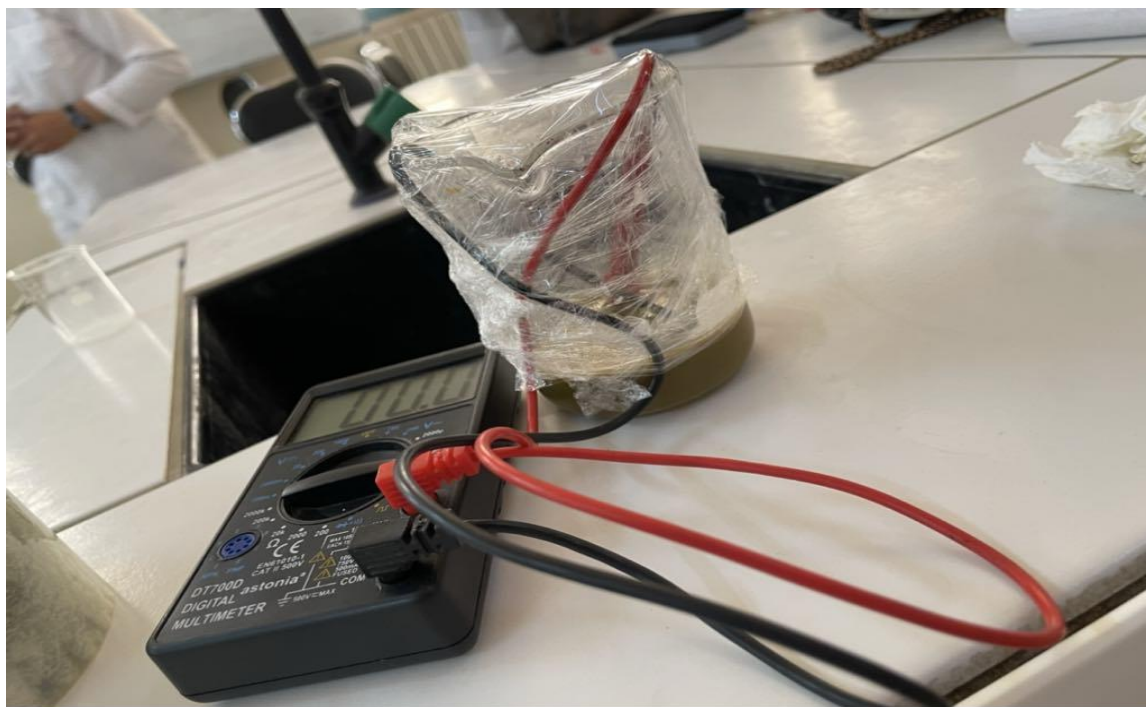
On prend 50g de l'échantillon (fumier de cheval) et on y ajoute une solution de KCl à une concentration de 0,06 mol/L pour obtenir une préparation plus ou moins pâteuse. Cette préparation doit subir par la suite une agitation pendant 48 heures.

Après l'agitation, la préparation doit être tamisé et filtré pour obtenir un liquide clair d'une couleur vert noirâtre (figure20 ). L'avantage de la filtration et la séparation de phases, est de fournir une fraction liquide dépourvue de larges particules susceptibles de limiter le passage des électrons, par le colmatage de la membrane séparant les deux compartiments de la biopile microbienne.



**Figure20:** Aspect du lixiviat du fumier de cheval.

Après 48 heures en utilisant un millivolt, une première mesure du courant est réalisée pour confirmer qu'il n'y a pas de contact direct entre les deux pôles de la pile et donc pour éviter tout éventuel court-circuit et sont incubées à 37°C.



**Figure21:** Prototype d'une biopile a combustible microbienne montée au niveau du laboratoire.

### **III.9. Analyse microbiologique :**

Le lixiviat de fumier de cheval, utilisé comme source de biocatalyseur, et dans lequel la bioanode est immergée, est riche en micro-organismes parmi lesquels ceux qui ont le caractère électrogène. Ces derniers, s'adsorbent sur la surface de cette électrode en formant un biofilm qui peut contenir plusieurs souches bactériennes électro actives. Donc, afin d'identifier ces bactéries, il est préférable d'effectuer un prélèvement d'échantillon directement à partir du biofilm formé sur la surface de la bioanode

#### **III.10.1: Isolement des souches bactériennes électro actives :**

A l'aide d'un écouvillon stérile nous avons effectué un prélèvement d'échantillon à partir du biofilm formé; ensuite on l'aensemencé en surface sur 4 boîtes de Pétri :

- ❖ Deux boîtes contenant du milieu gélose nutritive (GN) (en aérobie ).
- ❖ deux boîtes contenant du milieu gélose Hektoen (en aérobie ).
- ❖ Les échantillonsensemencés dans le milieu gélose Hektoen ont été incubés à 37 °C pendant 24 heures. Par ailleurs, les échantillonsensemencés dans le milieu gélose nutritive ont été incubés à 37°C pendant 72 heures.

#### **III.10.2: Purification de souches bactériennes :**

Après incubation de chaque boîteensemencée, on obtient des colonies ayant des aspects macroscopiques différents. Chaque colonie choisie estensemencée en surface dans des boîtes de pétrie contenant GN selon la technique de quadrant. Ensuite, pour toutes les boîtes, l'incubation est effectuée à 37°C pendant 24 heures.

Les souches isolées sont identifiées en se basant sur des caractères cultureux, morphologique, et quelques caractères biochimiques.

#### **III.10.3: Identification de souches bactériennes :**

##### **III.10.3.1: ASPECT MACROSCOPIQUE:**

L'aspect macroscopique des colonies (taille, bord, couleur) est déterminé après incubation à 37°C sur GN pendant 24h.



### **III.10.3.2:ASPECT MICROSCOPIQUE: COLORATION DE GRAM**

La morphologie ainsi que le mode d'association des isolats sont déterminés sur des cultures jeunes par la technique de coloration de Gram, qui est une coloration différentielle : Elle permet de classer les bactéries en deux groupes (taxonomiquement différents : bactéries Gram positives : Gram + et bactéries Gram négatives : Gram -) sur la base de la perméabilité de leur paroi à l'Alcool (ou à l'Alcool/Acétone). Cette perméabilité dépend de la composition de la paroi bactérienne (épaisseur de la paroi liée à sa richesse en peptidoglycanes).

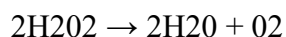
Les bactéries qui retiennent le colorant basique utilisé (cristal-violet) après lavage à l'alcool sont dites Gram positives, celles qui ne le retiennent pas sont dites Gram négatives.

### **III.10.3.3:Caractérisation biochimique des isolats :**

#### **III.10.3.3.1: Mise en évidence d'enzyme respiratoire : Catalase :**

##### **a) Principe:**

Certaines bactéries produisent une catalase qui est une enzyme de nature ferroprotéique capable de catalyser l'hydrolyse de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en libérant de l'O<sub>2</sub>.



Le test consiste à mettre des bactéries en quantité suffisante, en contact de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Si elles possèdent la catalase, elles dégradent le peroxyde d'hydrogène en eau et dioxygène visible par la formation de bulles.

##### **b) Mode opératoire :**

- Prélever une colonie avec une anse pour la déposer sans l'étaler sur une lame propre et sèche.
- Laisser tomber une goutte d'eau oxygénée (peroxyde d'hydrogène).
- Observer immédiatement.

La présence d'une catalase se traduit, en quelques secondes, par la formation de bulles d'oxygène.

#### **III.10.3.3.2:Caractérisation des souches par la galerie API 20 E:**

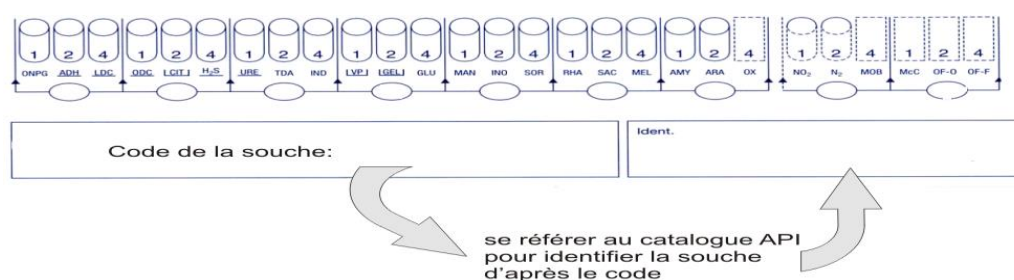
##### **a) Principe :**

La galerie API 20 E est un système standardisé pour l'identification des pour Eterobacteriaceae et autres bactéries bacilles à Gram négatif .C'est un système simplifié,

comporte 20 micro tubes contenant des substrats déshydratés permettant d'effectuer 22 tests biochimiques. Des suspensions bactériennes de chaque souche sont effectuées dans de l'eau physiologique à partir des cultures de 18h.

Ensuite, les suspensions sont inoculées dans les micros-tubes de la plaque API 20 E. Les plaques sont incubées pendant 24h à 37 °C.

Les réactions se traduisent par des virages colores spontanés ou révélés par l'addition des réactifs.



**Figure 22:**présentation de la galerie API 20 E.

### **b) Technique de préparation de la galerie :**

Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir de l'eau dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.

Déposer stérilement la galerie dans la boîte d'incubation.

Inscrire la référence de la souche sur la languette de la galerie.

### **c) Préparation de l'inoculum :**

Une colonie, prélevée du milieu gélosé, est mise dans un tube à essai contenant 5 ml d'eau distillée stérile, afin d'obtenir une suspension bactérienne.

**d) Inoculation de la galerie :**

- Homogénéiser la suspension bactérienne.
- Pour les tests CiL, VP, GEL, remplir les tubes et les cupules avec la
- Suspension bactérienne préparée.
- Pour les autres tests, remplir uniquement les tubes avec la suspension bactérienne préparée.
- Recouvrir les tests ODC, ADH, LDC, H<sub>2</sub>S, URE, avec 2 gouttes d'huile de paraffine.
- Mettre le couvercle de la galerie.
- Incuber à 37° C pendant 24 heures.

**e) Lecture et interprétation :**

L'interprétation de la galerie s'effectue après incubation, en se référant au tableau de lecture, cité en annexe.

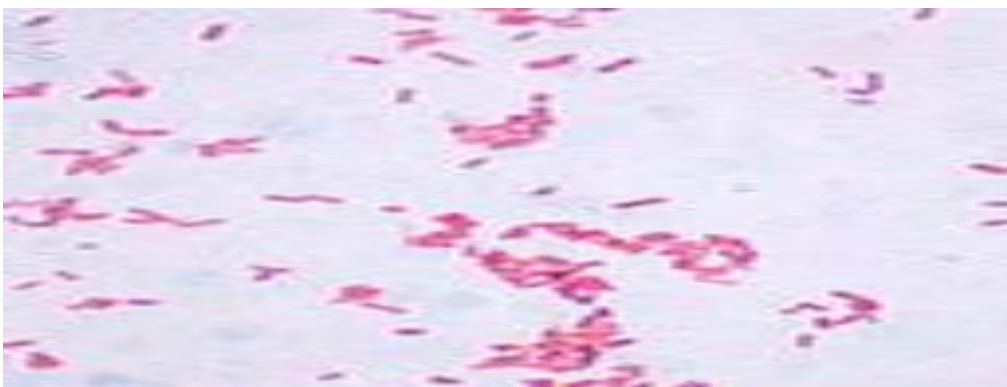
**IV.1. Étude macroscopique et microscopique des souches bactériennes:****IV.1.1: Étude macroscopique de souche A2:****Croissance sur milieu GN:**

Les résultats obtenus après 24h d'incubation à 37°C sur le milieu GN ont montré que la souche A2 apparaisse en colonies :

1. Petites à moyennes.
2. Circulaires.
3. Convexes .
4. Lisses.
5. Opalescentes (légèrement nacrées) .
6. De couleur crème.

**IV.1.2: Étude microscopique de souche A2:**

Après la réalisation de coloration de gram on observe au microscope optique des bacilles courts, isolés ou en courtes chaînes, de couleur rose a rouge confirmant leur caractère Gram négatif.



**Figure23** : Observation de souche d'Escherichia Coli après coloration de Gram sous microscope optique (G x 100).

### IV.1.3: Étude macroscopique de souche Cg\_F:

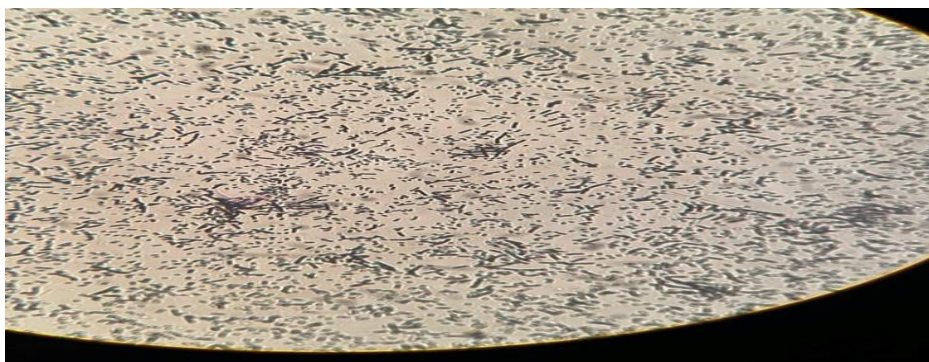
#### Croissance sur milieu VF :

Les résultats obtenus après 24h d'incubation à 37°C sur le milieu VF ont montré que la souche Cg\_F apparaisse en colonies :

1. Circulaires
2. petites à moyennes
3. Convexes
4. Opaque Entourées

### IV.1.4: Étude microscopique de souche Cg\_F:

Après la réalisation de coloration de gram on observe au microscope optique des bacilles (bâtonnet), avec des extrémités arrondies, isolés ou en c autres chaînes, De couleur bleu foncé à violet, confirmant leur caractère Gram positif.



**Figure24 :** Observation de souche clostridium butyrique après coloration de Gram sous microscope optique (G x 40 ).

Selon les colorations de gram les souches nous avons caractérisées sont::

- ✓ La souche A2 forme des colonies de couleur rose à rouge à gram négatif,  
Correspondent à la souche bactérienne : *Escherichia. Coli*.
- ✓ La souche Cg\_F formées colonies de couleur bleu foncé à violet a Gram positif  
Correspondent à la souche bactérienne : *clostridium butyricum*.

Dans l'objectif de trouver une alternative efficace, économique et surtout, écologique aux Sources d'énergie non-renouvelables, beaucoup de laboratoires de recherche de par le monde se sont penchés sur l'exploitation des capacités extraordinaires des micro-organismes et notamment les bactéries. L'optimisation des piles à combustible microbiennes est devenue alors, une thématique de concurrence entre les chercheurs de manière conventionnelle, la composition d'une pile à combustible microbienne est comme Suit :

- Une cellule électrochimique
- Trois électrodes (une électrode de travail, une contre électrode et une électrode de Référence). Ces électrodes doivent être constituées d'une matière électro chimiquement Stable et compatible.

Le tout, plongé dans un bocal en verre appelé réacteur qui contient un milieu de culture riche. Le milieu de culture est ensuite inoculé par des micro-organismes qui sont essentiellement électro actifs. Très souvent, les bactéries utilisées dans de telles expériences appartiennent aux genres *Geobactere* et *Shewanella*. Après la mise en place de ce montage, la création de L'anaérobiose se fait par une injection d'azote (N<sub>2</sub>) pendant 20 minutes sous agitation. Les électrodes sont enfin reliées à un potentiostat pour le lancement des mesures : voltamètre cyclique, chronométrie potentiomètre, chronométrie ampèremètre dans le but de suivre le comportement électrochimique des micro-organismes .(Bertello, 2016 ; Dumas, 2007 ; ketep,2012).

Dans notre travail, nous nous sommes fixés comme objectif le montage d'une pile à combustible microbienne avec les moyens disponibles dans nos laboratoires de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de Saida. En effet, en raison du manque de la cellule électrochimiques, les dispositifs de mesure spécialisés et la mousse de carbone nous avons conçu un montage simplifié (Figure 21). Pour aborder le sujet, nous nous sommes particulièrement intéressés à la méthode du suivi la production de l'énergie électrique des micro-organismes. Nous avons alors choisi l'utilisation d'un multimètre qui mesure le courant entre les électrodes et détermine ainsi la différence du potentiel. Ce dernier reflète la circulation des électrons libérés suite aux différentes réactions biochimiques élaborées par les cellules bactériennes.

Dans un deuxième temps, Nous avons opté pour l'utilisation de deux électrodes au lieu de trois. L'une est composée du polystyrène (anode) et l'autre d'une plaque de cuivre (cathode).

Les mesures des courants électriques ont été alors réalisées sur huit jours.

#### IV.2. Résultats obtenus:

- **Tableau4:** la mesure du courant électrique en volt pendant 8 jours.

temps	E coli	Clostridium .b	Mix (volt)
0	0	0	0
1 jour	0	0	0
2 jours	0	0	0
3jours	0	0	0
4jours	Week-end	Week-end	Week-end
5jours	Week-end	Week-end	Week-end
6jours	0	0	0
7jours	0	0	0
8jours	0	0	0

- Comme le montre dans le tableau, aucun courant électrique a été mesuré dans les huit jours.

### **IV.3. Justification des résultats négatifs de l'expérience:**

Les résultats obtenus au cours de cette expérience se sont révélés négatifs.

Nous n'avons pas pu concevoir un nouvel ensemble de piles à combustible microbiennes modifiées dans la limite de nos possibilités tout en conservant le principe général du montage traditionnel.

Ce travail n'est qu'une ébauche pour d'autres expérimentations plus approfondies.

Premièrement, il est possible que certains facteurs non anticipés aient influencé les résultats. Par exemple, le manque de la cellule électrochimiques, les dispositifs de mesure spécialisés et la mousse de carbone auraient pu jouer un rôle dans la déviation des résultats par rapport aux attentes. Cela met en lumière la nécessité de contrôler ces variables plus rigoureusement dans de futures expérimentations.

Deuxièmement, la méthodologie employée mérite d'être réévaluée. Les résultats négatifs pourraient indiquer que certaines étapes du protocole expérimental doivent être ajustées ou améliorées. Cette expérience sert donc de point de départ pour affiner la méthode et, potentiellement, obtenir des résultats plus précis et concluants.

Enfin, les résultats négatifs permettent d'éliminer certaines hypothèses et d'affiner la recherche. En science, le fait de prouver qu'une hypothèse est incorrecte est tout aussi précieux que de démontrer sa validité, car cela oriente les recherches futures dans des directions plus prometteuses.

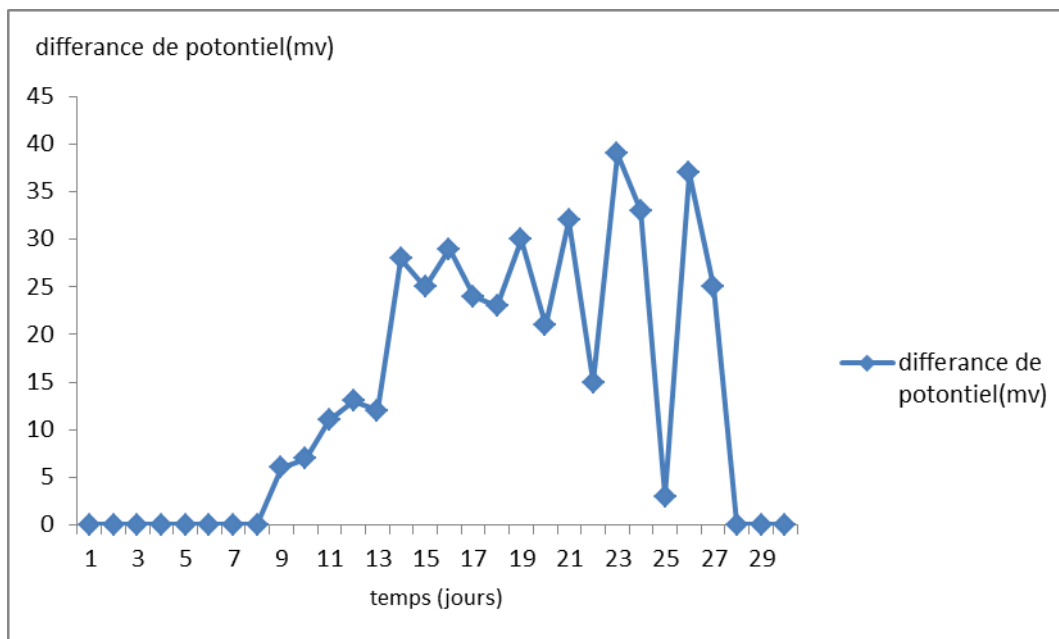
En conclusion, bien que l'expérience n'ait pas produit les résultats escomptés, elle demeure riche en enseignements. Elle offre des pistes d'amélioration pour les futures expériences et participe à l'évolution de la compréhension du sujet étudié.



#### IV.4. lancement de la biopile fonctionnant avec le lixiviat de fumier de cheval:

Le graphique ci-dessus illustre l'évolution de la différence de potentiel (en millivolts) mesurée au fil du temps (en jours) dans une biopile. Le potentiel généré est directement lié à l'activité métabolique des micro-organismes au sein de la biopile.

Dans ce graphique, nous observons la variation de la différence de potentiel sur une période de 30 jours. Au début, la biopile montre une période d'inactivité, suivie d'une augmentation rapide de la production de potentiel, qui fluctue ensuite avant de chuter à nouveau. Ces variations reflètent l'évolution des processus électrochimiques et biologiques à l'intérieur du système. L'objectif de cette étude est de mieux comprendre la dynamique de production d'électricité dans la biopile et d'analyser les facteurs influençant ces variations.



**Figure 25:** Différence de potentiel mesurée en fonction du temps de la biopile.

Au début ( 1 à 10jours), la différence de potentiel reste stable à zéro( 0 mV) ,

Cette phase correspond à une période de latence, où l'activité électrochimique est encore faible ou absente. Pendant cette période, la biopile n'a pas encore commencé à produire un courant mesurable, ce qui peut s'expliquer par des facteurs liés à l'adaptation ou à l'équilibre du système électrochimique. Les micro-organismes présents sont probablement en train de s'adapter à leur environnement électrochimique.

En revanche, les résultats de l'expérience de (Goussas et Bakhti ,2016) indiquent que dès les premières heures de son lancement avec le lixiviat de fumier de cheval, cette biopile débite une certaine différence de potentiel.

Le voltamogramme montre une augmentation rapide de l'énergie électrique (de 70,8 mV jusqu'à 106 mV). Cette augmentation peut être expliquée par le fait que les réactions mises en jeu sont de nature purement chimique puisque le biofilm n'a pas eu le temps de se former.

À partir du 10<sup>ème</sup> jours, on observe une augmentation soudaine du potentiel, atteignant environ (25 mV à 12<sup>ème</sup> jours). Cette montée rapide peut être attribuée à l'activation des processus électrochimiques dans la biopile. À ce stade, les micro-organismes sont probablement pleinement actifs et commencent à transférer les électrons de manière plus efficace à l'anode, ce qui génère un potentiel mesurable.

Contrairement à l'autre expérience , elles ont trouvé que à partir du 3<sup>ème</sup> jour, le potentiel a diminué de manière progressive, atteignant 18,3 mV au 8<sup>ème</sup> jour, en raison de l'épuisement des nutriments dans le lixiviat de fumier de cheval.

Au 8<sup>ème</sup> jour et suite à la chute du potentiel, elles ont procédé à l'alimentation de la biopile par un ajout de l'acétate de sodium dans le compartiment anodique. Le potentiel débité par la biopile a augmenté jusqu'à une valeur maximale de 48.2 mV au 10<sup>ème</sup> jour pour former un pic au-delà duquel le potentiel rechuté.

Donc, nous pouvons conclure que l'addition d'acétate n'a pas eu l'effet attendu puisque les potentiels obtenus avec ce substrat sont faibles.

Entre les jours 12<sup>ème</sup> et 25<sup>ème</sup>, la différence de potentiel fluctue entre (20 mV et 35 mV). Ces variations peuvent être le signe de changements dans l'efficacité du transfert d'électrons au niveau de l'anode, potentiellement influencés par l'évolution de la population microbienne ou des conditions électrochimiques à l'intérieur de la biopile. Les

---

biofilms formés par les micro-organismes peuvent également affecter la conductivité et la distribution des charges, entraînant des pics et des baisses dans la production de courant. Des phénomènes tels que la résistance interne de la biopile peuvent également influencer ces variations.

Après le jour 25, une diminution brutale de la différence de potentiel est observée, jusqu'à atteindre de nouveau (0 mV) vers le jour 29. Cette chute peut indiquer un affaiblissement du transfert d'électrons ou des conditions électrochimiques qui ne sont plus favorables à la génération de potentiel. Cela pourrait être dû à une diminution de l'efficacité du biofilm microbien, à une perturbation du système ou à une fin naturelle du processus d'oxydation.

Le fonctionnement de la biopile repose sur la capture des électrons libérés par les réactions métaboliques au niveau de l'anode, et leur transfert à la cathode. La différence de potentiel générée dépend de l'efficacité de ce transfert. Les fluctuations observées dans ce graphique montrent que la biopile connaît des phases d'activité variable, influencées par l'état des biofilms microbiens, la résistance interne de l'appareil, et les conditions environnementales.

les résultats de notre expérience suggèrent présente une longue phase de latence (1 à 10 jours) avec un potentiel stable à 0 mV. Le potentiel ne commence à apparaître qu'à partir du dixième jour, avec des fluctuations mineures entre 20 mV et 35 mV. La chute brutale après le 25ème jour indique une faible réaction et un épuisement plus rapide des nutriments.

Comparativement à notre expérience, la deuxième montre une meilleure performance grâce à l'adaptation rapide des micro-organismes aux conditions électrochimiques. On observe une augmentation rapide du potentiel (de 70,8 mV à 106 mV) dès les premières heures, indiquant des réactions chimiques actives avant la formation du biofilm. Avec le temps, la production de courant s'améliore considérablement grâce à la présence de micro-organismes électro actifs et à l'utilisation de l'acide lactique comme carburant, la membrane Nafion et CMX spécifique au transfert ionique et un prototype à deux compartiments, atteignant un pic de 271 mV.

## IV.5. Etude microbiologique de la biopile fonctionnant avec le lixiviat de fumier de cheval :

### IV.5.1: Isolements et purifications des espèces bactériennes électro-actives :

Après l'ensemencement et l'incubation (en aérobie ) d'un échantillon prélevé à partir du biofilm formé sur la surface de la bioanode de la pile à combustible microbienne, des colonies à différents aspects macroscopiques et microscopiques sont apparues. Après une étape de purification, deux (02) types de colonies en aérobie:

✓ L'un avec des colonies présentant une couleur jaune saumon. Cette couleur résultant de la fermentation de l'un des glucides (lactose, saccharose, salicine) contenant dans la gélose Hektoen. Elles sont donc saccharose et/ou lactose et/ou salicine positives

✓ L'autre avec des colonies présentant une couleur verte. Ce qui signifie que ces espèces bactériennes n'utilisent aucun des glucides du milieu. Elles sont donc saccharose, salicine et lactose négatives.



**Figure 26:** Aspect des colonies dans la gélose Hektoen après L' incubation.

### IV.5.2: Caractérisations phénotypiques des isolats :

#### IV.5.2.1: Aspect macroscopique :

**Tableau 5:** Caractéristiques macroscopiques des colonies bactériennes

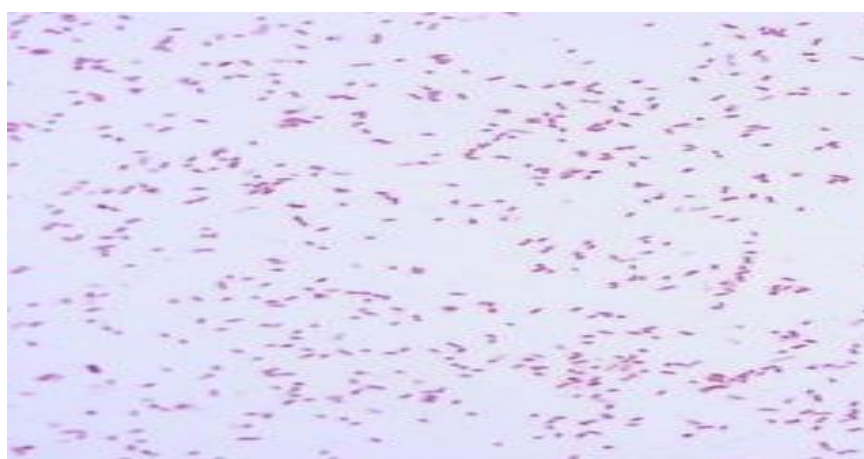
Espèces bactériennes selon le milieu	Aspect des colonies				
	Couleur	forme	Relief	Aspect de la surface	Consistance
Gélose Hektoen en aérobic	Jaune Saumon	Ronde	Plate	Lisse	Muqueuse
Gélose Hektoen en aérobic	verte	Envahissante	Plate	Lisse	Muqueuse

Les résultats de l'examen macroscopique des espèces bactériennes sont mentionnés dans le tableau.

#### IV.5.2.2. Aspect microscopique:

##### a-Résultats de la coloration de Gram pour les colonies vertes en aérobiose:

Les colonies ayant la couleur verte, prélevées a partir du milieu gélose Hektoen et incubées en aérobiose (HAV), présentent un aspect microscopique sous forme de petits bacilles unicellulaires présentant une couleur rose. Donc, ce sont des bacilles Gram négatif.



**Figure 27 :** Aspect microscopique de l'espèce bactérienne HAV après la coloration de Gram (Observation par microscope optique G×100 a immersion).

### **b-Résultats de la coloration de Gram pour les colonies jaunes saumon en aérobiose :**

Les colonies présentant la couleur jaune saumon, prélevées à partir du milieu gélose Hektoen, et incubées en aérobiose, présentent un aspect microscopique sous forme de bacilles en chaînette présentant une couleur rose. Donc, ce sont des bacilles en chaînette Gram négatif.



**Figure 28:** Aspect microscopique de la souche HAO après la coloration de Gram (Observation par microscope optique Gx100 à immersion) .

### **IV.5.3:Caractéristiques biochimiques des isolats :**

Les résultats de la caractérisation biochimique sont les suivants:

#### **IV.5.3.1:Mise en évidence d'enzyme respiratoire :**

D'après les résultats représentés dans le tableau , toutes les espèces bactériennes étudiées sont à catalase positive. Elles peuvent être aérobies ou aéro-anaérobies facultatives.

La souche selon milieu de culture	catalase
Hav	+
Hao	+

(+):résultat positif.(-):résultat négatif



**Figure29:** exemple d'un résultats de la recherche de la catalase( résultat (+)).

#### IV.5.4:Résultats des plaques API 20 E:

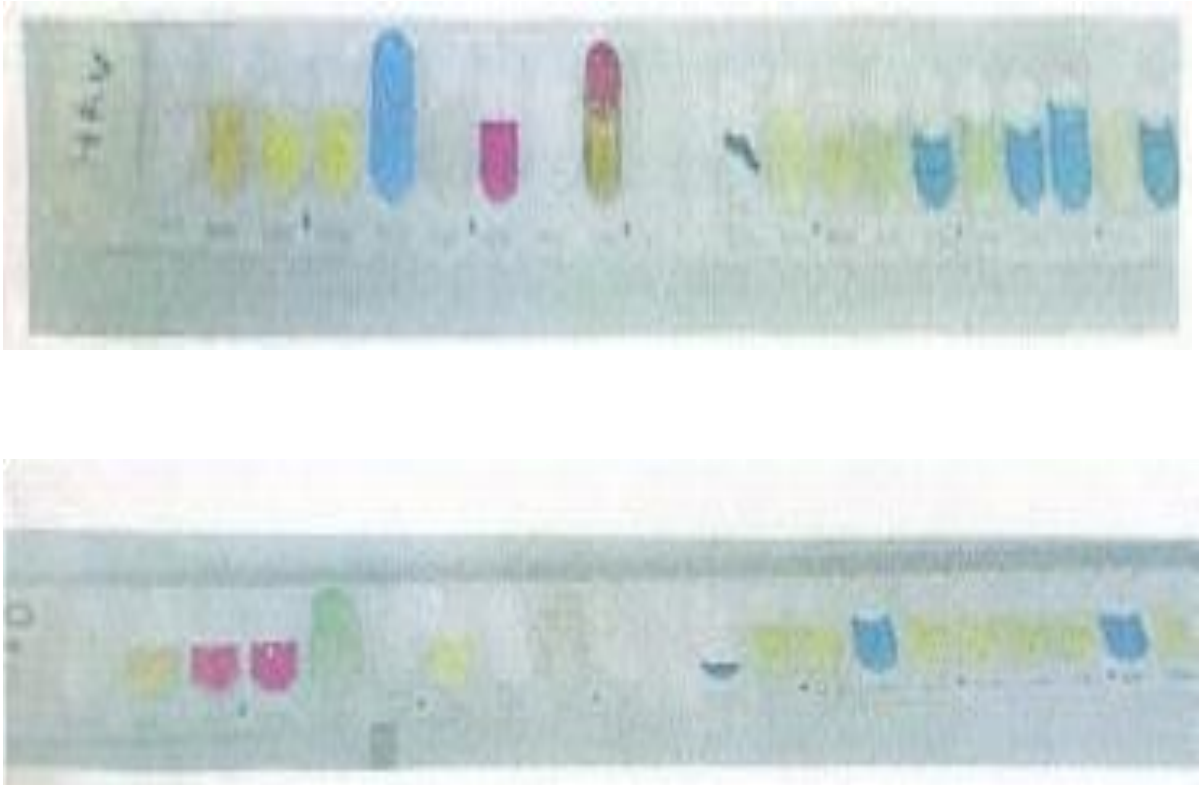
En complétant les tests biochimiques en utilisant des plaques API 20 E, deux (02) espèces bactériennes ont été sélectionnées et identifiées. Les résultats obtenus sont interprétés par le logiciel « API feuille de calcul pour l'identification microbienne ». La lecture repose sur le changement de la coloration initiale des différents milieux. Cette lecture se fait soit directement, soit après l'addition des réactifs de révélation.

Le tableau présente les résultats obtenus à partir de la lecture de galeries des deux (02) espèces bactériennes.

**Tableau 6** : résultat des plaques API20E, des deux espèces bactériennes sélectionnées.

Test	Espèce	Jaune saumon en aérobie	Vert en aérobie
	ONPG	+	-
	ADH	-	-
	LDC	+	-
	ODG	+	-
	CIT	-	+
	H <sub>2</sub> S	-	-
	URE	-	+
	IND	-	+
	VP	-	-
	GEL	-	-
	GLU	+	+
	MAN	+	+
	INO	-	+
	SOR	+	-
	RHA	+	+
	MEL	+	-
	AMY	-	+
	ARA	+	-
	SAC	+	-





**Figure30:** Résultats des galeries API 20 E après l'incubation.

Selon le tableau , et en se basant sur le logiciel « API feuille de calcul pour l'identification microbienne » les souches que nous avons caractérisées sont :

a. La souche HAV forme les colonies de couleur verte, correspondent à l'espèce bactérienne : *Providencia rettgeri*.

b. La souche HAO formant les colonies de couleur jaune saumon, correspondent à la souche bactérienne : *Escherichia. colil*.

Dans la littérature nous trouvons des bactéries tels que *Geobacter sulfurreducens*, *Geobacter metallireducens*, *Rhodoferrax ferrireducens*, *Desulfuromonas acetoxidans*, *Geothrix fermentans* et *Shewanella putrefaciens*. Ces souches sont de plus en plus utilisées dans des piles à combustible microbiennes ou dans des réacteurs électrochimiques. Quelques tests, montrant le caractère électrogène, ont été également effectués avec les bactéries comme *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli* ou *Clostridium butyricum* . Les études sur les représentants de la famille Firmicutes ou *Acidobacteria* , les espèces *Acidiphilium cryptum* , *Geopsychrobacter electrodiphilus* , *Rhodopseudomonas palutris* ainsi que les levures *Saccharomyces cerevisiae* et *Hansenula anomala* n'ont pas été poursuivi car les densités de courant n'avaient atteint que quelques dizaines ou centaines de mA/m<sup>2</sup>.

---

## Conclusion Générale

Ce travail de projet de master présenté une démarche de recherche appliquée à la frontière entre l'électrochimie, la microbiologie et les bioprocédés. Il vise plus particulièrement à développer une nouvelle filière de production d'énergie propre et renouvelable à partir de la technologie « piles à combustible microbiennes ».

Au cours de cette étude nous avons procédé à la conception d'un prototype d'une pile à combustible microbienne pour la production d'électricité au niveau du laboratoire. Il s'agit de la deuxième thématique effectuée au niveau de l'université de Saida, dans le domaine de la technologie des biopiles. Cette étude a permis d'apporter un premier bilan sur cette technologie innovante. D'un point de vue général, très peu d'études ont été réalisées dans ce domaine notamment avec le lixiviat du fumier de cheval qui est un substrat très riche en matières organiques.

L'objectif principal de cette étude était de développer une biopile microbienne fonctionnelle et économique, utilisant le fumier de cheval comme source de substrat. À travers la conception d'un prototype à un seul compartiment, nous avons pu suivre la charge électrique produite par les micro-organismes et analyser la communauté microbienne associée à l'anode de la biopile.

Les résultats obtenus montrent que le lixiviat de fumier de cheval contient une communauté microbienne capable de produire de l'énergie électrique. En isolant et en identifiant les espèces ayant une activité électrochimique, nous avons pu tester le rendement de chaque espèce bactérienne en utilisant des biopiles monoculturelles.

La dernière partie de cette étude, nous avons procédé à la détermination des souches ayant le caractère électro-actif en procédant à un prélèvement à partir du biofilm formé sur l'anode par les méthodes classiques d'identification bactérienne. Deux souches ont été isolées à savoir : *Escherichia Coli* espèce déjà connue pour ses propriétés électro-actives et *Providencia Rettgeri*

Nous avons pu concevoir un nouveau montage de la pile à combustible microbienne adaptés à nos moyens tout en gardant le principe général du montage conventionnel

Ces avancées ouvrent de nouvelles perspectives dans le domaine de l'énergie renouvelable, en particulier dans la valorisation des déchets organiques. Néanmoins, il reste des défis à relever, notamment en termes d'optimisation du rendement électrique et de durabilité à grande échelle.

---

**Annexe**
**1. Préparation des milieux de cultures utilisés****a. Milieu gélosé nutritif**

Peptone.....	15g
Extrait de viande.....	10g
Extrait de levure.....	0.2g
Chlorure de sodium.....	0.5g
Agar.....	20g
Eau distillé.....	1000ml
PH = 6.8-7.4	

**b. Milieu gélose Hektoen**

Peptone pepsique de viande.....	12g
Extrait autolytique de levure.....	2g
Lactose.....	12g
Saccharose.....	12g
Saliciline .....	2g
Sels biliaires.....	9g
Chlorure de soduim.....	5g
Thiosulfate de soduim .....	5g
Citrate ferrique ammoniacal .....	1.5g
Bleu de bromothymol .....	65mg
Fuschine acide. ....	40mg
Agar agar bactériologique. ....	13.5g
Eau distillée.....	1000ml
pH du milieu 7.6 +/- 0.2	

---

**c.milieu Luria-Bertani**

peptone.....	10g
extrait de levures.....	5g
NaCl.....	10g

**d.milieu viande foie**

base viande foie:.....	30,0g
glucose:.....	2,0g
agar:.....	6,0g

pH = 7,4

---

**les réactions biochimiques des galeries API 20 E**

Tests	Substrats	Réactions/Enzymes	Réactifs de révélation	Résultats positifs	Résultats négatifs
ONPG	ONPG	B-galactosidase		Jaune	Incolore
ADH	Arginine	Arginine décarboxylase		Rouge	Jaune
LDC	Lysine	Lysine décarboxylase		Rouge	Jaune
ODG	Ornithine	Ornithine décarboxylase		Rouge	Jaune
URE	Urée	Uréase		Rose	Orange
VP	Glucose Pyruvate	Production d'acétoine	VP1+VP2	Rose Rouge	incolore
GEL	Gélatine	Gélatine		Diffusion du charbon	inchangé
CIT	Citrate de sodium	Utilisation du citrate		Bleu	Vert
H <sub>2</sub> S	Sulfat de sodium	Production d'H <sub>2</sub> S		Noir	incolore
IND	Tryptophane	Tryptophanase	1goutte de Kovacs	Anneau rouge	Anneau incolore
MAL	Malonate de soduim	Utilisation du malonate		Bleu	Jaune vert
GLU MAN SAC SOR RHA INO MEL AMY	Glucose Mannitol Saccharose Sorbitol Rhamnose Inositol D-melibiose Amygdaline	fermentation		Jaune	Bleu

---

**Références bibliographiques:**

1. SALEM, MOUSSAOUI MOHAMMED et HOUARI, MAMMERI. Modélisation et simulation d'un système hybride (Photovoltaïque–Pile à combustible).
2. NETTARI, Mohammed. Simulation numérique du phénomène de transfert de chaleur dans une pile à combustible à oxyde solide (SOFC) de type Tubulaire. Thèse de doctorat. UNIVERSITE KASDI MERBAH OUARGLA.
3. Fatima, K. O. R. B. A. A. (2019). Etude de l'influence de la température d'hydrogène sur la tension de la pile à combustible (PAC) (Doctoral dissertation).
4. MANSOURI, A., & MANSOURI, K. *Etude et simulation des performances des piles à combustible à hydrogène dans des applications statiques et dynamiques* (Doctoral dissertation, Université KASDI-MERBAH Ouargla).
5. Touahir, A. (2008). *Simulation Numérique de Transfert de Chaleur dans une Pile SOFC sous L'effet des Différents Paramètres de Fonctionnement et des Caractéristiques Physiques* (Doctoral dissertation).
6. BENHAKKOU, Hidayat Allah et ABID, Katar Nada. Dimensionnement et Modélisation d'un Système Hybride (Pile à combustible et Batterie lithium-ion). Thèse de doctorat. UNIVERSITE KASDI MERBAH OUARGLA.
7. OUAGUENI, Fayssal. Modélisation et commande des piles à combustible. 2021. Thèse de doctorat. Université Mohamed Khider–Biskra.
8. CHAIMA, A. (2021). Synthèse de spinelle Zn (1-x) CuxCo2O4 par la méthode sol-gel pour un matériau cathode dans les piles à combustible Jury.
9. Mabrouk, W. (2012). *Synthèse et caractérisation de nouvelles membranes protoniques: Applications en pile à combustible à membrane échangeuse de protons* Doctoral dissertation, Conservatoire national des arts et métiers-CNAM; Université Tunis El Manar. Faculté des Sciences Mathématiques, Physiques et Naturelles de Tunis (Tunisie)).
10. Mohamed, A. A. (2008). *Conception d'un automatisme programmé pour le contrôle d'humidité du séchoir de la briqueterie d'IRDJEN* (Doctoral dissertation, Université Mouloud Mammeri).



- 
11. LABBÉ, Julien. *L'Hydrogène électrolytique comme moyen de stockage d'électricité pour systèmes photovoltaïques isolés*. 2006. Thèse de doctorat. École Nationale Supérieure des Mines de Paris.
  12. Peyrelade, E. (2005). *Élaborations et caractérisations électrochimiques et physiques de matériaux d'anode de PEMFC peu sensibles à l'empoisonnement par CO: étude d'alliages et de composites à base de platine-molybdène et de platine-tungstène* (Doctoral dissertation, Institut National Polytechnique de Grenoble-INPG).
  13. Rouhet, M. (2014). *Etude de l'influence des protons sur la réduction de l'oxygène dans des couches catalytiques ordonnées en vue d'une application en pile à combustible* (Doctoral dissertation, Université de Strasbourg).
  14. Boukedjouta, I., Aliouane, M., & Saouadel, A. E. (2023). *Elaboration et caractérisation d'une cathode de type spinelle dope par Zn* (Doctoral dissertation, Université de Jijel).
  15. Artefact, H. S. (2015). *Histoire des mobilités électriques (XIXe-XXIe siècles)*.
  16. Fauchoux, S., Hue, C., & Nicolai, I. (2010). *TIC et développement durable: Les conditions du succès*. De Boeck Supérieur.
  17. Jemeï, S. (2019). *Hybridation, diagnostic et pronostic de piles à combustible: durabilité et fiabilité*. ISTE Group.
  18. Masaitis, J. *Chapitre 73-La sidérurgie*.
  19. Geitmann, S. (2007). *Énergies renouvelables & carburants alternatifs: de nouvelles énergies pour l'avenir*. Hydrogeit Verlag.
  20. TAOULI, S., & MEHADJI, N. (2023). *ESTIMATION DU POTENTIEL DE PRODUCTION ELECTRIQUE PAR DIGESTION ANAEROBIE DES DECHETS A TLEMCEM* (Doctoral dissertation, Directeur: Mme FARADJI Djamila Nee KHERBOUCHE/Co-Directeur: Mme GHOMRI Amina).
  21. Kuhn, V. (2015). *Capture opportuniste d'énergie micro-onde pour l'autonomie des objets communicants* (Doctoral dissertation, Télécom Bretagne; Université de Bretagne Occidentale).

- 
22. Quemeneur, M. (1996). Analyse des lipides en tant que cofacteurs des contaminants organiques dans les organismes marins.
  23. BELOUASSA, K. (2015). Modélisation et Optimisation des Phénomènes de Transfert de Matière dans les Piles A Combustible Microbiennes (PACMs) (Doctoral dissertation).
  24. Kalloum, S., Khelafi, M., Djaafri, M., Tahri, A., & Touzi, A. (2007). Etude de l'influence du pH sur la production du biogaz à partir des déchets ménagers. *Journal of Renewable Energies*, 10(4), 539-543.
  25. Smida, H. (2017). *Modulation de l'interface entre biofilms microbiens électroactifs et surface d'électrode: modifications de surface et effets de milieux* (Doctoral dissertation, Université de Rennes).
  26. Albano, M. G., de Andrade, V., Léocadie, M., & d'Ivernois, J. F. (2016). Évolution de la recherche internationale en éducation du patient: une analyse bibliométrique. *Education Thérapeutique du Patient-Therapeutic Patient Education*, 8(1), 10103.
  27. Quezada, B. C. (2009). *Traitement de déchets issus de l'industrie agro-alimentaire par pile à combustible microbienne* (Doctoral dissertation, Institut National Polytechnique de Toulouse-INPT).
  28. Ketep, F. (2012). Piles à combustible microbiennes pour la production d'électricité couplée au traitement des eaux de l'industrie papetière (Doctoral dissertation, Université de Grenoble).
  29. Kalloum, S., Khelafi, M., Djaafri, M., Tahri, A., & Touzi, A. (2007). Etude de l'influence du pH sur la production du biogaz à partir des déchets ménagers. *Journal of Renewable Energies*, 10(4), 539-543.
  30. Malika, H., & Thafsouth, H. (2012). Modélisation et simulation d'une pile à combustible (SOFC) (Doctoral dissertation, Université Mouloud Mammeri)..
  31. BELOUASSA, K. (2015). *Modélisation et Optimisation des Phénomènes de Transfert de Matière dans les Piles A Combustible Microbiennes (PACMs)* (Doctoral dissertation).

- 
32. BERGEL, A. (2012) *Etude des biofilms électroactifs issus des milieux humides de la Guyane Française* (Doctoral dissertation, Université des Antilles et de la Guyane).
  33. Rodrigues, S. (2014). *Caractérisation et contrôle du biofilm de Vibrio tapetis, pathogène de la palourde japonaise Ruditapes philippinarum* (Doctoral dissertation, Université de Bretagne Sud).
  34. Auclair, M. C., Carlier, M. M. F., Chatenay, M. D., Ott, M. A., & van Oudenaarden, M. A. La propulsion par polymérisation d'actine sondée par micromanipulation.
  35. Girard, M. (2009). Attachement des norovirus aux surfaces inertes et évaluation de leur sensibilité aux désinfectants domestiques.
  36. de Soutenance, J. *Élaboration des piles à combustible microbiennes par la plante Lierre Scindapsus.*
  37. Imane, B. (2019). *Etude de la production de l'énergie électrique à partir d'une plante Lierre Scindapsus.* Université Badji Mokhtar, Annaba.
  38. Ketep, F. (2012). *Piles à combustible microbiennes pour la production d'électricité couplée au traitement des eaux de l'industrie papetière* (Doctoral dissertation, Université de Grenoble).
  39. LAPERRIÈRE, Raphaël. Dimension: px Commencer à balayer dès la page.
  40. Saur, T. (2014). *Structuration morphologique et microbiologique des biofilms multi-espèces: de l'adhésion au biofilm mature* (Doctoral dissertation, Université Montpellier II-Sciences et Techniques du Languedoc).
  41. BENSABER, Asmaà et BERICHI, Nassima. Analyse microbiologique des eaux des plages de la ville de Ain Temouchent. 2020.
  42. BEDJADJ, Souad. *Contribution à l'étude des caractéristiques microbiologiques des sols dans la région de Ouargla (Cas de l'exploitation de l'Université de Ouargla).* 2011. Thèse de doctorat. UNIVERSITE KASDI MERBAH-OUARGLA.
  43. BERGEL, A. (2012). *Etude des biofilms électroactifs issus des milieux humides de la Guyane Française* (Doctoral dissertation, Université des Antilles et de la Guyane).

- 
44. SALVIN, Paule. Study of electroactive biofilms from wetlands of French Guiana: application to microbial fuel cells. 2012.
45. RICHARD, Damien. *Microévolution et adaptation à une pression de sélection anthropique chez Xanthomonas citri pv. citri, une bactérie pathogène des agrumes: dynamique du compartiment plasmidique*. 2019. Thèse de doctorat. Université de la Réunion.
46. Lang, J. (2013). *Intrication des signalisations opine, quorum-sensing et GABA chez le phytopathogène Agrobacterium tumefaciens: conséquences sur la colonisation de l'hôte et la dissémination des gènes plasmidiques* (Doctoral dissertation, Université Paris Sud-Paris XI).
47. Roux, A., & Ghigo, J. M. (2006). Les biofilms bactériens. *Bulletin de l'Académie vétérinaire de France*, 159(3), 261-268.
48. TREMBLAY, Yannick DN, HATHROUBI, Skander, et JACQUES, Mario. Les biofilms bactériens: leur importance en santé animale et en santé publique. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 2014, vol. 78, no 2, p. 110-116.
49. Chaker, H. (2012). *Régulation de l'adaptation de la bactérie Pseudomonas aeruginosa à son hôte: implication des métabolites du tryptophane* (Doctoral dissertation, Université de Grenoble).
50. SELLAMI, Hassen. *Technological choices and development: the energy conservation case in the Tunisian industry*. Ecole Centrale des Arts et Manufactures, 1988.
51. Obeizi, Z., Benbouzid, H., & Djahoudi, A. (2021). Évaluation de l'activité antibactérienne et anti-biofilm des nanoparticules de dioxyde d'étain (SnO<sub>2</sub>).
52. ROUX, Agnès et GHIGO, Jean-Marc. Les biofilms bactériens. *Bulletin de l'Académie vétérinaire de France*, 2006, vol. 159, no 3, p. 261-268.
53. ASSAM, Hanane, AYADI, Amira, et BAGHDAD, Mohamed Abdelaziz. *Etude de biofilm positif et des propriétés adhésives d'une bactérie lactique d'intérêt*. 2023. Thèse de doctorat. Université Ibn Khaldoun.
-

- 
54. FEDEREAU, Alexander. La valeur Gaïa. *VertigO-la revue électronique en sciences de l'environnement*, 2020, no Hors-série 32.
55. J.W. Costerton, P.S. Stewart, E.P. Greenberg. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284, 1318-1322.
56. K. Sauer, M.C. Cullen, A.H. Rickard, L.A.H. Zeef, D.G. Davies, P. Gilbert. 2004. Characterization of nutrient-induced dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm. *J. Bacteriol.* 186, 7312-7326.
57. R.M. Allen, H.P. Benetto. 1993. Microbial fuel cell. *Appl. Biochem. Biotechnol* 39, 27\_40.
58. R.A. Bullen, T.C. Arnot, J.B. Lakeman, F.C. Walsh. 2005. Biofuel cells and their development. *Biosens. Bioelectron.* 21, 2015-2045.
59. A.K. Shukla, P. Suresh, S. Berchmans, A. Rajendran. 2004. Biological fuel cells and their applications. *Curr. Science* 87, 455-468.
60. C.E. Reimers, P. Girguis, H.A. Stecher III, L.M. Tender, N. Ryckelynck, P. Whaling. 2006. Microbial fuel cell energy from an ocean cold seep. *Geobiology* 4, 123-136.
61. N.T. Phung, J. Lee, K.H. Kang, I.S. Chang, G.M. Gadd, B.H. Kim. 2004. Analysis of microbial diversity in oligotrophic microbial fuel cells using 16rDNA sequences. *FEMS Microbiol. Lett.* 223, 77-82.
62. B.E. Logan. 2005. Simultaneous wastewater treatment and biological electricity generation. *Water Sci. Technol.* 52, 31-37.
63. D.E. Holmes, D.R. Bond, R.A. O'Neil, C.E. Reimers, L.R. Tender, D.R. Lovley. 2004a. Microbial communities associated with electrodes harvesting electricity from a variety of aquatic sediments. *Microb. Ecol.* 48, 178-190.
64. N. Ryckelynck, H.A. Stecher III, C.E. Reimers. 2005. Understanding the anodic activity. mechanism of a seafloor fuel cell: interactions between geochemistry and microbial Biogeochemistry 76, 113-139.

- 
65. C.N. Reimers, P. Girguis, H.A. Stecher III, L.M. Tender, N. Ryckelynck, P. Whaling. 2006. Microbial fuel cell energy from an ocean cold seep. *Geobiology* 4, 123-136.
  66. K. Rabaey, G. Lissens, S.D. Siciliano, W. Verstrate. 2003. A microbial fuel cell capable of converting glucose to electricity at high rate and efficiency. *Biotechnol. Lett.* 25,1531\_1535.
  67. Lee, N.T. Phung, I.S. Chang, B.H. Kim, H.C. Sung. 2003. Use of acetate for enrichment of electrochemically active microorganisms and their 16S DNA analyses. *FEMS Microbiol. Lett.* 223, 185-191.
  68. B.H. Kim, H.S. Park, H.J. Kim, G.T. Kim, I.S. Chang, J. Lee, N.T. Phung. 2004. Enrichment microbial community generating electricity using a fuel-cell-type electrochemical cell. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63, 672-681.
  69. P. Aelterman, K. Rabaey, H.T. Pham, N. Boon, W. Verstraete. 2006. Continuous electricity generation at high voltages and currents using stacked microbial fuel cells. *Environ. Sci. Technol.* 40, 3388-3394.
  70. J.K. Jang, I.S. Chang, H. Moon, K.H. Kang, B.H. Kim. 2006. Nitritotriacetic acid degradation under microbial fuel cell environment. *Biotechnol. Bioeng.* 95, 772-774.
  71. C.E. Reimers, P. Girguis, H.A. Stecher III, L.M. Tender, N. Ryckelynck, P. Whaling. 2006. Microbial fuel cell energy from an ocean cold seep. *Geobiology* 4, 123-136.
  72. D.E. Holmes, D.R. Bond, R.A. O'Neil, C.E. Reimers, L.R. Tender, D.R. Lovley. 2004a. Microbial communities associated with electrodes harvesting electricity from a variety of aquatic sediments. *Microb. Ecol.* 48, 178-190.
  73. B.E. Logan, J.M. Regan. 2006. Electricity-producing bacterial communities in microbial fuel cells. *Trends Microbiol.* 14, 512-518.
  74. D.R. Lovley. 2006a. Microbial fuel cells: novel microbial physiologies and engineering approaches. *Curr. Opin. Biotechnol.* 17, 327-332.

- 
75. D.E. Holmes, D.R. Bond, D.R. Lovley. 2004b. Electron transfer by *Desulfobulbus propionicus* to Fe(III) and graphite electrodes. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 1234-1237.
76. B.A. Methé, K.E. Nelson, J.A. Eisen, I.T. Paulsen, W. Nelson, J.F. Heidelberg, D. Wu, M. Wu, N. Ward, M.J. Beanan, R.J. Dodson, R. Madupu, L.M. Brinkac, S.C. Daugherty, R.T. DeBoy, A.S. Durkin, M. Gwinn, J.F. Kolonay, S.A. Sullivan, D.H. Haft, J. Selengut, T.M. Davidsen, N. Zafar, Whit. 2003. Genome of *Geobacter sulfurreducens*: metal reduction in subsurface environments. *Science* 302 1967-1969.
77. M. Coppi, C. Leang, D. Lovley, S. Sandler. 2001. Development of a genetic system for *Geobacter sulfurreducens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 3180-3187.
78. B.E. Logan, C. Murano, K. Scott, N.D. Gray, I.M. Head. 2005. Electricity generation from cysteine in a microbial fuel cell. *Water Res.* 39, 942-952.
79. D.E. Holmes, J.S. Nicoll, D.R. Bond, D.R. Lovley. 2004c. Potential role of a novel psychrotolerant member of the family Geobacteraceae, *Geopsychrobacter electrodiphilus* gen. nov., sp. nov., in electricity production by a marine sediment fuel cell. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 6023-6030.
80. B.H. Kim, H.S. Park, H.J. Kim, G.T. Kim, I.S. Chang, J. Lee, N.T. Phung. 2004. Enrichment of microbial community generating electricity using a fuel-cell-type electrochemical cell. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63, 672-681
81. K. Rabaey, N. Boon, S.D. Siciliano, M. Verhaege, W. Verstraete. 2004. Biofuel cells for microbial consortia that self-mediate electron transfer. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 5373-5382.
82. H.J. Kim, M.S. Hyun, I.S. Chang, B.H. Kim. 1999c. A microbial fuel cell type lactate biosensor using a metal-reducing bacterium, *Shewanella putrefaciens*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 9, 365-367
83. D.R. Lovley. 2006c. Bug juice: harvesting electricity with microorganisms. *Nature Reviews Microbiology* 4, 497-508.

- 
84. D.J. Lonergan, H. Jenter, J.D. Coates, E.J.P. Phillips, T. Schmidt, D.R. Lovley. 1996. Phylogenetic analysis of dissimilatory Fe(III)-reducing bacteria. *J. Bacteriol.* 178, 2402-2408.
85. D.E. Holmes, D.R. Bond, R.A. O'Neil, C.E. Reimers, L.R. Tender, D.R. Lovley. 2004a. Microbial communities associated with electrodes harvesting electricity from a variety of aquatic sediments. *Microb. Ecol.* 48, 178-190.
86. K.B. Gregory, D.R. Bond, D.R. Lovley. 2004. Graphite electrodes as electron donors for anaerobic respiration. *Environ. Microbiol.* 6, 596-604.
87. A. Bergel, D. Féron, A. Mollica. 2005. Catalysis of oxygen reduction in PEM fuel cell by seawater biofilm. *Electrochem. Commun.* 7, 900-904.
88. C.E. Reimers, P. Girguis, H.A. Stecher III, L.M. Tender, N. Ryckelynck, P. Whaling. 2006. Microbial fuel cell energy from an ocean cold seep. *Geobiology* 4
89. Richardson, D.J. (2000). Bacterial respiration: a flexible process for a changing environment. *Microbiology* 146, 551-571.
90. Lovley, D.R., Stolz, J.F., and Nord, G.L. (1987). Anaerobic production of magnetite by a dissimilatory iron-reducing microorganism. *Nature* 330, 252 - 254.
91. Lovley, D.R., and Phillips, E.J. (1992). Reduction of uranium by *Desulfovibrio desulfuricans*. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 850-856.
92. Stams, A.J.M., de Bok, F. a M., Plugge, C.M., van Eekert, M.H. a, Dolfing, J., and Schraa,
93. (2006). Exocellular electron transfer anaerobic microbial communities *Environmental Microbiology* 8, 371-382.
94. Rozendal, R. a., Jeremiassen, A.W., Hamelers, H.V.M., and Buisman, C.I.N. (2008).
95. Hydrogen Production with a Microbial Biocathode *Environmental Science & Technology* 42, 629-634.
96. Thurston, C.F., Bennetto, H.P., Delaney, G.M., Mason, J.R., Roller, S.D., and Stirling, J.L. (1985). Glucose Metabolism in a Microbial Fuel Cell. Stoichiometry of Product Formation in a Thionine-mediated *Proteus vulgaris* Fuel Cell and its Relation to Coulombic Yields. *Microbiology* 131, 1393-1401.



97. Babanova, S., Hubenova, Y., and Mitov, M. (2011). Influence of artificial mediators on yeast based fuel cell performance. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 112, 379-387.
98. Stams, A.J.M., de Bok, F. a M., Plugge, C.M., van Eekert, M.H. a, Dolging, J., and Schraa, G. (2006). Exocellular electron transfer in anaerobic microbial communities.
99. Gram, H.C "Über die isolierte Färbung der Schizomyceten in Schnitt- und Trockenpräparaten". *Fortschritte der Medizin* (in German), 1884.
100. Gerhard M, Juhl H, Kalthoff H, Schreiber HW, Wagener C, Neumaier M. *J Clin Oncol* 1994; 12:725-9.
101. BioMérieux SA, *Système d'identification des Enterobacteriaceae et autres bacilles à Gram négatif non fastidieux*, France, 2010.

## Resumé

Les piles à combustible microbiennes sont des cellules capables de convertir directement l'énergie chimique des combustibles organiques en énergie électrique. Dans ces cellules, le carburant est oxydé par des micro-organismes appelés « électroactifs », qui forment des biofilms à la surface de l'anode et agissent comme catalyseurs de réactions électrochimiques. Le but du travail présenté dans ce manuscrit était de créer, aussi simplement et à moindre coût que possible, un prototype de pile à combustible microbienne à chambre unique, utilisant le filtrat de fumier de cheval comme source de biocatalyseur. La conception et la mise en œuvre de cette cellule ont généré de l'énergie électrique sous une tension de 40 millivolts. Ce résultat a confirmé la présence de biofilms formés sur la bioanode de la cellule. Pour mettre en évidence la nature de ces biofilms, une analyse microbiologique a été réalisée visant à identifier la communauté microbienne électriquement active associée à l'anode de la biocellule. Les résultats ont montré la présence de deux souches de bactéries dans le filtrat de fumier de cheval : *E. coli*, connue pour ses propriétés électroactives, et *Providencia rettgeri*. Mots clés : piles à combustible microbiennes, membrane, biofilms, bioanode, bactéries électroactives.

## Summary

Microbial fuel cells are cells capable of converting the chemical energy of organic fuels directly into electrical energy. In these cells, the oxidation of the fuel is carried out by microorganisms known as "electro-active" that form biofilms on the surface of the anode and act as catalysts for the electrochemical reactions. The work presented in this manuscript aimed to create a prototype of a single-chamber microbial fuel cell as simple and economical as possible, using horse manure leachate as a source of biocatalyst. The design and implementation of this microbial fuel cell generated electrical energy with a potential that reached a value of 40 mV. This result confirmed the existence of a biofilm formed on the bioanode of the cell. To highlight the nature of this biofilm, a microbiological analysis aimed at identifying the electrochemically active microbial community associated with the anode of the biocell was undertaken. The results revealed the presence of two bacterial strains in the horse manure leachate: *E. coli*, known for its electro-active properties, and *Providencia rettgeri*. Keywords: microbial fuel cell, membrane, biofilm, bioanode, electro-active bacteria.

## المخلص

في هذه الخلايا، يتم تُعدّ خلايا الوقود الميكروبية خلايا قادرة على تحويل الطاقة الكيميائية للوقود العضوي مباشرةً إلى طاقة كهربائية والتي تشكل أغشية حيوية على سطح الأنود وتعمل كعوامل، "الفعالة كهربائياً"، تُعرف باسم *organismes* تاكسد الوقود بواسطة ميكرو كان الهدف من الأعمال المقدمة في هذا المخطوط هو إنشاء نموذج أولي لخلية وقود ميكروبية ذات مساعدة للتفاعلات الكهروكيميائية لقد أدت تصميم وتنفيذ هذه الخلية إلى توليد غرفة واحدة، بأبسط وأقل تكلفة ممكنة، باستخدام رشيح روث الخيل كمصدر للبيوكاتاليسست لإبراز طبيعة هذه. أكدت هذه النتيجة وجود أغشية حيوية تشكلت على الأنود الحيوي للخلية. مللي فولت 40 طاقة كهربائية بجهد بلغ الأغشية الحيوية، تم إجراء تحليل ميكروبيولوجي يهدف إلى تحديد المجتمع الميكروبي النشط كهربائياً المرتبط بأنود الخلية الحيوية المعروفة بخصائصها الفعالة كهربائياً *E. coli*: أظهرت النتائج وجود سلالتين من البكتيريا في رشيح روث الخيل، وهما خلايا الوقود الميكروبية، غشاء، أغشية حيوية، أنود حيوي، بكتيريا فعالة كهربائياً: الكلمات المفتاحية: *Providencia rettgeri* و