



HAL
open science

Ingénierie électrochimique pour déchiffrer les mécanismes de formation des biofilms électroactifs

Poehere Chong

► **To cite this version:**

Poehere Chong. Ingénierie électrochimique pour déchiffrer les mécanismes de formation des biofilms électroactifs. Génie des procédés. Institut National Polytechnique de Toulouse - INPT, 2018. Français. NNT : 2018INPT0115 . tel-04222970

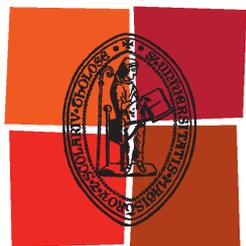
HAL Id: tel-04222970

<https://theses.hal.science/tel-04222970v1>

Submitted on 29 Sep 2023

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

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



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National Polytechnique de Toulouse (Toulouse INP)

Discipline ou spécialité :

Génie des Procédés et de l'Environnement

Présentée et soutenue par :

Mme POEHERE CHONG

le vendredi 23 novembre 2018

Titre :

Ingénierie électrochimique pour déchiffrer les mécanismes de formation
des biofilms électroactifs

Ecole doctorale :

Mécanique, Energétique, Génie civil, Procédés (MEGeP)

Unité de recherche :

Laboratoire de Génie Chimique (L.G.C.)

Directeur(s) de Thèse :

M. ALAIN BERGEL

M. BENJAMIN ERABLE

Rapporteurs :

M. CHRISTOPHE INNOCENT, UNIVERSITE MONTPELLIER 2

Mme WAFA ACHOUAK, CEA CADARACHE

Membre(s) du jury :

Mme KARINE GROENEN SERRANO, UNIVERSITE TOULOUSE 3, Président

M. ALAIN BERGEL, CNRS TOULOUSE, Membre

M. BENJAMIN ERABLE, CNRS TOULOUSE, Membre

Mme KARINE SERVAT, UNIVERSITE DE POITIERS, Membre

Les travaux présentés dans ce manuscrit de thèse ont été réalisés au Laboratoire de Génie Chimique (LGC) au sein du département « Bioprocédés et Systèmes microbiens » de l'Institut National Polytechnique de Toulouse (INPT).

En premier lieu, j'adresse mes sincères remerciements à mes directeurs de thèse : Benjamin Erable et Alain Bergel. Merci pour m'avoir confiée ce sujet innovant malgré les connaissances plutôt légères que j'avais au début de cette thèse sur la microbiologie. Alain, je te remercie pour ta grande disponibilité et surtout ton enthousiasme ! Benjamin, je te remercie pour tes conseils et ton goût du détail ! Je vous remercie tous les deux pour votre investissement, vos idées innovantes et surtout pour m'avoir guidée, conseillée et rassurée tout au long de ses trois années. Votre soutien inconditionnel m'a permis de mener à bien ce projet et jamais je n'oublierai tout ce que vous avez fait. C'est également grâce à vous que j'ai pu participer à des conférences nationales et internationales et cela représente énormément pour une petite polynésienne comme moi ☺ ! Je n'oublie pas le reste de l'équipe : je te remercie Luc pour ton aide sans faille sur la partie technique et pour avoir fait le maximum à chaque fois que j'en avais besoin ! Je te remercie Marie-Line pour tes conseils sur mon futur dans l'enseignement (ne t'inquiète pas je réfléchis sérieusement à ce dont on avait parlé !). Je te remercie Régine pour ton sourire quotidien et ton énergie positive. J'ai apprécié travailler au sein d'une équipe qui met tout en œuvre pour le bien des doctorants.

Je tiens également à remercier les personnes qui ont accepté d'examiner mon travail. Merci à Christophe Innocent et Wafa Achouak d'avoir été les rapporteurs. Je remercie également Karine Groenen-Serrano et Karine Servat d'avoir accepté le rôle d'examinatrices et Claire Dumas pour avoir accepté mon invitation.

J'adresse mes remerciements à l'ensemble des personnes ayant contribué à la réalisation de ces travaux : tous les membres du département Biosym ; Marie-Line de Solan pour les images MEB et sa bonne humeur ; Sophie Pécastaings et Alexis Simons pour l'extraction d'ADN ; l'atelier du LGC qui a confectionné la majorité de mes dispositifs expérimentaux. Je remercie également l'ensemble du personnel administratif : Danièle Bouscary pour son aide quotidienne et sa grande générosité, Alain Philippe pour son aide pour la préparation de mon repas de thèse, Amélie Teste, Claudine Lorenzon et Jean-Luc Labeyrie pour leur aide administrative.

Je remercie aussi tous ceux sans qui cette thèse ne serait pas ce qu'elle est : aussi bien par les discussions que j'ai eu la chance d'avoir avec eux, leurs suggestions ou contributions. Je pense ici aux collègues, aux nouveaux arrivés comme aux plus anciens : Nadège, Pierre C, Emma, Morgane, Simon, Polo, Pierre A, Silvia, Manon, Cédric, William, Mickael, Laureen, Freddy. Je remercie particulièrement Simon pour son aide précieuse au niveau de certaines de mes expériences et pour avoir partagé avec moi son savoir-faire dans l'extraction d'ADN ainsi que Nadège.

J'adresse un grand « MAURUURU » à ma famille, mon pilier de tous les jours. D'abord mes parents (Jacky et Mylla), mon frère (Erearii), mes deux grands-mères (Tetua et Janine) puis le reste de ma grande famille à Rurutu (CHONG, TEURUARII, ATAI et TAPUTU). De tout cœur, merci à vous tous pour votre soutien éternel malgré les 16 000 km qui nous séparent ! Ces huit années passées loin de vous n'auront pas été vaines ☺ !

J'ai une pensée particulière envers mon grand-père CHONG Marcel qui a été un modèle de force et de persévérance dans ma vie. Grand-père, c'est également grâce à toi que je suis arrivée où je suis aujourd'hui, je te dédie mon grade de Docteur.

Je souhaite aussi remercier mon chéri, Tommy, mon confident de tous les jours, pour ton soutien permanent. Je n'oublie pas le choix difficile que tu as fait dans ta carrière au début de ma thèse pour moi, pour nous. Je tâcherai à l'avenir d'en être digne.

Enfin, j'aimerais remercier tous ceux et celles de près comme de loin qui m'ont encouragé tout au long de ma thèse.

Ingénierie électrochimique pour déchiffrer les mécanismes de formation des biofilms électroactifs.

Les biofilms électroactifs (EA) sont des consortia de bactéries mono- ou multi-espèces qui ont la capacité de catalyser des réactions électrochimiques en échangeant des électrons avec les électrodes sur lesquelles ils se développent. Les biofilms EA ont ouvert la voie à de nombreux procédés électrochimiques innovants, l'exemple le plus connu étant la pile à combustible microbienne. Dans ce cadre, des électrodes tridimensionnelles poreuses sont couramment mises en œuvre afin d'offrir aux biofilms EA une surface maximale pour se développer. Toutefois, à ce jour les études théoriques qui permettraient de guider l'élaboration de ces électrodes restent très peu nombreuses.

Une synthèse bibliographique a mis en évidence l'importance cruciale de la taille des pores et a montré que des pores de l'ordre du millimètre conduisent aux densités de courant les plus élevées. La première partie de la thèse a donc été consacrée à caractériser l'impact de la taille des pores, entre 1 à 5 mm, sur le développement et les performances électrochimiques d'un biofilm EA multi-espèces. Ces tailles permettent la colonisation microbienne sur plusieurs centimètres de profondeur et favorisent la stabilité du courant à long terme. Par contre, l'effet limitant des transferts de matière est significatif, particulièrement pour ce qui concerne les espèces tampon. Enfin, un découplage est mis en évidence entre la colonisation qui se déploie sur plusieurs semaines et l'établissement du courant qui se réalise en quelques jours seulement. Un second dispositif expérimental a mis en évidence une sélection des populations microbiennes en fonction des longueurs de pore de 5 à 24 mm.

La deuxième partie de la thèse se focalise sur l'étude des premiers instants de formation du biofilm électroactif à la surface d'une électrode. Une tentative d'identification des mécanismes impliqués dans le mouvement des bactéries électroactives vers l'électrode est proposée.

Mots-clés : bioanode ; anode microbienne ; électrode tridimensionnelle ; porosité ; diffusion ; migration ; électrotaxie ; communauté microbienne ; bioélectrochimie.

Electrochemical engineering for deciphering the mechanisms of electroactive biofilm formation.

Electroactive (EA) biofilms refer to single- or multi-species bacterial consortia, which have the ability to catalyse electrochemical reactions by exchanging electrons with the electrodes on which they develop. EA biofilms have paved the way for many innovative electrochemical processes, the most well-known example is microbial fuel cell. In this context, 3-dimensional porous electrodes are commonly used to offer EA biofilms a maximum surface area for development. However, to date, very few theoretical studies have been carried out to guide the development of these electrodes.

A bibliographic synthesis highlighted the importance of the pore size and indicated that pore sizes of the order of a few millimetres lead to the highest current densities. The first part of the thesis was therefore devoted to characterizing the impact of size, between 1 and 5 mm, on the development and electrochemical performance of a multi-species EA biofilm. These sizes allow microbial colonization several centimetres deep and promote long-term current stability. However, limiting effect of the mass transfer is significant, particularly for the buffer species. Finally, a decoupling is highlighted between the colonisation, which takes place over several weeks, and the establishment of the current which takes a few days only. A second experimental set up shows that a selection occurs on the microbial populations in function of pore lengths from 5 to 24 mm.

The second part of the thesis focuses on the study of the early stages of the EA biofilm formation at the electrode surface. In particular, an attempt to identify the mechanisms involved in the electroactive bacteria movement towards the electrode is proposed.

Keywords: bioanode; microbial anode; 3-dimensional electrode; porosity; diffusion; migration; electroaxis; microbial community; bioelectrochemical system.

Sommaire

SOMMAIRE	3
INTRODUCTION GENERALE	11
CHAPITRE 1 : BIBLIOGRAPHIE	19
1 GENERALITES SUR LES BIOFILMS.....	21
1.1 Définition.....	21
1.2 Mécanisme de formation	22
1.3 Biofilms néfastes	24
1.4 Biofilms positifs	25
2 ELECTROACTIVITE DES BIOFILMS	26
2.1 Pourquoi des biofilms deviennent-ils électroactifs ?.....	26
2.1 Mécanismes de transfert électronique	27
2.1.1 Transferts indirects	27
2.1.2 Transferts directs	28
2.2 Principales applications des biofilms électro-actifs.....	29
2.2.1 Principe général d'une PACM	30
2.2.2 Exemples d'applications basées sur le concept des PACMs.....	31
3 LA BIOANODE.....	36
3.1 Procédure de formation	36
3.2 Facteurs limitants.....	37
3.3 Voies d'optimisations	39
3.3.1 Matériau d'électrode	39
3.3.2 Configurations d'électrode	42
3.3.3 Modifications de surface	43
4 BIOANODE POREUSE : IMPORTANCE DE LA TAILLE DES PORES (Publication 1).....	45
5 PHENOMENE D'ELECTROTACTISME ?.....	87
5.1 Taxie vers des accepteurs insolubles d'électrons.....	88
5.2 Electrotaxie - galvanotaxie.....	90
CHAPITRE 2 : MATERIELS ET METHODES	99
1 INOCULA MICROBIENS ET MILIEU SYNTHETIQUE	101
1.1 Préparation du lixiviat de terreau.....	101
1.2 Formation de la bioanode primaire.....	102

1.3	Milieu synthétique	102
2	DISPOSITIFS EXPERIMENTAUX	103
2.1	Montage électrochimique à trois électrodes	103
2.1.1	Electrodes de travail support de biofilms EA.....	104
2.1.2	Dispositif « canal ».....	105
2.1.3	Dispositif « multi-pores ».....	106
2.1.4	Electrode de référence et contre-électrode	107
2.1.5	N-stat	108
2.2	Montage électrochimique à 2 électrodes	108
2.3	Réacteurs électrochimiques	109
3	TECHNIQUES D'ANALYSES	113
3.1	Techniques électrochimiques	113
3.1.1	Chronoampérométrie.....	113
3.1.2	Voltammétrie cyclique	114
3.2	Dosage enzymatique de l'acétate	114
3.3	Techniques microscopiques.....	115
3.3.1	Microscopie à épifluorescence	116
3.3.2	Microscopie électronique à balayage	117
3.3.3	Analyse par diffraction électronique (EDX)	119
3.4	Analyse des populations bactériennes par pyroséquençage	119

CHAPITRE 3 : COMPORTEMENT DES BIOFILMS ELECTROACTIFS A L'ECHELLE D'UN PORE MODELE **123**

1	OBJECTIFS ET STRATEGIE D'ETUDE.....	125
1.1	Objectif	126
1.2	Choix de l'inoculum	126
1.3	Modélisation expérimentale d'un pore	127
2	TESTS PRELIMINAIRES	128
2.1	Configuration réacteur « boîte à bonbons ».....	128
2.2	Configuration réacteur « Multi-anodes ».....	130
3	RESULTATS OBTENUS AVEC LE DISPOSITIF « CANAL » EN TISSU DE CARBONE	132
3.1	Article « Microbial anodes: what actually occurs inside pores?»	133
3.2	Résultats complémentaires non présentés dans l'article.....	162

3.2.1	Profil de colonisation des électrodes simples (contrôles sans canal)	162
3.2.2	Analyse des populations microbiennes	163
3.2.3	Analyse de la viabilité	174
3.3	Bilan.....	180
4	RESULTATS OBTENUS AVEC LE DISPOSITIF « CANAL » EN ACIER INOXYDABLE	
316L	181
4.1	Résultats expérimentaux.....	182
4.2	Comparaison avec les électrodes en tissu de carbone dans le dispositif « canal ».....	188
4.3	Bilan.....	190
5	CONCLUSIONS DU CHAPITRE 3	191
<u>CHAPITRE 4 : COMPORTEMENT DES BIOFILMS ELECTROACTIFS A</u>		
<u>L'ECHELLE DE PLUSIEURS PORES</u>		
<u>195</u>		
1	OBJECTIF ET STRATEGIE DE L'ETUDE	197
1.1	Contexte général et stratégie.....	197
1.2	Conception d'un dispositif multi-pores à longueur de pores variable.....	198
1.3	Mise en œuvre des dispositifs « multi-pores »	199
2	EFFET DE LA LONGUEUR DES PORES SUR LES DENSITES DE COURANT	202
2.1	Chronoampérométrie (CA).....	202
2.1.1	Phase de latence (Phase I)	204
2.1.2	Démarrage et augmentation sigmoïdale du courant (Phase II)	207
2.1.3	Charge électrique produite	211
2.1.4	Éléments de réflexion : le transport du substrat	212
2.1.5	Éléments de réflexion : pression sélective exercée par le pore?	215
2.2	Voltammétrie cyclique (CV)	216
3	EFFET DE LA LONGUEUR DU PORE SUR LA COLONISATION MICROBIENNE	219
3.1	Cartographie de la colonisation des électrodes.....	219
3.2	Analyse des populations bactériennes	224
3.3	Comparaison des populations bactériennes obtenues dans les dispositifs « canal » et les dispositifs multi-pores (DMP).....	237
4.	CONCLUSIONS DU CHAPITRE 4	237

<u>CHAPITRE 5 : COMPORTEMENT DES BACTERIES ELECTROACTIVES DANS UN CHAMP ELECTRIQUE</u>	243
1 OBJECTIF ET STRATEGIE DE L'ETUDE	245
1.1 Contexte général et objectif	245
1.2 Stratégie d'étude et conception d'un réacteur « triple compartiments »	246
1.3 Première réflexion sur les conditions opératoires.....	247
2 TESTS PRELIMINAIRES	248
2.1 En condition abiotique.....	248
2.2 En condition biotique.....	252
2.2.1 Première série d'expériences.....	253
2.2.2 Deuxième série d'expériences.....	255
2.2.3 Troisième série d'expériences	259
3 RESULTATS OBTENUS AVEC LE SAC DE TERREAU SAC 3	261
3.1 Article « Is microbial electrotaxis an osmotaxis? ».....	261
3.2 Résultats complémentaires non présentés dans l'article.....	292
4 RESULTATS OBTENUS AVEC LE SAC DE TERREAU SAC 4	293
4.1 Chronoampérométrie	294
4.2 Analyse des populations microbiennes.....	296
4.3 Comparaison avec les résultats obtenus avec le sac de terreau SAC 3	300
5 CONCLUSIONS DU CHAPITRE 5	302
<u>CONCLUSIONS GENERALES</u>	307
<u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u>	315
<u>ANNEXES</u>	339

Introduction
générale

Les micro-organismes vivent en sociétés organisées sur des surfaces. Ce n'est pas un constat évident pour le grand public qui imagine plutôt les micro-organismes comme des individus isolés (...et malfaisants) flottant librement dans les milieux liquides et gazeux. Ce n'est également pas le cas dans la plupart des laboratoires et des bio-industries qui mettent en œuvre les micro-organismes sous forme de cellules planctoniques. Pourtant, lorsqu'on ne les contraint pas à se maintenir isolés par une vigoureuse agitation du milieu, les micro-organismes s'auto-organisent en consortia. Ils adhèrent à des surfaces solides, ou s'agrègent à des interfaces fluides, pour former des films, appelés biofilms, au sein desquels ils établissent les conditions propices à leur développement. Insistons sur le fait que ces biofilms ne sont pas le résultat d'une simple accumulation de micro-organismes, mais sont des structures organisées qui permettent aux cellules microbiennes de se protéger des agressions de l'environnement, d'optimiser les flux de nutriments et de bénéficier de synergies inter-espèces (Flemming et al., 2016).

Ce constat a émergé chez les scientifiques dans les années soixante-dix puis, au début des années 2000 (Bond et al., 2002; Tender et al., 2002), est apparue une nouvelle fonction des biofilms microbiens : leur capacité à échanger des électrons avec les surfaces conductrices. La notion d'électroactivité des biofilms avait certes été effleurée auparavant, dans le domaine de la corrosion microbienne en particulier. On avait aussi parfois tenté d'associer la production microbienne d'un composé, l'hydrogène par exemple, avec son oxydation à la surface d'une électrode, mais ce n'est qu'au début du 21^{ème} siècle que fut mise en lumière la capacité des biofilms à transférer directement des électrons vers des anodes.

Le concept prit un essor considérable avec sa mise en application dans les piles à combustible microbiennes. A la surface de l'anode, un biofilm électroactif assure l'oxydation de matière organique à bas coût, voire des déchets qu'il faut traiter, en injectant les électrons dans le circuit électrique. Cette bioanode couplée à une cathode classique de réduction de l'oxygène constitue une pile à combustible microbienne capable de produire de l'énergie électrique tout en abattant la matière organique contenue dans des déchets. Le biofilm électroactif s'auto-organise à partir du microbiote du milieu, s'auto-entretient, voire s'adapte si la nature de la source organique varie. Ces systèmes parurent initialement très prometteurs, une analyse de type ingénierie met toutefois en lumière quelques sévères verrous fondamentaux.

Sur la base des piles à combustible microbiennes, ce fut ensuite toute la panoplie des procédés électrochimiques conventionnels qui dormaient dans les ouvrages d'électrochimie qui fut revisitée en y introduisant des biofilms électroactifs : électrolyse pour la production d'hydrogène ou la récupération de métaux, électrodialyse, électrosynthèse en particulier pour la réduction du dioxyde de carbone, capteurs, etc. (Wang et al., 2013; Schröder et al., 2015; Kumar et al., 2017). Il est encore difficile d'identifier les technologies électrochimiques qui pourraient vraiment bénéficier d'une catalyse par les biofilms microbiens. Dans la plupart des cas des ruptures conceptuelles majeures semblent nécessaires pour raviver la progression des performances qui stagne depuis plusieurs années.

Au-delà de leur mise en œuvre dans des réacteurs électrochimiques, les études foisonnantes sur les biofilms électroactifs ont amené à découvrir un aspect insoupçonné du monde microbien : la quasi-ubiquité des transferts d'électrons au sein des biofilms (Chabert et al., 2015; Koch and Harnisch, 2016). Il semble de plus en plus largement admis que les transferts d'électrons constituent une fonction essentielle de l'organisation des biofilms (Ball, 2007). Les transferts d'électrons entre espèces peuvent avoir lieu spontanément même en l'absence d'électrodes au sein d'agrégats microbiens suivant un processus appelé DIET (pour direct interspecies electron transfer ou direct interspecies energy transfer, (Lovley, 2011).

Dans de nombreux cas les transferts d'électrons de type DIET sont médiés par des particules conductrices, des particules de graphite (Chen et al., 2014) ou certains oxydes métalliques (Kato et al., 2012) par exemple. La même particule conductrice joue alors le rôle d'anode et de cathode et assure ainsi le lien entre les espèces qui libèrent les électrons issus de leur métabolisme (anode) et celles qui les utilisent à leur profit (cathode). Ce principe a également été développé au Laboratoire de Génie Chimique comme base de la technologie dite du tuba électrochimique qui associe une anode microbienne et une cathode en court-circuit (Erable et al., 2011). En intervenant dans les réactions de méthanogénèse, les transferts de type DIET médiés par des solides conducteurs semblent être à l'œuvre dans le cycle du carbone (Kato et al., 2012) et dans les procédé de méthanisation (Park et al., 2018). Ces illustrations montrent l'étendue des applications que l'on commence à suspecter pour les réactions électro-microbiennes. La découverte de la présence de bactéries électroactives dans nos intestins (Light et al., 2018) pourrait encore élargir le champ vers les domaine médical.

Quelles que soient les applications envisagées, le domaine de recherche des biofilms électroactifs ouvre des perspectives scientifiques enthousiasmantes. On y rencontre des études de microbiologie très fondamentales qui ont rapidement déchiffré les mécanismes de transferts extracellulaires d'électrons mis en jeu par les cellules. Par contre, les progrès technologiques semblent essentiellement réalisés par la suite d'essais et d'erreurs, au hasard des réacteurs, des matériaux et des procédures maîtrisées par les différents groupes de recherches. Il n'y a que très peu de bases fondamentales qui permettraient de guider les choix technologiques.

Le manque de connaissances fondamentales est particulièrement évident pour ce qui concerne les mécanismes d'établissement des biofilms électroactifs. Les questions que peut se poser l'ingénieur qui souhaite concevoir un biofilm électroactif sont multiples : quel est le lien entre la colonisation d'une surface et l'apparition de la fonction électroactive ? Comment le biofilm électroactif s'établit-il au sein de structures poreuses ? Quelle est la taille/porosité optimale d'une structure tridimensionnelle destinée à supporter un biofilm électroactif ? Les espèces capables d'électroactivité ont-elles une capacité spécifique à détecter l'électrode qui pourrait être utilisée pour agir sur la formation du biofilm ? Ce sont là des exemples de questionnements qui ne trouvent pas encore de réponse alors que ces connaissances seraient essentielles pour concevoir des matériaux, des structures et des procédures optimales pour développer les biofilms électroactifs.

Le travail qui fait l'objet de ce mémoire de thèse est une première tentative au Laboratoire de Génie Chimique pour aborder ce type de questions. Nous n'avons pas la prétention d'apporter des réponses définitives à des questions aussi complexes. Plus modestement, l'objectif était de s'appuyer sur des bases simples du génie des procédés pour concevoir des systèmes expérimentaux et des modes opératoires qui permettraient de jeter quelques premières réflexions sur les mécanismes d'établissement des biofilms électroactifs. Nous avons choisi de travailler avec un inoculum multi-espèces car le Laboratoire de Génie Chimique est surtout impliqué dans la mise en œuvre de biofilms multi-espèces et les mécanismes mis en jeu sont peut-être différents de ceux qui sont à l'œuvre dans les cultures pures. Le travail n'a abordé que la formation d'anodes microbiennes car la formation de cathodes microbiennes paraît encore plus difficile à cerner et nous avons craint que le défi ne fût alors trop grand.

Ce mémoire de thèse est divisé en cinq chapitres. Le travail s'est organisé en trois axes qui correspondent aux chapitres 3 à 5 du mémoire.

Le chapitre 1 présente les parties de l'état de l'art nécessaires pour appréhender les principaux objectifs de la thèse. Depuis leur découverte, les biofilms électroactifs ont fait l'objet de nombreux travaux de recherche et l'état des avancées scientifiques et techniques a été analysé dans de nombreux articles de revues, suivant de multiples grilles de lecture. Il a donc paru inutile de reproduire le même exercice. Il a plutôt été choisi de concentrer l'analyse bibliographique sur les deux principaux axes qui ont constitué la trame du travail de thèse : (i) la compréhension du développement d'un biofilm électroactif au sein d'une électrode tridimensionnelle poreuse, et (ii) l'identification des mécanismes impliqués dans la phase d'approche des bactéries électroactives vers l'électrode.

Le chapitre 2 regroupe les matériels, techniques et protocoles mis en œuvre pour les expériences décrites dans les chapitres 3 à 5.

Le chapitre 3 s'attache à montrer l'influence de la taille de pores sur la colonisation et les performances d'une bioanode. Un nouveau dispositif expérimental a été élaboré afin de travailler à l'échelle d'un pore modèle. Différentes tailles de pores allant d'une centaine de micromètres à quelques millimètres ont ainsi été testées.

Le chapitre 4 est dédié à l'analyse de l'effet de différentes longueurs de pore sur la colonisation et les performances d'une bioanode. Cette fois, l'étude est menée à l'échelle de plusieurs pores avec des longueurs variables de la centaine de millimètre à quelques centimètres.

Enfin, le chapitre 5 tente d'apporter de premiers éléments de réponse sur le rôle du champ électrique sur la phase d'approche des bactéries électroactives vers l'électrode. Les résultats essentiels sont synthétisés à la fin du chapitre.

La conclusion générale propose une synthèse des principaux résultats et trace quelques perspectives ouvertes par ces travaux.

Le travail réalisé au cours de ses 36 mois de thèse a donné lieu à 4 articles scientifiques :

1. « Influence of the electrode size on microbial anode performance », publié dans le journal *Chemical Engineering Journal*
2. « Microbial anodes: what actually occurs inside pores? », accepté pour publication dans le journal *International Journal of Hydrogen Energy*
3. « Critical review of the performance of 3-dimensional porous microbial anodes », soumis au journal *Biosensors and Bioelectronics*
4. « Is microbial electrotaxis an osmotaxis ? », à soumettre

ainsi qu'à 3 communications orales dans des congrès :

1. *Congrès national* : « 8ème Colloque du Réseau National Biofilm », 5 et 6 décembre 2017, Clermont-Ferrand, France.
2. *Congrès international* : « European Fuel Cell Technology & Applications Conference - Piero Lunghi Conference », 12-15 décembre 2017, Naples, Italie.
3. *Congrès international* : « 6th Meeting of the International Society for Microbial Electrochemistry and Technology (EU-ISMET) » 3-6 septembre 2017, Lisbonne, Portugal

Chapitre 1 : Bibliographie

1	GENERALITES SUR LES BIOFILMS	21
1.1	Définition	21
1.2	Mécanisme de formation.....	22
1.3	Biofilms néfastes	24
1.4	Biofilms positifs	25
2	ELECTROACTIVITE DES BIOFILMS	26
2.1	Pourquoi des biofilms deviennent-ils électroactifs ?.....	26
2.1	Mécanismes de transfert électronique	27
2.1.1	Transferts indirects.....	27
2.1.2	Transferts directs.....	28
2.2	Principales applications des biofilms électro-actifs	29
2.2.1	Principe général d'une PACM	30
2.2.2	Exemples d'applications basées sur le concept des PACMs	31
3	LA BIOANODE	36
3.1	Procédure de formation	36
3.2	Facteurs limitants	37
3.3	Voies d'optimisations.....	39
3.3.1	Matériau d'électrode	39
3.3.2	Configurations d'électrode.....	41
3.3.3	Modifications de surface.....	43
4	BIOANODE POREUSE : IMPORTANCE DE LA TAILLE DES PORES (Publication 1)	45
5	PHENOMENE D'ELECTROTACTISME ?	87
5.1	Taxie vers des accepteurs insolubles d'électrons	88
5.2	Electrotaxie - galvanotaxie.....	90

1 GENERALITES SUR LES BIOFILMS

Les micro-organismes peuvent adopter deux modes de vie : soit l'état planctonique pour lequel les bactéries sont isolées et flottent en suspension dans le milieu, soit sous forme de biofilm où, à l'inverse, les bactéries sont en communautés et sont fixées à une surface ou regroupées à une interface.

Il a été montré que plus de 99% de la population microbienne de notre planète vit sous forme de biofilm car les bactéries sont ainsi mieux protégées ce qui leur permet même de survivre dans des environnements hostiles (Dalton and March, 1998). Zobell démontra par exemple que le nombre de bactéries vivantes était plus important sur les surfaces d'un récipient que dans le liquide qu'il contient (Zobell, 1943).

1.1 Définition

De façon générale, un biofilm se définit comme étant un regroupement de micro-organismes liés les uns aux autres et attachés à une surface ou regroupés à une interface. Dans un biofilm, les micro-organismes sont englobés dans une matrice auto-produite de substances polymériques extracellulaires (EPS pour ExoPolymeric Substances). Cette matrice d'aspect gélatineux joue le rôle de « colle ». Elle est composée majoritairement d'eau (jusqu'à 97%), de polysaccharides, de protéines, de lipides et dans certains cas d'ADN et ARN extracellulaires (Sutherland, 2001). Un biofilm se compose de 10 à 25% en volume de micro-organismes, les 75 à 90% restant étant principalement des EPS (Costerton, 1999). La composition chimique des EPS détermine les propriétés physico-chimiques et physiques du biofilm (Wingender et al., 1999). Un biofilm peut être constitué d'une seule espèce bactérienne (biofilm mono-espèce) lorsqu'il est cultivé en laboratoire mais les biofilms qui se développent dans les environnements naturels sont composés d'un grand nombre d'espèces coexistant au sein de la structure (biofilm multi-espèces).

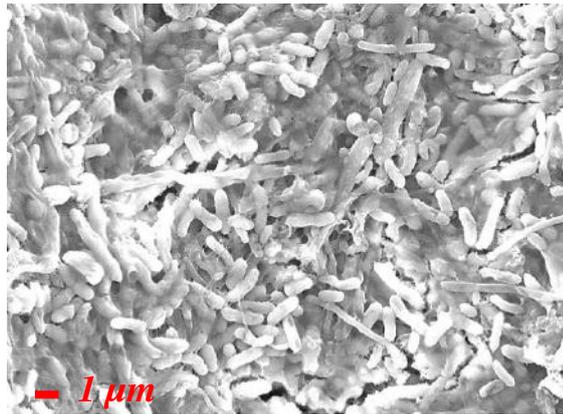


Figure 1 : Image au microscope électronique à balayage d'un biofilm multi-espèces formé à partir de terreau de jardin.

1.2 Mécanisme de formation

La formation d'un biofilm bactérien sur une surface biotique ou abiotique s'effectue en général en cinq étapes successives (Figure 2) (Costerton et al., 1987; Garrett et al., 2008) :

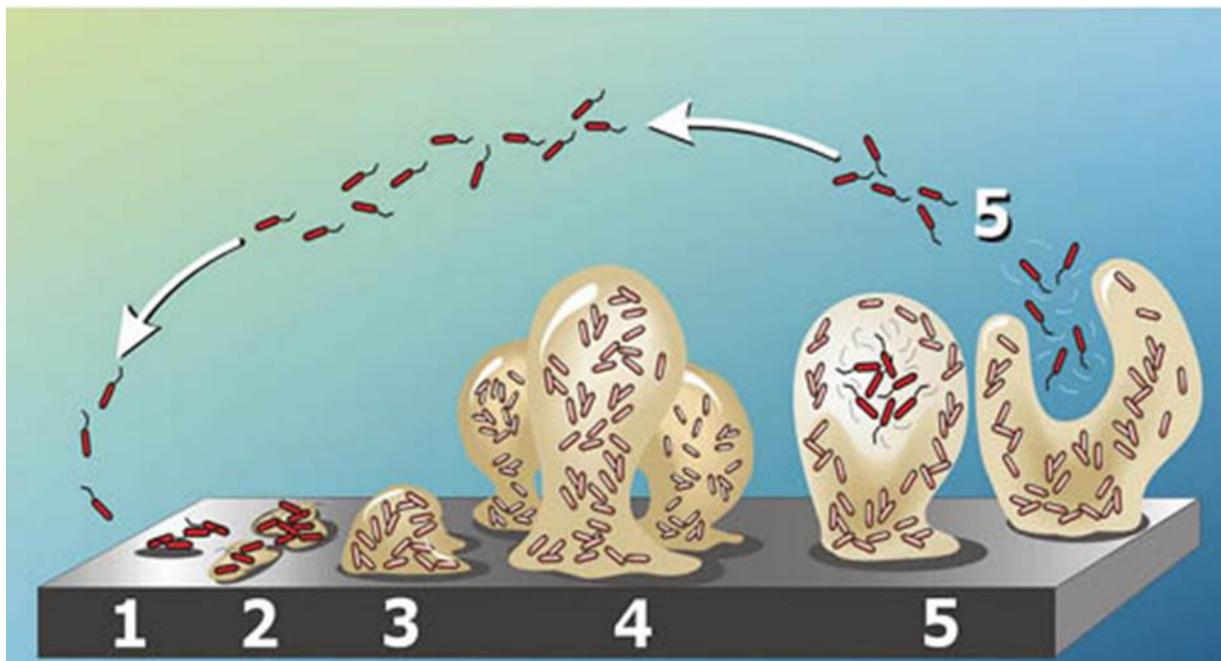


Figure 2 : Les différentes étapes de formation d'un biofilm microbien, schéma d'après © P.Dirckx, 2003, Center for Biofilm Engineering at MSU-Bozeman.

Etape 1 : Adhésion réversible

Dans un premier temps, des bactéries planctoniques se déplacent librement dans le milieu par nage grâce à leur flagelle ou sous l'effet de l'hydrodynamique du milieu. Lorsqu'elles arrivent au contact d'une surface elles s'y attachent via des liaisons non covalentes de types Van der Waals ou électrostatiques. Ces liaisons étant fragiles, on parle alors d'une adhésion réversible car les bactéries peuvent se décrocher de la surface et retrouver l'état planctonique.

Etape 2 : Adhésion irréversible

Les bactéries qui sont restées fixées à la surface sécrètent des polysaccharides et des protéines qui possèdent des propriétés adhésives renforçant ainsi les interactions avec la surface ; l'adhésion devient irréversible.

Etape 3 : Formation de micro-colonies

Par la suite, les bactéries entament la division cellulaire et forment des micro-colonies qui restent ancrées à la surface via la sécrétion des EPS. Ces micro-colonies continuent de croître en occupant de plus en plus de surface.

Etape 4 : Maturation

La multiplication cellulaire et la synthèse importante des EPS induisent une augmentation de la taille du biofilm qui acquiert une structure tridimensionnelle. Des canaux et des pores se forment au sein de la structure pour garantir l'acheminement des nutriments jusqu'aux régions internes du biofilm, ainsi que l'évacuation des métabolites issus de l'activité biologique. A ce stade, le biofilm arrive à maturation. Au sein d'un biofilm mature apparaissent d'importants gradients d'oxygène, de substrats, de pH et d'autres composés qui sont consommés ou produits par le métabolisme cellulaire. Le plus souvent, les zones les plus profondes du biofilm (proche de la surface) sont pauvres en oxygène et en nutriments. A l'inverse, les zones les plus éloignées de la surface sont aérobies et riches en nutriments. Ces gradients peuvent avoir pour conséquence le développement de populations microbiennes différentes au niveau des couches internes et externes.

Etape 5 : Libération et retour à l'état planctonique

A mesure que le biofilm grandit et s'épaissit, des carences en nutriments ou des stress liés à l'environnement apparaissent et induisent le détachement de certaines bactéries qui retrouvent leur état planctonique et partent à la recherche d'un environnement plus favorable sur de nouvelles surfaces.

1.3 Biofilms néfastes

Les biofilms sont présents tout autour de nous, dans nos jardins, nos salles de bains, nos aliments, nos poubelles et même en nous, sur nos dents, dans nos tubes digestifs. En effet, tout système dans lequel une surface est en contact avec de l'eau, ou un environnement humide, est propice à la formation d'un biofilm, ce qui peut provoquer dans certains cas d'importants dégâts.

Dans le domaine médical, les biofilms qui se développent à la surface de certains matériels médicaux (Tableau 1) peuvent être responsables de l'apparition d'infections nosocomiales, dont certaines sont particulièrement dangereuses.

Tableau 1 : Exemples d'infections de matériel médical sous forme de biofilms (DJERIBI-MOUSSAOUI et al., 2006).

Matériel médical	Espèces bactériennes répertoriées
Pacemakers	<i>Staphylococcus aureus</i>
Stérilets	<i>Escherichia coli</i>
Cathéters	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
Prothèses orthopédiques	<i>S. epidermidis</i> <i>S. aureus</i>
Sondes d'intubation	Divers bactéries et champignons

Au-delà des cas de colonisation de matériels médicaux ou de prothèses, il a été démontré que 65% des infections bactériennes chez l'homme sont causées par les biofilms (Bjarnsholt, 2013) (Tableau 2).

Tableau 2 : Exemples de maladies infectieuses associées aux biofilms (Costerton et al., 1999)

Maladies infectieuses	Espèces bactériennes répertoriées
Carries dentaires	<i>Streptococcus</i>
Cystites	<i>Proteus mirabilis</i> <i>E.coli</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Enterococcus faecalis</i>
Bronchites chroniques (mucovisidose)	<i>P. aeruginosa</i> <i>S. aureus</i> <i>Burkholderia cepacia</i>
Kératites	<i>P. aeruginosa</i>

Le domaine de l'industrie est également lourdement affecté par la présence de biofilms qui peuvent induire la diminution de l'efficacité des équipements ou leur dégradation par corrosion. Par exemple les échangeurs de chaleur peuvent voir leur capacité de transfert thermique réduite de 20 à 30% (Somerscales et al., 1981). La corrosion des métaux ou des bétons induite par les biofilms (biocorrosion) (Scotto and Lai, 1998) est particulièrement présente dans les installations portuaires ou les plates-formes off-shore (Critchley et al., 2004). Il semblerait que les mécanismes de biocorrosion soient surtout liés aux propriétés catalytiques d'enzymes extracellulaires qui sont accumulées au sein de la matrice du biofilm. D'après le Centre de Recherche de Corrosion Marine et Biologique (Cherbourg, France), le coût annuel de la biocorrosion en France est estimé à 5 milliards d'euros soit 10% du coût global de la corrosion. L'industrie navale lutte continuellement contre la formation de biosalissures sur les coques des bateaux qui peuvent réduire la vitesse des navires jusqu'à 10% en augmentant les forces de frottement le long de la coque. Pour maintenir une vitesse donnée la présence des biosalissures entraîne donc l'augmentation de la consommation énergétique. Les industries de l'agro-alimentaire et de l'eau sont également concernées par le biais de risques sanitaires considérables. Des biofilms sont présents dans toutes les installations industrielles fabriquant des produits à fort taux d'humidité (laiteries, brasseries, salaisonneries, sucreries...) ainsi qu'à toutes les étapes des chaînes de production sur les équipements non stérilisés. La prolifération des biofilms peut contaminer les aliments et être la source d'intoxications alimentaires qui peuvent aller jusqu'au décès du consommateur, notamment dans les cas d'infections par *Salmonella* et *Listeria* (Cerf, 2002; Che and Desenclos, 2002; Srey et al., 2013). Dans les industries de production et de distribution d'eau potable, les biofilms développés sur les parois des canalisations peuvent héberger des bactéries pathogènes telle que *Legionella pneumophila* très souvent présente dans les réseaux de distribution d'eau chaude et dans les tours aéro-réfrigérantes des systèmes de climatisation (Levi, 2001; Huq et al., 2008; Gomes et al., 2014).

1.4 Biofilms positifs

Les biofilms peuvent aussi être exploitées à des fins utiles. Dans l'environnement, les biofilms occupent une place capitale dans les écosystèmes. Ils représentent un maillon vital de la chaîne alimentaire. Ils contribuent au recyclage de la biomasse dans les sols en décomposant la matière organique en nutriments pour leur propre besoin mais également au bénéfice d'autres organismes, les plantes par exemple. Ils jouent un rôle primordial dans la santé humaine. Par exemple les biofilms se formant au niveau du tractus intestinal nous protègent contre les bactéries pathogènes.

Dans les industries, leurs propriétés sont mises à profit pour le traitement des effluents et de l'eau potable. La capacité des bactéries à dégrader la matière organique est exploitée afin d'éliminer les polluants (Fuchs et al., 1996; Sekoulov and Brinke-Seiferth, 1999). La bioremédiation qui consiste à décontaminer des milieux pollués par le biais de micro-organismes est également un domaine d'exploitation des biofilms. Un consortium bactérien adapté à la dégradation des polluants injecté sur des sites chimiquement pollués peut transformer les matières toxiques en sous-produits inoffensifs (Barkay and Schaefer, 2001; Speight and El-Gendy, 2018). Les processus de biolixiviation mettent en œuvre la capacité des biofilms à dégrader leur support. L'attaque de minerais via des populations bactériennes permet d'extraire des métaux (Bosecker, 1997; Awasthi and Li, 2017).

2 ELECTROACTIVITE DES BIOFILMS

2.1 Pourquoi des biofilms deviennent-ils électroactifs ?

Le couplage entre biofilms et réactions électrochimiques était connu depuis les années 70 dans le domaine restreint de la corrosion microbienne (Mollica and Trevis, 1976). Il n'a toutefois pris son plein essor qu'au début des années 2000 (Bond et al., 2002; Tender et al., 2002) avec la démonstration que certains biofilms étaient capables d'échanger des électrons avec des électrodes. De tels biofilms sont dits « électroactifs » (EA).

Pour vivre, une bactérie a besoin d'énergie. Elle utilise la fermentation ou la respiration pour dégrader de la matière organique et en extraire l'énergie dont elle a besoin pour transformer l'adénosine diphosphate (ADP) en adénosine triphosphate (ATP) qui constitue une sorte de vecteur d'énergie biochimique universel. Dans un premier temps, la cellule récupère des électrons en oxydant un donneur d'électrons externe, du glucose ou de l'acétate par exemple. Ces électrons subissent ensuite une succession de réactions redox qui réduisent l'ADP en ATP. A la fin de cette cascade de réactions, la cellule évacue les électrons en réduisant un accepteur final externe. Le plus souvent l'accepteur final est l'oxygène et l'on parle de respiration cellulaire aérobie ; la respiration cellulaire peut aussi être anaérobie en faisant alors appel à divers accepteurs d'électrons, tels que les sulfates, les nitrates, les particules d'oxydes métalliques... La fermentation est un processus différent qui n'utilise qu'un seul composé initial, à partir duquel sont formés à la fois le donneur et l'accepteur d'électrons. Partant d'un composé initial identique, le glucose par exemple qui peut à la fois être le donneur d'électrons du processus de respiration ou donner lieu à un processus de fermentation, la fermentation fournit beaucoup moins d'énergie à la cellule bactérienne que la respiration.

Dans le cas des bactéries EA, le donneur ou l'accepteur d'électrons est remplacé par une électrode, respectivement une cathode ou une anode. Lorsque les bactéries EA produisent des électrons en oxydant de la matière organique et déchargent ces électrons sur une surface anodique, il est dit qu'elles « respirent » l'électrode. En effet l'électrode joue alors le rôle de l'accepteur final d'électrons, comme l'oxygène en condition aérobie. Ces bactéries sont d'ailleurs souvent appelées Anode-Respiring Bacteria (ARB) dans la bibliographie. Dans ce cas, le biofilm échange des électrons avec l'électrode dans un processus qui s'apparente à la respiration (Bond et al., 2002; Bond and Lovley, 2003) Les mécanismes d'échange électronique (ou de transfert électronique) entre cellules bactériennes et électrodes ont été largement étudiés et semblent aujourd'hui bien compris.

Certains biofilms sont capables de capter des électrons fournis par une surface cathodique pour réduire un oxydant présent en solution dans le milieu. Les mécanismes de transfert électronique de l'électrode vers les cellules bactériennes sont alors moins bien connus.

2.1 Mécanismes de transfert électronique

L'échange électronique entre une bactérie EA et une anode s'effectue suivant plusieurs mécanismes classifiés dans la bibliographie en deux grands groupes selon qu'ils sont directs ou indirects.

2.1.1 Transferts indirects

Les transferts indirects s'effectuent via des **médiateurs électrochimiques** c'est-à-dire des molécules capables de s'oxyder et de se réduire alternativement (de façon cyclique) sur l'électrode et dans les cellules bactériennes. Ces médiateurs peuvent être des molécules synthétiques ajoutées dans les cultures bactériennes (médiateurs exogènes) ou bien des molécules synthétisées par les bactéries elles-mêmes (médiateurs endogènes).

Certaines espèces bactériennes sont naturellement incapables d'échanger des électrons avec les électrodes par exemple : *Escherichia coli* (Park and Zeikus, 2000), *Pseudomonas spp*, *Bacillus spp* (Shukla et al., 2004) ou *Proteus Vulgaris* (Kim et al., 2000). Elles sont cependant capables de réduire des médiateurs artificiels solubles qui s'oxydent sur des électrodes. Les plus utilisés sont : le rouge neutre, la thionine, les dérivés de quinone, des phénazines, phénothiazines, phénoxazines et des flavines. La forme oxydée du médiateur traverse la membrane cellulaire, capte des électrons d'un ou plusieurs porteurs d'électrons au sein de la cellule, ressort de la cellule sous sa forme réduite et finit

par se ré-oxyder au contact de l'anode. Ces médiateurs présentent certains inconvénients car ils sont souvent toxiques et leur durée de vie est souvent limitée, ce qui nécessite d'en rajouter régulièrement.

En revanche, certaines espèces bactériennes sont capables de produire leurs propres médiateurs. C'est le cas de *Shewanella oneidensis*, *Pseudomonas alcaliphila*, *Pseudomonas aeruginosa*. Il a été démontré que la synthèse d'une quinone (2-amino-3-dicarboxy-1,4-naphtaquinone) et celle d'un pigment (la pyocyanine) étaient respectivement responsables de l'activité électrochimique de *S. oneidensis* (Rabaey et al., 2004) et de *P. aeruginosa* (Freguia et al., 2010). Deux mécanismes sont proposés : soit le médiateur pénètre à chaque cycle d'oxydo-réduction au sein de la cellule comme précédemment soit il reste à l'extérieur de la cellule et les électrons sont transférés au-travers de la membrane cellulaire via des composés membranaires comme des cytochromes.

Des **produits issus du métabolisme bactérien** peuvent également servir de navettes d'électrons entre la cellule et l'électrode. L'exemple le plus connu est celui de l'hydrogène produit par fermentation bactérienne (fermentation sombre) et qui s'oxyde sur les anodes (Niessen et al., 2006)

2.1.2 Transferts directs

Le transfert direct d'électrons entre une bactérie et une électrode a été mis en évidence à la fin des années 90 (Kim et al., 1999) puis repris dans un illustre article au tout début des années 2000 (Bond et al., 2002). Comme son nom l'indique, ce type de transfert met en jeu un contact physique direct entre la membrane externe de la bactérie et l'électrode sans qu'il n'y ait besoin de médiateur. Les échanges d'électrons peuvent se faire par l'intermédiaire de protéines membranaires, des **cytochromes de type C**. Ce type de transfert a été démontré chez deux espèces bactériennes *Geobacter sulfurreducens* et *Shewanella oneidensis*, qui sont devenues, depuis, deux modèles de souches bactériennes électroactives à transfert électronique direct très étudiées (Lloyd et al., 2003; Shi et al., 2007; Wigginton et al., 2007).

Un second mécanisme d'échange direct d'électrons a été avancé en 2005. Il s'agit du concept de **pili** conducteurs ou « nanowire » en anglais. La surface de certaines bactéries sont dotées d'appendices dits pili qui peuvent assurer plusieurs fonctions : mobilité, développement du biofilm (Wall and Kaiser, 1999)... Pour quelques bactéries EA, il a été démontré que certains pili étaient capables de conduire le courant électrique. En se comportant comme des « nano-fils électriques » ces pili assurent le transfert des électrons depuis la cellule jusqu'à l'électrode. Cette découverte fut dans un

premier temps très controversée (Strycharz-Glaven et al., 2011) mais semble désormais validée (Malvankar et al., 2014).

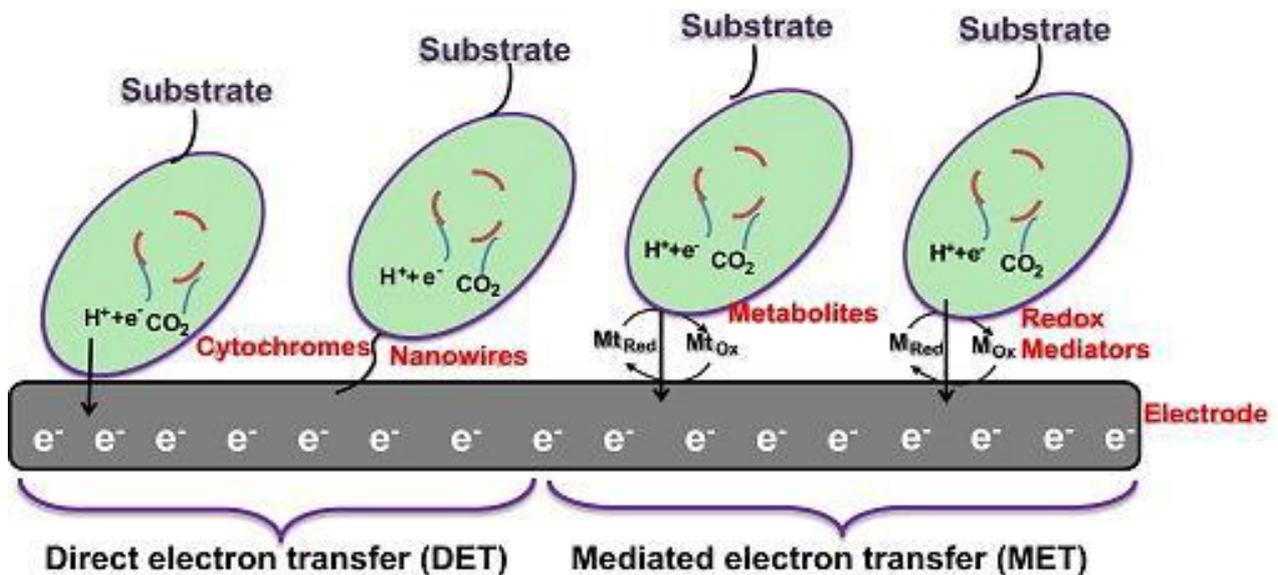


Figure 3 : Représentation schématique des différents mécanismes de transfert d'électrons entre une bactérie et une anode (tiré de Venkata Mohan et al., 2014).

2.2 Principales applications des biofilms électro-actifs

La découverte des biofilms EA a donné lieu à l'écllosion d'une foule de nouveaux procédés dits électro-microbiens (« Microbial electrochemical technology » ou encore « bioelectrochemical systems » en anglais). Ces procédés sont le plus souvent des procédés électrochimiques conventionnels dans lesquels des micro-organismes sont intégrés en tant qu'électro-catalyseurs de la réaction anodique (oxydation) et/ou de la réaction cathodique (réduction). Durant la dernière décennie (et c'est toujours le cas !), une technologie électro-microbienne a fait sensation auprès de la communauté scientifique, il s'agit de la pile à combustible microbienne (PACM ou MFC pour Microbial Fuel Cell). Comme le démontre le graphique de la Figure 4, le nombre d'articles publiés sur les PACMs n'a cessé de croître depuis le début des années 2000.

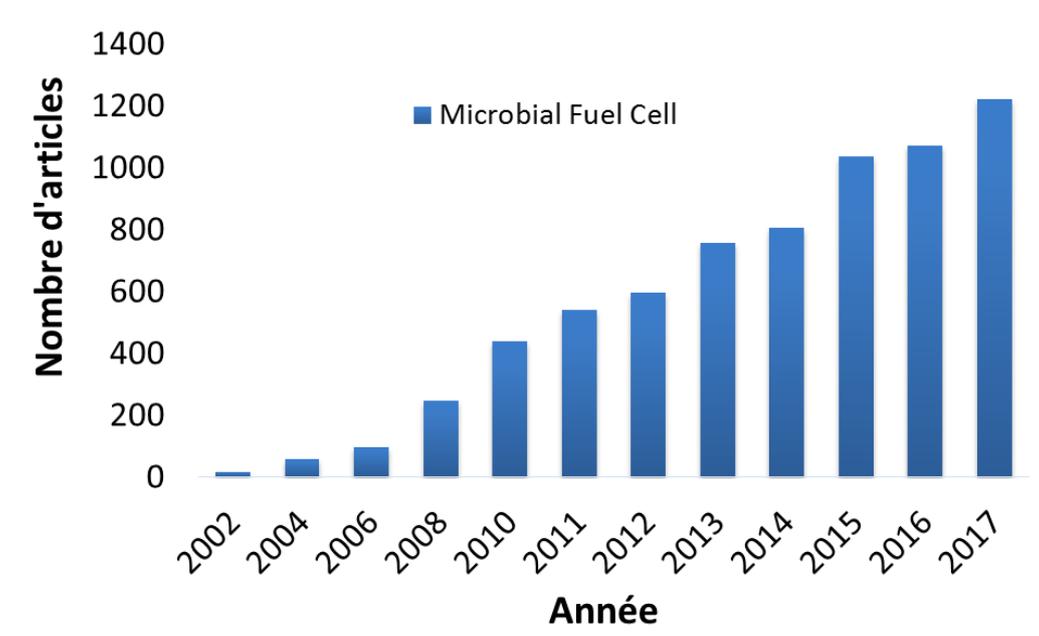


Figure 4 : Evolution du nombre de publications scientifiques sur les PACMs (ou MFC). (Source : Web of Sciences, mai 2018).

Un tel engouement scientifique s'explique par la capacité de cette technologie à extraire de l'énergie électrique de la matière organique à bas coût voire de déchets ou d'effluents. La technologie de la PACM permet de convertir l'énergie chimique contenue dans de la matière organique directement en énergie électrique. Lorsque la matière organique est contenue dans des effluents à traiter, une PACM peut même réaliser la prouesse de produire de l'énergie tout en intensifiant le procédé de traitement. Cette technologie a été envisagée pour générer de l'électricité, traiter des effluents, décontaminer les sols et les eaux souterraines polluées par des métaux lourds ou des composés toxiques (bioremédiation). En transformant la pile en électrolyseur s'ouvrent encore d'autres domaines applicatifs comme la synthèse de molécules à haute valeur ajoutée ou la production d'hydrogène.

2.2.1 Principe général d'une PACM

Une PACM possède un seul ou deux compartiments séparés le plus souvent par une membrane échangeuse d'ions. Le compartiment anodique est anaérobie, il contient l'anode, la source de micro-organismes et l'anolyte. Le compartiment cathodique peut être aérobie ou anaérobie et contient la cathode, un accepteur d'électron et un catalyseur (Figure 5) (Fornero et al., 2010; Hai et al., 2007; Y. Jiang et al., 2014). Les micro-organismes EA s'auto-organisent sous forme de biofilm à la surface de l'anode et catalysent l'oxydation d'un composé organique (substrat). Des électrons sont ainsi transférés de l'anode vers la cathode via un circuit électrique externe. A la cathode, les électrons

réduisent l'oxydant, en général O_2 , pour former H_2O . Un catalyseur abiotique (Pt) ou biotique (micro-organismes) est le plus souvent utilisé pour catalyser les réactions cathodiques.

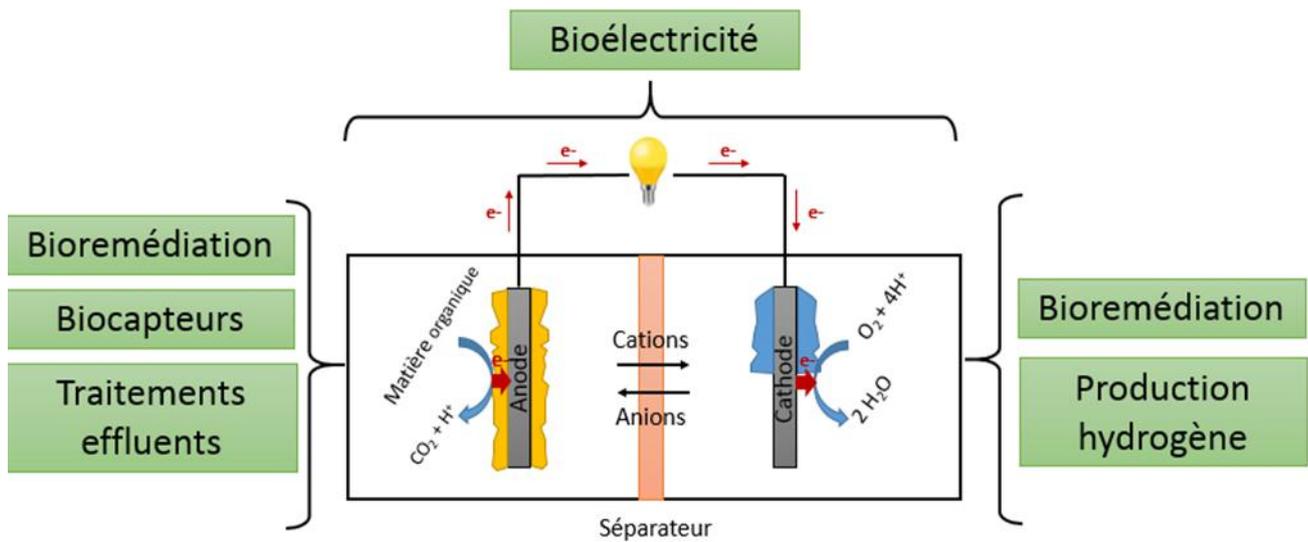


Figure 5 : Schéma du principe général d'une PACM à double compartiment et applications possibles complémentaires à la génération d'électricité dans chacun des compartiments anodique et cathodique.

2.2.2 Exemples d'applications basées sur le concept des PACMs

2.2.2.1 Production d'énergie

De nombreuses études ont été menées pour optimiser la production d'électricité des PACMs. Certaines se sont intéressées au design des PACMs (Huang and Logan, 2008; Yoshizawa et al., 2014); (Logan et al., 2015), à la nature du substrat utilisé (Pandey et al., 2016), à la modification de surface de l'anode (Guo et al., 2015; Kumar et al., 2013; Wei et al., 2011), ou encore à l'utilisation de catalyseurs métalliques à la cathode (Kumar et al., 2016). La nature de la source de micro-organismes, du substrat (donneur d'électrons) et du matériau d'électrode constitue des facteurs essentiels dans les performances d'une PACM. Des exemples de PACMS ayant été testées en utilisant des cultures pures de bactéries connues pour être EA (*Geobacter sulfurreducens* ou *Shewanella oneidensis*) ou des cultures mixtes (boues anaérobies, eaux usées, effluents industriels, terreau de jardin) pour générer de l'électricité sont présentés dans le Tableau 3. Ces exemples ne constituent qu'un infime échantillonnage de la foule des études disponibles dans la bibliographie et ont été choisis surtout pour illustrer la diversité des systèmes bactériens et des performances.

Tableau 3 : Exemples de PACMs utilisées pour produire de l'énergie à partir de cultures bactériennes pures ou mixtes.

Micro-organismes	Type PACM	Substrat	Matériau d'électrodes	Performance	Réf.
<i>Geobacter sulfurreducens</i>	2C	Acétate	Tissu carbone (anode et cathode)	1.9 W.m ⁻²	(Shleev et al., 2015)
<i>Geobacter sulfurreducens</i>	2C	Acétate	Graphite (anode et cathode)	13.1 mW.m ⁻²	(Bond and Lovley, 2003)
<i>Shewanella oneidensis</i>	2C	Lactate	Graphite (anode et cathode)	9.3 mW.m ⁻²	(Lanthier et al., 2008)
<i>Shewanella oneidensis</i> DSP10	2C	Lactate	CV (anode et cathode)	3 W.m ⁻²	(Ringeisen et al., 2006)
Boues anaérobies	2C	Sucrose	CV (anode et cathode)	9.3 mW.m ⁻²	(He et al., 2005)
Boues anaérobies	2C	Acétate	Tissu carbone (anode et cathode)	1.6 W.m ⁻²	(Nevin et al., 2008)
Eaux usées	1C	Glucose	Tissu carbone (anode) Cathode à air en tissu carbone	766 mW.m ⁻²	(Cheng et al., 2006)
Eaux usées	2C	Eaux usées	Papier carbone (anode) Tissu carbone (cathode)	309 mW.m ⁻²	(Min and Logan, 2004)
Terreau jardin	1C	Acétate	Tissu carbone (anode) Cathode à air	6.4 W.m ⁻²	(M. Oliot et al., 2017)

Les performances sont exprimées en Watt par m² de surface projetée de l'anode. 1 ou 2C : un ou deux compartiments, CV : carbone vitreux.

Il est bien difficile de savoir qui d'une culture pure ou mixte permet d'atteindre les performances de PACMS les plus élevées (exprimées en densité de puissance, Watt par m²) car les conditions opératoires (configuration des réacteurs, température, substrat, matériau d'électrodes...) sont très variables d'une étude à l'autre. (Nevin et al., 2008) ont comparé dans des conditions expérimentales similaires des PACMs inoculées avec une culture pure de *Geobacter sulfurreducens* ou avec des eaux usées. De l'acétate a été utilisé comme substrat dans les deux cas. La pile fonctionnant avec la souche pure a fourni 1.9 W.m⁻² contre 1.6 W.m⁻² pour celle inoculée avec des eaux usées. A ce jour, la performance la plus élevée avec une PACM, soit 6.4 W.m⁻² (M. Oliot et al., 2017), a été obtenue avec un inoculum multi-espèces provenant de terreau de jardin. Cette valeur de densité de puissance montre tout le chemin qu'il reste à parcourir pour accéder à des densités de puissance susceptibles de hisser la technologie vers la production massive d'électricité. A titre de comparaison notons qu'une pile hydrogène/oxygène conventionnelle produit plusieurs milliers de W.m⁻².

L'écart reste très grand après plus de 15 années d'intenses recherches sur les PACMs. Les PACMs ne rivalisent donc pas encore avec les piles à combustible conventionnelles, cependant les puissances générées suffisent pour des marchés de niches comme l'alimentation électrique de petits appareils électriques (Shleev et al., 2015) tels que des capteurs distribués, par exemple pour la surveillance météorologique (Tender et al., 2008).

2.2.2.2 *Traitement d'effluents*

Les micro-organismes organisés sous forme de biofilms sur les électrodes étant capables de dégrader la matière organique contenue dans les eaux usées, la technologie PACM peut également servir à traiter les effluents industriels, domestiques ou issus de l'agriculture tout en produisant de l'énergie. L'abattement de la DCO (demande chimique en oxygène) est alors le paramètre essentiel pour évaluer l'efficacité d'un procédé de traitement des eaux usées. Le Tableau 4 présente quelques exemples de PACMs utilisées pour traiter des effluents. Il illustre surtout la grande diversité de l'origine des effluents industriels qui ont été testés dans des PACMs.

Tableau 4 : Exemples de PACMs utilisées pour traiter des effluents.

Origine des effluents	Type PACM	Matériau d'électrodes	Abattement DCO (%)	Réf.
Eaux usées domestiques	2C	Plaques de graphite (anode et cathode)	88	(Oh and Logan, 2005)
Industrie papetière	1C	Brosse en graphite (anode) Tissu de carbone (cathode)	76	(Huang and Logan, 2008)
Carcasses animales	1C	Feutre de graphite + granules de charbon actif (anode) Tissu de carbone (cathode)	51	(Li et al., 2013)
Porcherie	1C	Papier de carbone (anode) Tissu de carbone (cathode)	92	(Min et al., 2005)
Usine de traitement d'amidon	1C	Papier de carbone (anode et cathode)	98	(Lu et al., 2009)
Eaux usées urbaines	2C	Graphite (anode et cathode)	70	(Rodrigo et al., 2007)
Industrie chocolatière	2C	Tige de graphite (anode et cathode)	75	(Patil et al., 2009)

Brasserie	1C	Tissu de carbone (anode et cathode)	98	(Feng et al., 2008)
Usine de manioc	2C	Graphite (anode et cathode)	86	(Kaewkannetra et al., 2011)

1 ou 2C : un ou deux compartiments

Parmi les réalisations marquantes, il faut citer les travaux de l'équipe de Ioannis Ieropoulos de l'Université de l'Ouest de l'Angleterre (UWE Bristol). Ils ont mis au point des toilettes publiques autonomes fonctionnant avec un ensemble de PACMs connectées en parallèle (Figure 6). Des diodes électroluminescentes sont alimentées par l'énergie produite par les PACMs. Pendant 3 mois de test, 2.5 à 5 L d'urine ont été quotidiennement traités pour produire de l'électricité. Après 5 mois, une production d'énergie à hauteur d'environ 75 mW/jour était produite avec un taux d'abattement de DCO de 98% (Ieropoulos et al., 2016). Notons toutefois que ce résultat a nécessité la connexion de 432 piles, soit une surface totale d'électrode de l'ordre de 67 m² et un volume total de réacteur de l'ordre de 0.3 m³.



Figure 6 : Photographies (a) de toilettes publiques conçues avec un ensemble de 432 PACMs installées lors du festival de musique de Glastonbury (Juin 2015), (b) du module d'assemblage des PACMs (tirées de Ieropoulos et al., 2016).

2.2.2.3 *Bioremédiation*

Dans le compartiment cathodique d'une PACM, une large gamme de composés organiques et inorganiques peut être utilisée en tant qu'accepteur d'électrons par les bactéries adhérentes sur les cathodes. Lorsque ces composés sont toxiques, la PACM peut être utilisée pour transformer ces composés par bioélectroréduction afin d'obtenir une forme moins toxique ou une forme plus facile à extraire du milieu. La PACM est alors un outil de bioremédiation. Un grand nombre de métaux lourds présents dans les effluents ou les sols hydratés peuvent être réduits à la cathode via l'activité de certains micro-organismes avant d'être récupérés la plupart du temps sous forme solide (dépôt) (Heijne et al., 2010; Huang et al., 2010; Lefebvre et al., 2013; Li et al., 2009, 2008; Nancharaiah et al., 2015; Tandukar et al., 2009; Tao et al., 2011; Wang et al., 2008; Wang and Chen, 2009; B. Zhang et al., 2012; L.-J. Zhang et al., 2012).

2.2.2.4 *Biocapteurs*

La génération d'électricité des PACMs dépend de la concentration en matière organique (combustible) au voisinage de l'anode microbienne et de la concentration en oxydant que « voit » la cathode. Il est donc possible de corréler la réponse en courant électrique d'une PACM aux concentrations en combustible ou en oxydant présents dans le milieu environnant les électrodes. Des PACMS ont démontré leur capacité à quantifier des composés organiques tel que l'acétate ou le glucose (Kumlanghan et al., 2007)(Estevez-Canales et al., 2015), de la DCO (Peixoto et al., 2011) mais également des contaminants présents dans les effluents (Lee et al., 2015). Cela permet d'envisager une application potentielle dans les stations d'épuration grâce au développement de biocapteurs autonomes. Effectivement, à l'inverse des capteurs conventionnels, la PACM ne nécessite pas d'alimentation externe puisqu'elle peut être autonome en énergie en utilisant la matière organique comme source d'électrons.

2.2.2.5 *Synthèse de molécules d'intérêt*

En 2005, les groupes de B. Logan (Penn state, USA) (Liu et al., 2005b) et de H.V.M. (Bert) Hamelers (Wageningen, Pays-Bas) (Buisman and Rozendal, 2005) ont introduit concomitamment le concept de la cellule d'électrolyse microbienne (CEM). Contrairement à la PACM, la CEM nécessite l'apport d'une source externe d'électricité afin de forcer des réactions électrochimiques non spontanées, comme la réduction de l'eau en hydrogène à la cathode. Pour entamer une production

d'hydrogène, une tension de l'ordre de 0.5-1.5 V est suffisante pour une CEM contre 2.0-3.0 V avec un électrolyseur conventionnel. La tension à fournir est plus faible dans une CEM car ce n'est plus l'eau qui est oxydée à l'anode, mais de la matière organique grâce à l'activité catalytique du biofilm. Une large gamme de matière organique et d'effluents peut être utilisée dans une CEM pour produire de l'hydrogène. Entre autres, (Cheng and Logan, 2007a) ont concrétisé la production d'hydrogène en oxydant à l'anode de la cellulose, de l'acétate, du butyrate ou du propionate. Des CEM de plusieurs litres ont été réalisées (Baeza et al., 2017; Guo et al., 2017) montrant clairement la volonté des scientifiques d'aller au plus tôt vers des procédés commercialisables. Toutefois, les densités de courant restent encore faibles, inférieures à 100 A.m^{-2} (Carmona Martinez et al., 2015) alors que les procédés d'électrolyse conventionnels fonctionnent avec des densités de courant au moins un ordre de grandeur plus élevées.

Les CEMs offrent aussi l'accès à la synthèse d'une grande variété de molécules d'intérêt notamment en catalysant la réduction du dioxyde de carbone (CO_2) par l'intermédiaire de biofilms cathodiques appropriés. Il a ainsi été possible de synthétiser de l'acétate (Marshall et al., 2013) du butyrate (Batlle-Vilanova et al., 2017) ou même du glycérol en présence de fumarate (Soussan et al., 2013). L'évolution du nombre d'articles, 100 publications sur les CEMs en 2005 contre 572 en 2017 (Source : Science direct Mai 2018) montre l'engouement des chercheurs pour ces nouvelles applications.

3 LA BIOANODE

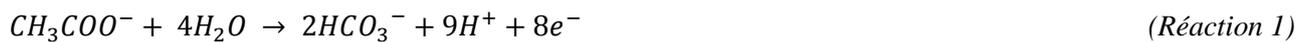
Un grand nombre de procédés électro-microbiens, si ce n'est la plupart, opère avec une anode microbienne, c'est-à-dire une anode sur laquelle un biofilm EA s'est développé. L'optimisation des performances des anodes microbiennes représente donc un enjeu majeur pour le développement de ces technologies.

3.1 Procédure de formation

La mise en place d'un biofilm EA à la surface d'une anode est assez simple. Une électrode inerte est immergée dans une solution qui contient un substrat, est dépourvue d'oxygène ou d'autres accepteurs d'électrons solubles (pour privilégier l'anode comme seul accepteur d'électrons) et est inoculée avec une souche pure ou un inoculum multi-espèces. L'anode est ensuite polarisée à un potentiel fixe par rapport à une électrode de référence, généralement entre -0.6 et +0.5 V vs. SHE (Rimboud et al.,

2014), ou elle est couplée à une cathode via une simple résistance électrique, à condition que $E_{cathode}$ soit supérieur à E_{anode} . Les bactéries EA présentes dans le milieu dégradent le substrat (donneur d'électrons) qui leur sert de source de carbone et d'énergie, et évacuent les électrons issus de cette oxydation vers l'anode par l'intermédiaire des différents mécanismes discutés dans la section 2.1 de ce chapitre. En d'autres termes les micro-organismes « respirent » l'anode qu'ils utilisent comme accepteur final d'électrons.

Les bactéries EA sont capables d'utiliser tous types de matières organiques allant des molécules simples (acétate, glucose, fructose...) aux composés plus complexes (cellulose, amidon...) contenues dans différents types d'effluents issus de l'agriculture, des industries, des eaux usées... (Pandey et al., 2016; Pant et al., 2010). L'acétate est l'un des substrats les plus utilisés (Santoro et al., 2017) car c'est un composé facilement assimilable par les bactéries. L'acétate est oxydé par les bactéries selon la réaction suivante :



Ainsi 1 mole d'acétate libère 8 moles d'électrons et 9 moles de protons. Le biofilm microbien se développe ensuite progressivement au fur et à mesure de la consommation du substrat en faisant évoluer le courant en fonction du temps suivant une courbe qui a le plus souvent l'allure d'une sigmoïde.

3.2 Facteurs limitants

La performance d'une anode microbienne s'évalue généralement par la densité de courant (J , A/m²) qu'elle génère et par l'efficacité (CE, %) avec laquelle le substrat est utilisé (Logan et al., 2006). La performance peut être affectée par différents facteurs.

Un premier facteur est le **transport de matière**. A l'anode, le substrat est continuellement consommé par le biofilm microbien. En régime stationnaire, son transport depuis la solution jusqu'au voisinage de l'électrode se fait à une vitesse équivalente à la vitesse de consommation. La consommation est due à la réaction d'oxydation catalysée par les bactéries EAs (1). Dans les biofilms multi-espèces, des cellules non EA peuvent en outre consommer le substrat sans produire d'électrons extracellulaires. Le transport du substrat peut donc devenir une étape limitante du processus électro-microbien. De plus, l'accumulation des produits au sein du biofilm, et notamment des protons (1), peut altérer l'activité métabolique du biofilm. En effet, l'acidification locale est très

nuisible au développement bactérien et à l'activité électro-catalytique du biofilm. Il a été démontré que des valeurs de pH inférieures à 6.7 diminuent significativement les performances électrochimiques des bioanodes (Franks et al., 2008; Kim and Lee, 2010; Patil et al., 2010). Le design de l'anode et les conditions opératoires peuvent atténuer ce problème (Logan et al., 2006; Debabov, 2008) mais l'acidification locale des biofilms anodiques reste un verrou majeur des anodes microbiennes.

Un deuxième facteur est la **chute ohmique**. La conductivité électrique du matériau d'électrode doit être la plus élevée possible afin d'éviter les pertes ohmiques au sein de l'électrode. La conductivité des électrodes de carbone est suffisante (de l'ordre de 3.10^4 à 1.10^5 S.m⁻¹) pour que leur résistance reste négligeable pour les petites surfaces utilisées dans les réacteurs de laboratoire, généralement de l'ordre de quelques centimètres carrés. Par contre, il est généralement admis qu'il serait nécessaire de leur adjoindre un collecteur de courant métallique si des électrodes de carbone devaient être déployées sur de grandes surfaces. Au sein du réacteur, pour chaque charge négative transférée à l'anode et récupérée à la cathode, une quantité équivalente de charges ionique doit se mouvoir en solution pour compenser le déséquilibre. La résistance rencontrée par les ions au sein de l'électrolyte participe également à l'apparition des pertes ohmiques, surtout pour les procédés électro-microbiens qui fonctionnent le plus souvent avec des milieux de conduction ionique faible (Oliot et al., 2016). Pour améliorer le transport des ions, la conductivité de l'électrolyte doit être accrue, autant que le permet la bioanode, et l'espacement des électrodes doit être minimisé (Rozendal et al., 2008).

Un troisième facteur peut être la **surtension d'activation**. Pour que le transfert d'électron entre les bactéries EA et l'électrode se produise, une barrière énergétique doit être franchie ce qui induit une surtension d'activation. Les interactions bactérie-électrode qui sont dépendantes des propriétés de surface de l'anode constituent un paramètre clé pour réduire les surtensions d'activation.

Un dernier facteur est la **compétition pour le substrat**. Les processus tels que la fermentation, la méthanogénèse ou la respiration cellulaire entrent en compétition vis-à-vis de la consommation de certains substrats. Le substrat n'est pas uniquement consommé pour générer du courant, ce qui peut induire une limitation des performances des bioanodes (Rabaey et al., 2009). La maîtrise de la communauté microbienne à l'anode (type de bactérie, composition microbienne, interactions entre bactéries) et l'élimination des accepteurs d'électrons solubles seraient des moyens d'éviter ces types de limitation.

3.3 Voies d'optimisations

Les pertes de performance évoquées ci-dessus doivent être minimisées afin d'optimiser l'efficacité des bioanodes. En ce sens, plusieurs voies d'optimisation peuvent être envisagées.

3.3.1 Matériau d'électrode

Le choix du matériau d'électrode est déterminant pour la conception d'une bioanode. Un bon matériau doit obéir à plusieurs critères. Il doit tout d'abord nécessairement avoir une bonne conductivité électrique (pour minimiser les pertes par chute ohmique lors de l'utilisation de grandes surfaces) et être biocompatible (pour permettre le développement des micro-organismes sur sa surface). Ensuite pour des considérations d'applications industrielles, il doit avoir une bonne durabilité, être résistant à la corrosion, être chimiquement stable et être bon marché (Logan et al., 2006). Les matériaux à base de carbone et certains métaux répondent à tous ces critères et sont d'ailleurs les plus utilisés comme support d'électrode pour les biofilms EA, sous des formes très variées (Figure 7).

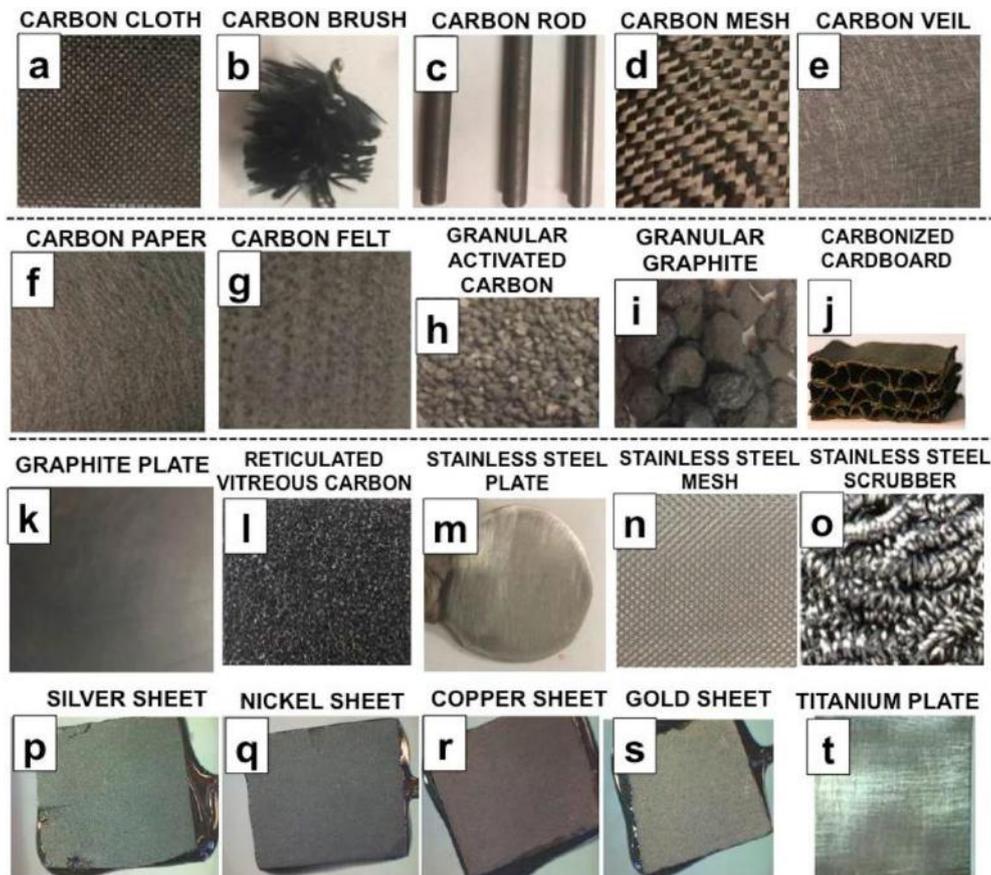


Figure 7 : Photographies des matériaux d'électrodes les plus utilisés (tirées de Santoro et al., 2017).

3.3.1.1 *Carbone*

A ce jour, les matériaux les plus employés dans les procédés électro-microbiens sont à base de carbone ou de ses dérivés (graphite, graphène, charbon actif...). Leur biocompatibilité élevée en fait de bons candidats pour des expériences de laboratoire. Ces dernières années, de nombreuses formes d'électrode en carbone et de ses dérivés ont été testées : des papiers (Liu et al., 2005a; Jia et al., 2016); (Mohamed et al., 2017), des tissus (Zhang et al., 2009, 2010; Manon Oliot et al., 2017); (Zhao et al., 2008; Zhu et al., 2011), en mailles (Wang et al., 2009), en plaques (Tender et al., 2002; Dewan et al., 2008) ou sous forme de tiges (Torres et al., 2008a; Patil et al., 2011)... Toutefois, leur conductivité est parfois un peu limitée, de l'ordre de 3.10^4 à 1.10^5 S.m⁻¹, et peut alors nuire à une extrapolation lors du passage à de grandes surfaces d'électrode.

3.3.1.2 *Métaux*

L'utilisation d'électrodes métalliques a également été envisagée et évaluée afin d'augmenter les performances électrochimiques des biofilms EA. En effet, la conductivité électrique d'un métal est plus élevée que celle du carbone (cuivre : 585×10^5 S.m⁻¹ et graphite : 1×10^5 S.m⁻¹). Un critère primordial pour la conception d'une bioanode métallique est la résistance à la corrosion, ce qui fait que seuls des métaux nobles (or, argent, platine...) ou des aciers inoxydables peuvent être employés. Pourtant, récemment, Baudler et ses collaborateurs ont pu démontrer que d'autres métaux tels que le cuivre ou le nickel (Baudler et al., 2015a) peuvent servir d'anode, certainement parce que le potentiel d'électrode utilisé protégeait le matériau des phénomènes de corrosion. Le Tableau 5 donne quelques exemples d'électrodes métalliques qui ont été expérimentées. On peut noter encore une fois, qu'une large variété a été testée, même le titane (Michaelidou et al., 2011) alors que les électrochimistes connaissent son incapacité à former des anodes car il se recouvre d'un oxyde non-conducteur.

Tableau 5 : Exemples d'électrodes métalliques ayant été expérimentées en tant que matériau support pour une bioanode. Les valeurs des conductivités électriques sont tirées de (Helmenstine).

Matériau d'anode	Conductivité électrique (x 10 ⁶ S.m ⁻¹)	Caractéristiques	Références
Plaque argent	62.1	+ : conductivité élevée - : cher pas biocompatible	(Baudler et al., 2015b)
Plaque acier inox 316L	1.32	+ : pas cher (9.47\$/m ²) - : faible biocompatibilité, couche passivation	(Erable and Bergel, 2009; Baudler et al., 2015b)
Plaque cuivre	58.5	+ : pas cher (0.53\$/m ²), - : conditions expérimentales limitées	(Baudler et al., 2015b)
Plaque nickel	14.3	+ : biocompatible - : conditions expérimentales limitées	(Baudler et al., 2015b)
Plaque or	44.2	+ : biocompatible - : cher	(Richter et al., 2008; Baudler et al., 2015b)
Titane	2.4	- : faible performance, nécessite une modification de surface	(Michaelidou et al., 2011)

3.3.2 Configurations d'électrode

Une comparaison des performances anodiques obtenues avec différentes formes d'électrodes en carbone (tiges de graphite, tige de carbone, papier de carbone, tissu de carbone) dans des conditions identiques a révélé qu'en plus de la nature du matériau, la configuration et la géométrie de surface de l'anode constitue un facteur important (Rimboud et al., 2014). Ces dernières années, des recherches se sont tournées vers l'élaboration de géométries d'anodes susceptibles d'offrir la plus grande surface possible pour le développement du biofilm microbien. Un fort engouement pour l'utilisation d'électrodes tridimensionnelles (3D) est ainsi apparu (Figure 8). Depuis 2013, le nombre d'articles scientifiques sur l'utilisation d'électrodes 3D dans les PACMs (ou MFC pour Microbial fuel cell) n'a cessé de croître.

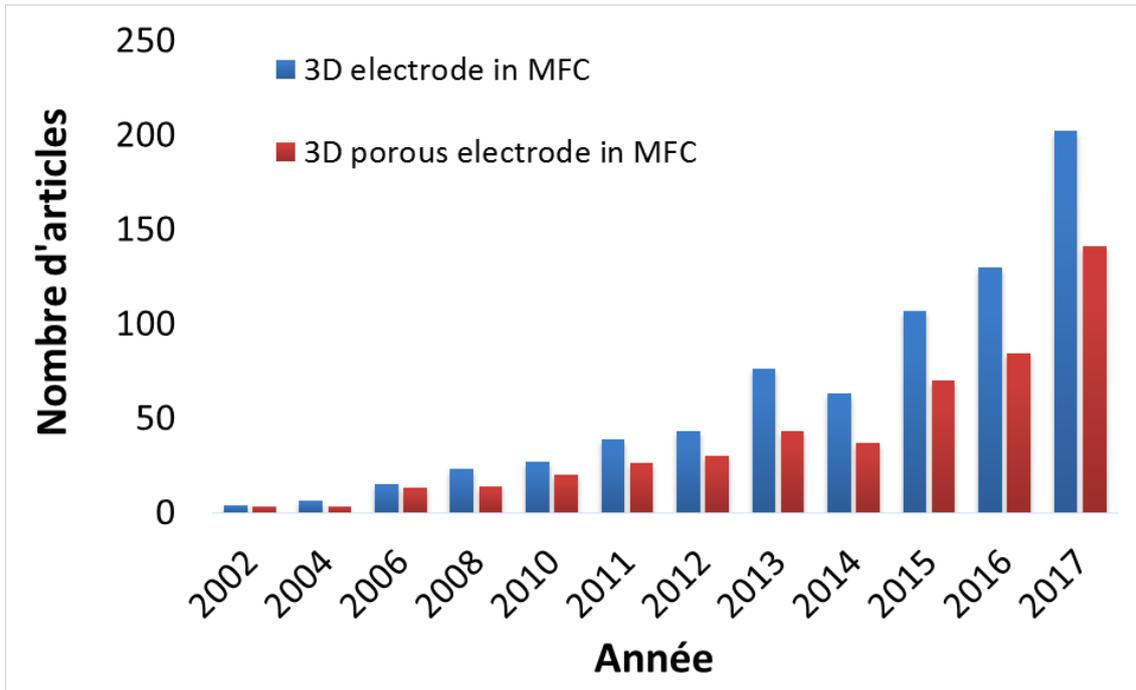
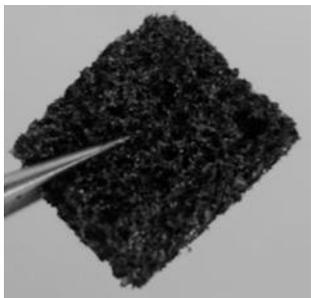


Figure 8 : Evolution du nombre de publications scientifiques sur l'utilisation d'électrodes 3D dans les PACMs. (Source : ScienceDirect au 17/05/2018).

L'atout majeur d'une anode 3D comparé à une anode 2D est la promesse d'une surface active beaucoup plus importante. Différentes configurations d'électrode 3D ont été testées : des feutres, des brosses, des granules, ou encore des mousses... Le Tableau 6 donne quelques exemples de ces configurations en y associant les performances qu'elles ont produites par rapport à une électrode 2D mise en œuvre dans les mêmes conditions expérimentales.

Tableau 6 : Performances anodiques obtenues avec une électrode 3D vs une électrode 2D.

Electrode 3D	Source d'inoculum	Contrôle (électrode 2D)	Facteur d'amélioration des performances	Références
<p>Granules de graphite</p> 	Culture mixte	Plaque de graphite	x 2 (de la tension de la PACM)	(I. Rabaey et al., 2005)
<p>Brosse de graphite</p> 	Culture mixte	Papier ou tissu de carbone	x 2.4 2D : 600 mW.m ⁻² 3D : 1430 mW.m ⁻²	(Logan et al., 2007)
<p>Mousse de graphite</p> 	<i>Rhodoferax ferrireducens</i>	Tige de graphite	x 2.4 2D : 31 mA.m ⁻² 3D : 74 mA.m ⁻²	(Chaudhuri and Lovley, 2003)

Comme illustré dans le Tableau 6, une géométrie 3D d'électrode peut accroître sensiblement les performances des bionodes. Selon la Figure 8, force est de constater que parmi les études menées sur les anodes 3D beaucoup d'études utilisent en fait des anodes 3D poreuses. La porosité couplée à une configuration 3D devient en effet une option de plus en plus envisagée pour l'optimisation des bioanodes. Cette partie est développée à la section 4 de ce chapitre.

3.3.3 Modifications de surface

Les propriétés de surface du matériau d'anode constituent également un paramètre clé pour l'amélioration des performances d'une bioanode. Des modifications de surface sont apportées aux

électrodes pour favoriser l'adhésion bactérienne et/ou pour accroître la vitesse de transfert des électrons à l'interface électrode/biofilm EA. Le Tableau 7 présente des exemples de traitements de surface utilisés. On y distingue des traitements chimiques (gaz ammoniac, acide...), thermiques ou électrochimiques. Des revêtements de surface par des matériaux conducteurs (nanoparticules, polymères...) se sont également montrés efficaces.

Tableau 7 : Exemples de modifications de surface d'anodes et amélioration conséquentes des performances.

Anode de base	Traitement	Amélioration des densités de puissance (mW.m ⁻²)	Observations	Références
Tissu de carbone	Chimique (NH ₃ gaz)	+20%	Augmentation des charges positives à la surface de l'anode	(Cheng and Logan, 2007b)
Tissu de carbone	Chimique (NH ₃ gaz)	+33%	Augmentation des charges positives à la surface de l'anode	(Hao Yu et al., 2007)
Feutre de graphite	Chimique (Acide HNO ₃)	x 2	Augmentation de la surface active	(Scott et al., 2007a)
Brosse de carbone	Chimique (Acide H ₂ SO ₄)	+25%	Augmentation des charges positives à la surface de l'anode	(Feng et al., 2010a)
Maille en carbone	Thermique	+3%	Augmentation de la surface active	(Wang et al., 2009)
Brosse de carbone	Thermique	+8%	Augmentation de la surface active	(Feng et al., 2010a)
Feutre de graphite	Electrochimique	+40%	Amélioration des transferts d'électrons par les groupes carboxyle formés	(Tang et al., 2011)
Papier en carbone	Revêtement CNT	+20%	Augmentation de la surface active et de la conductivité électrique	(Sun et al., 2010)
Tissu de carbone	Revêtement MWCNT	x 1.7 à 43 en fonction des réacteurs	Augmentation de la biocompatibilité	(Tsai et al., 2009)
Feutre de graphite	Revêtement PANI	x 1.8	Augmentation de la surface active et de la conductivité électrique	(Scott et al., 2007b)

(CNT : nanotube de carbone, MWCNT : nanotube de carbone multi-parois et PANI : polyaniline).

Ces modifications de surface permettent généralement :

- d'augmenter la surface active de l'électrode par la création d'une rugosité de surface de l'ordre de quelques microns qui améliore l'adhésion bactérienne.
- d'augmenter le nombre de charges positives à l'anode ; sachant qu'une bactérie est chargée négativement, l'adhésion bactérienne est supposée être renforcée sur une surface chargée positivement et la phase initiale de production de courant est raccourcie (Cheng and Logan, 2007b).
- d'améliorer la conductivité électrique du matériau d'anode, principalement par le revêtement de nanoparticules de carbone ou de polymères afin de faciliter le transfert électronique entre bactérie et électrode.
- d'augmenter la biocompatibilité de l'électrode.

4 BIOANODE POREUSE : IMPORTANCE DE LA TAILLE DES PORES (PUBLICATION 1)

En considérant le nombre d'articles qui leur sont consacrés et les densités de courant rapportées (Figure 8), il semblerait que les anodes 3D poreuses soient une configuration d'électrode certainement prometteuse pour obtenir les performances électrochimiques les plus élevées possibles. Toutefois, il arrive qu'une anode 3D poreuse ne soit pas plus efficace qu'une anode 2D plane. Blanchet et al., ont comparé dans des conditions similaires, en utilisant des bouées activées comme inoculum et des bio-déchets comme substrat, les densités de courant produites par des bioanodes formées sur un feutre de carbone (anode 3D poreuse) et un tissu de carbone (anode 2D) (Blanchet et al., 2016). Les deux électrodes avaient la même surface projetée ($2 \times 3 \text{ cm}^2$) et des épaisseurs différentes : $5000 \mu\text{m}$ pour le feutre et $500 \mu\text{m}$ pour le tissu de carbone. Le tissu et le feutre présentaient des fibres de même diamètre ($10 \mu\text{m}$) avec cependant des espacements entre les fibres différents : très resserrés pour le tissu et beaucoup plus larges pour le feutre ($20\text{-}200 \mu\text{m}$). Le feutre présentait ainsi une structure 3D poreuse qui aurait dû en théorie assurer le développement d'une surface de biofilm EA bien plus grande et donc conduire à une densité de courant largement supérieure à celle de l'anode 2D plane. Au contraire, le tissu a produit une densité maximale de courant (1.6 A.m^{-2}) légèrement supérieure à celle du feutre (1.3 A.m^{-2}). Des images au microscope électronique à balayage de la colonisation des électrodes au bout de 37 jours ont révélé que la surface

du tissu était complètement recouverte de biofilm tandis que seulement 32% du volume du feutre était colonisé (Blanchet et al., 2016). Sur les 5000 μm d'épaisseur du feutre les bactéries n'avaient ainsi pénétré que sur les 800 premiers μm de part et d'autre. Ces travaux mettaient en évidence une notion primordiale pour l'élaboration d'une anode 3D poreuse qui est la capacité du biofilm à coloniser ou non l'intérieur de la structure. Il a donc paru essentiel de dresser un état de l'art sur les caractéristiques et les performances des anodes microbiennes 3D poreuses. La grille de lecture choisie était simple : analyser l'effet de la taille des pores sur *i*) la colonisation microbienne des bioanodes et *ii*) la densité de courant produite. Ce travail a fait l'objet d'un article de revue bibliographique soumis au journal Biosensors and Bioelectronics.

Critical review of the performance of 3-dimensional porous microbial anodes

Poehere Chong, Benjamin Erable, Alain Bergel

Laboratoire de Génie Chimique, CNRS, Université de Toulouse (INPT), 4 allée Emile Monso, 31432 Toulouse, France

E-mail addresses: poehere.chong@ensiacet.fr, benjamin.erable@ensiacet.fr,
alain.bergel@ensiacet.fr

Corresponding author: Poehere Chong, (+33) 5 34 32 36 27

poehere.chong@ensiacet.fr, *Laboratoire de Génie Chimique, Site de Labège, BP 84234, Campus INP-ENSIACET, 4 allée Emile Monso, 31432 Toulouse cedex 4*

Abstract

Microbial anodes are the cornerstone of most electro-microbial processes. Designing 3-dimensional porous electrodes to be colonized by electroactive biofilms is currently a very interesting challenge because it may offer an efficient way to boost their performance. Three-dimensional porous microbial anodes are reviewed here by analysing the current density they produce vs. their pore size. Pore sizes of a few micrometres can enable actual penetration of microbial cells but in conditions that do not favour efficient development of electroactive biofilms. Pores of a few tens of micrometres are subject to clogging as a uniform biofilm forms over the structure. Sizes of a few hundreds of micrometres allow penetration of the biofilm inside the structure, but biofilm development is limited by mass transport, particularly that of the buffering species. If the objective is to enhance current density, pore sizes of the order of a millimetre prove to be the most suitable. A simple theoretical approach shows that pore size, porosity and specific surface area must be maximized in order to maximize the current density. As these three parameters cannot be increased concomitantly, it is necessary to seek an optimum combination. In addition, mass transport of buffering species inside the pores must be taken into account as the main limiting factor.

Keywords: Bioanode; porosity; pore size; microbial fuel cell; bioelectrochemical system.

1. INTRODUCTION

The capacity of microbial biofilms to catalyse electrochemical reactions has led researchers to rethink all electrochemical processes (Wang and Ren, 2013; Schröder et al., 2015; Bajracharya et al., 2016). Introducing microbial electrocatalysis in fuel cells, electrolysis cells, electrosynthesis cells, electro dialysis cells, sensors, and any other kind of process that may involve electrochemistry, has encouraged the emergence of an extraordinary variety of new technologies. Some exaggerated prospects have often been announced but there can be no doubt that this conceptual blossoming will lead to practical applications, such as powering remote sensors (Dewan et al., 2014) and designing autonomous sensors (Di Lorenzo et al., 2009; Pasternak et al., 2017). Several new technologies, based on simple galvanic coupling of anode and cathode, also seem promising, e.g. the electrochemical snorkel (Erable et al., 2011) and the catalysis of direct interspecies electron transfer through conductive particles (Kato et al., 2011, 2012; Liu et al., 2012).

Regardless of the intended application, the objective is often to increase the process rate. An ideal way to achieve this is to use 3-dimensional (3D) porous electrodes in order to increase the surface area of the electroactive biofilm. Electro-microbial processes have thus made increasing use of 3D porous electrodes, as illustrated in Figure 9 for the specific case of microbial anodes employed in microbial fuel cells (MFC). From 2002 to 2017, among 822 articles using 3D microbial anodes in MFCs, more than 65% concerned 3D porous structures.

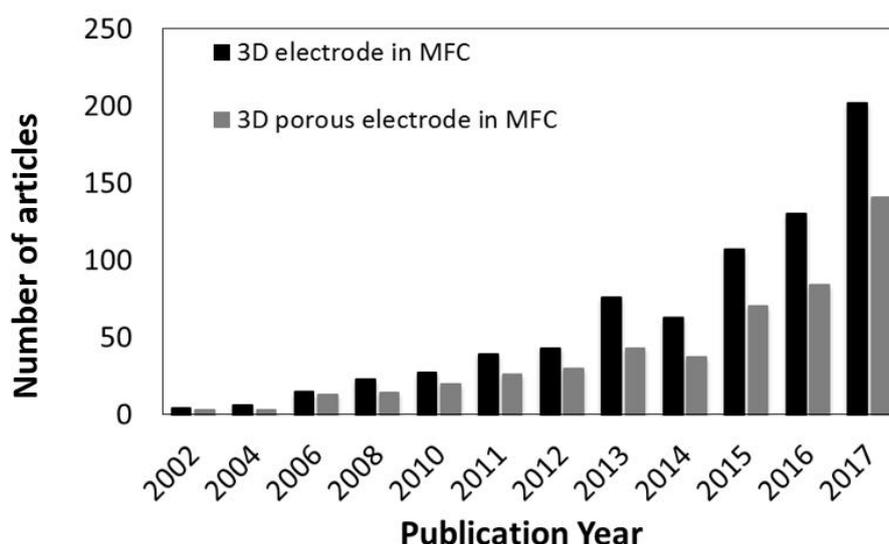


Figure 9: Histogram of the number of articles reporting the use of 3D electrodes (black) and 3D porous electrodes (grey) in microbial fuel cells. The 3D non-porous electrodes were mainly composed of brushes (Logan et al., 2007; Feng et al., 2010b) and beds of granules (Aelterman et al., 2008; K. Rabaey et al., 2005; Wang et al., 2011). (From ScienceDirect accessed May 2018).

Defining optimal porous structures is therefore an essential challenge in the development of electro-microbial processes. Several recent review articles have described the various kinds of porous electrodes that can be implemented (Lai et al., 2018), including their fabrication processes (Yu et al., 2017) and the performance obtained in electro-microbial devices (Xie et al., 2015). Nevertheless, it remains difficult to discern an optimal range of pore size for microbial electrodes, or even to establish whether an optimal range of pore sizes may exist. The objective of the present review article is to provide information to answer these questions.

2. GENERAL OVERVIEW AND ORGANIZATION OF THE REVIEW

The performances reported in the literature were compared on the basis of the maximum current density expressed with respect to the projected surface area of the electrode (J_{\max} , $A.m^{-2}$). The performance was analysed as a function of the electrode pore size by defining four categories:

- 1- pore size less than 10 μm ,
- 2- pore size from 10 to 100 μm ,
- 3- pore size from 100 to 500 μm ,
- 4- pore size above 0.5 mm.

It was thus possible to analyse around 70 different microbial anodes (the number of electrodes was chosen and not the number of articles because an article can describe several types of electrodes). Actually, many other examples of 3D porous electrodes have been reported in the literature (Figure 9) but it was not always possible to find a reliable value of the mean pore size. In particular, beds of granules were not included in the present analysis, although they constitute 3D porous structures, because they generally have a wide range of pore sizes, which are very difficult to characterize and to represent through a single mean value.

The maximum current density reported for each electrode was plotted as a function of the four pore size categories defined above (Figure 10). Firstly, this graph revealed the great importance of the pore size on the current output. It also unambiguously revealed that the weakest and the best performance were delivered by the smallest ($< 10 \mu m$) and the largest ($> 0.5 \text{ mm}$) pore sizes, respectively. This simple graph gave a quick initial answer to questions about the possible existence of an optimal pore size for microbial anodes: an optimal pore size range does indeed exist and it is of the order of a millimetre.

The general evolution showed that J_{\max} increased as the pore size range decreased. This trend was counter-intuitive because, generally, the available surface area increases when the pore size decreases. This relationship is not always valid because the link between the available surface area and the pore size depends on the porosity (i.e. void fraction). Nevertheless, the pore size is generally decreased in order to increase the available surface area. With this rule of thumb in mind, the evolution of J_{\max} in the opposite sense to the available surface area is intriguing and deserves deeper analysis, category by category.

To achieve this analysis, current densities were classified in four groups:

$$J_{\max} \leq 5 \text{ A.m}^{-2}$$

$$5 \text{ A.m}^{-2} > J_{\max} > 25 \text{ A.m}^{-2}$$

$$25 \text{ A.m}^{-2} > J_{\max} > 45 \text{ A.m}^{-2}$$

$$J_{\max} > 80 \text{ A.m}^{-2} \text{ (none of the electrodes analysed gave } J_{\max} \text{ between 45 and } 80 \text{ A.m}^{-2}\text{)}$$

These four groups of current density values were used to present the experimental data in the form of histograms showing the mean current density for the four ranges of pore size (Figure 10). Each section below is commented using the commonly employed distinction between monolithic and fibrous porous electrodes. (Xie et al., 2015; Yu et al., 2017). Monolithic electrodes are manufactured from a continuous block, which is initially made with pores or has been perforated to create pores. This category gathers together porous electrodes in the form of foams and sponges e.g., made from aerogels and natural, organic and inorganic, porous templates, often by carbonization. Fibrous porous electrodes are composed of a tight or open network of interwoven threads such as carbon paper, mesh, cloth or felt. When no indication about an equivalent pore size was given in the article, the mean spacing between fibres of the network was considered as the pore size here.

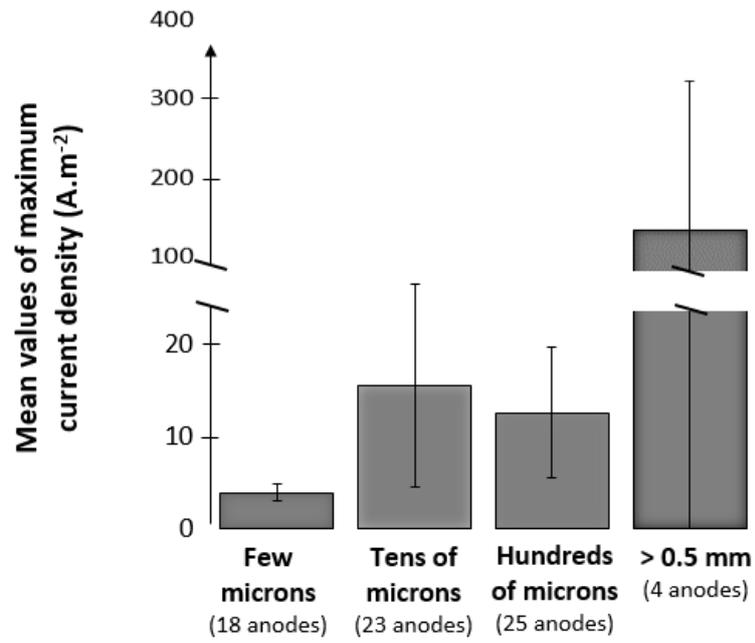


Figure 10: Histogram of the mean values of maximum current density as a function of four ranges of pore size (based on around 70 different electrodes).

3. PORE SIZE LESS THAN 10 MICROMETRES (TABLE 1)

Table 1: Examples of three-dimensional porous bioanodes with pore sizes less than 10 μ m in bioelectrochemical systems.

Bioanodes	Reactor type	Inoculum	Substrate	J_{\max} (A.m ⁻²)	Pore size (μ m)	Reference
<u>FIBRE BASED</u>						
<i>Carbon</i>						
Carbon cloth 1	MFC 2C/NA	<i>S. oneidensis</i>	Lactate 18 mM	0.4	< 10	(Zhao et al., 2015)
Carbon cloth 2	MFC 1C/Fed-B	Activated sludge	Food wastes	3.5	< 10	(Blanchet et al., 2016)
Carbon cloth 3	MFC 2C/ Fed-B	<i>S. oneidensis</i>	Lactate 18 mM	3.3	< 10	(X. Yang et al., 2016)
Carbon cloth 4	MFC 1C/Batch	Wastewater	Acetate NA	5.3	< 10	(Manickam et al., 2013)
Activated carbon nanofibre	MFC 1C/Batch	Wastewater	Acetate NA	0.35	< 10	(Manickam et al., 2013)
Carbon fibre 1	1C/Fed-B <i>Polarization</i> 0.2V vs Ag/AgCl	Wastewater	Acetate 10 mM	21.9	NA	(He et al., 2011)
Carbon fibre 2		Wastewater	Acetate 10 mM	30.8	NA	(He et al., 2011)
Carbon fibre 3		Wastewater	Acetate 10 mM	29.9	NA	(He et al., 2011)
Carbon fibre 4		Wastewater	Acetate 10 mM	25.2	NA	(He et al., 2011)
Carbon fibre 5		Wastewater	Acetate 10 mM	17.4	NA	(He et al., 2011)
<i>Hybrid</i>						
BC/PANI	MFC 2C/NA	Anaerobic sludge	Glucose 10 g/L	0.617	< 2	(Mashkour et al., 2016)
PEDOT nanofibre	MFC 2C/ Fed B	<i>S. oneidensis</i>	TSB	0.16	< 10	(Jiang et al., 2015a)

MFC: Microbial fuel cell, Fed-B: Fed-batch, 1C or 2C: 1 or 2 compartments, BC: black carbon, PANI: polyaniline, PEDOT: poly (3,4-ethylenedioxythiophene).

Bioanodes	Reactor type	Inoculum	Substrate	J_{max} (A.m ⁻²)	Pore size (μ m)	Reference
<u>MONOLITHIC</u>						
<i>Carbon</i>						
Carbonized Corn Stem	MFC 1C / Fed-B	Sewage station	Acetate 100 mM	31.2	2-7	(Karthikeyan et al., 2015a)
Carbonized polyacrylonitrile	MFC 1C / NA	<i>E.coli</i>	Glucose 2 g/L	2.03	5	(Y.-Q. Wang et al., 2015)
Carbonized polyacrylonitrile + graphite	MFC 1C / NA	<i>E.coli</i>	Glucose 2 g/L	2.91	2.5	(Y.-Q. Wang et al., 2015)
Graphene aerogel	MFC 2C / Fed-B	<i>S. oneidensis</i>	Lactate 18 mM	1.5	2-10	(Zhao et al., 2015)
Graphene aerogel + nanoparticles Pt	MFC 2C / Fed-B	<i>S. oneidensis</i>	Lactate 18 mM	2.4	2-10	(Zhao et al., 2015)
Graphene aerogel + Nitrogen	MFC2C / Fed-B	<i>S. oneidensis</i>	Lactate 18 mM	9.6 x 10 ⁻⁶	5-10	(Zhao et al., 2015)
<i>Hybrid</i>						
PMBVF/PVA hydrogel	1C / Fed-batch	<i>S. oneidensis</i>	Lactate 18 mM	0.08	< 10	(Lin et al., 2012)

PMBVF/PVA: poly (2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine-co-n-butyl methacrylate)-co-p-vinylphenylboronic acid-co-vinylferrocene/Poly (vinyl alcohol).

3.1 Colonization of monolithic porous electrodes with pore size less than 10 μm

Most of the monolithic porous electrodes having pore sizes of a few micrometres were made of carbon, often prepared by carbonization of a template. For instance, Karthikeyan et al. manufactured porous monolithic electrodes by carbonizing corn stem (1000°C in N₂ atmosphere). This natural template possesses a structure with pores ranging from 2 to 7 μm in diameter, which was maintained after carbonization (Karthikeyan et al., 2015b). Bioanodes prepared under constant polarization with a mixed microbial consortium from a sewage station (inoculum) and acetate (substrate) showed bacterial communities present on both the external and internal surfaces. Biofilm thickness inside the pores was strongly dependent on the pore diameter whereas, on the external surface, a thicker biofilm of approximately 3-18 μm had formed after 18 days (Karthikeyan et al., 2015b).

Wang et al. carbonized microcellular polyacrylonitrile (PAN) using supercritical CO₂ as the foaming agent. This led to a non-uniform pore size distribution with a mean diameter of around 5 μm . Addition of graphite to obtain a PAN/graphite composite increased the surface area available for bacterial colonization and gave a more uniform pore size distribution with a mean diameter of 2.5 μm . Implemented in a single-chamber MFC inoculated with *Escherichia coli* and using glucose as the substrate, both electrode types showed internal colonization with a more intense biofilm on the PAN/graphite composite (Y.-Q. Wang et al., 2015).

Three-dimensional graphene aerogel (GA) has also been used to prepare porous bioelectrodes with a similar range of porosity. GA can be synthesized by hydrothermal treatment of graphene oxide sheets (Xu et al., 2010)(Yin et al., 2013). Zhao et al. used a simple 3D graphene aerogel (Zhao et al., 2015); Pt nanoparticles can also be scattered on the GA surface (GA/Pt) (Zhao et al., 2015) or the surface can be doped with nitrogen (GA/N) (Y. Yang et al., 2016) in order to reduce the charge transfer resistance and the internal resistance. All these GAs exhibited pore sizes ranging between 2 and 10 μm and were implemented in dual chamber MFCs inoculated with *Shewanella oneidensis* and fed with lactate. A well-developed biofilm was formed on the entire surfaces of GA, GA/Pt and GA/N, including inside pores.

The size of bacteria used as the inoculum ranged between 0.5 and 3 μm and was generally around 1 to 2 μm (X. Jiang et al., 2014). Internal colonization of porous monolithic electrodes has consequently never been reported with pore diameters smaller than 1 μm . It would be very difficult for microorganisms to penetrate into such pores, except under specific conditions, for instance, if pressure was imposed through the porous material (Gaveau et al., 2017). With pore sizes around 1

μm and less, the main advantage of the 3D porous electrodes would be lost because biofilm would grow only on the outer surface. Nevertheless, it cannot be ruled out that such small pore sizes may promote cell anchoring and biofilm development by creating surface roughness.

According to the studies commented above, a pore size of 2 μm has been shown to be large enough to allow the bacteria penetrate into the porous structure. It might be feared that such small pores may be subject to clogging with time. Nevertheless, Zhao et al. (Zhao et al., 2015) and Y. Yang et al. (Y. Yang et al., 2016) did not observe any clogging effect on the GA bioanodes, modified or not, which remained truly open after 3 and 5 days of operation using *Shewanella oneidensis*. After 25 days of experiment, pores of 2 to 10 μm diameter were still not clogged (Y. Yang et al., 2016; Zhao et al., 2015). Similarly, carbonized corn stem did not present any obstruction of pores after 18 days of operation using a mixed culture (Karthikeyan et al., 2015b). According to these studies, pore sizes from 2 to 10 μm seem to be sufficient to avoid clogging for time periods of the order of 20 days. Actually, the absence of pore clogging when the pore size of the electrode is so close to the microbial cell size is quite intriguing.

The viability of bacteria was checked by epifluorescence microscopy inside the structure of GA/Pt bioanodes after 25 days of operation (Zhao et al., 2015). Almost all bacteria cells had remained alive. Only a few bacteria were dead, due to normal cell apoptosis. Nevertheless, the epifluorescence pictures showed very poor bacterial colonization, with mainly single adhered cells or small microbial colonies of a few cells scattered on the electrode surface. Such low colonization, even after 25 days of operation, explains the absence of pore clogging. It can be suspected that no clogging was observed in these studies because the operating conditions did not allow a thick and uniform biofilm to develop. Most of these studies were performed with pure cultures (Table 1), which consequently avoided the anarchic development of thick, multispecies biofilms. The single study that implemented a multispecies inoculum (Karthikeyan et al., 2015b) was carried out in a solution that contained only phosphate, so the nutrients, micro-nutrients and mineral components required for microbial growth came only from the inoculum. It is likely that such a poor medium limited the development of the biofilm, which may have been the main cause of the absence of clogging in spite of the small pore size.

3.2 Colonization of fiber porous electrodes with pore sizes less than 10 μm

Carbon cloth is often used as the support for microbial bioanodes. Carbon cloth is made from fibres that are closely packed together (Figure 11.A) so that the space between them is less than 10 μm . Whether they were implemented with pure or mixed cultures, all reports claimed that carbon cloths led to the formation of biofilms, which mainly covered the external surface of the electrode. Colonization of the internal surface of the fibres was hardly observed (Blanchet et al., 2016; Manickam et al., 2013; Y. Yang et al., 2016; Zhao et al., 2015), although it is likely to be one of the reasons for the high performance often obtained. By working in close-to-industrial conditions, i.e. using activated sludge as the inoculum, wastewater as the medium and food waste as the substrate, Blanchet et al. observed an external biofilm with a thickness of 80-120 μm that uniformly covered the outer surface of a carbon cloth after 37 days of operation (Figure 11.B) and was claimed to produce current density equal to that in porous carbon felt implemented in identical conditions (Blanchet et al., 2016).

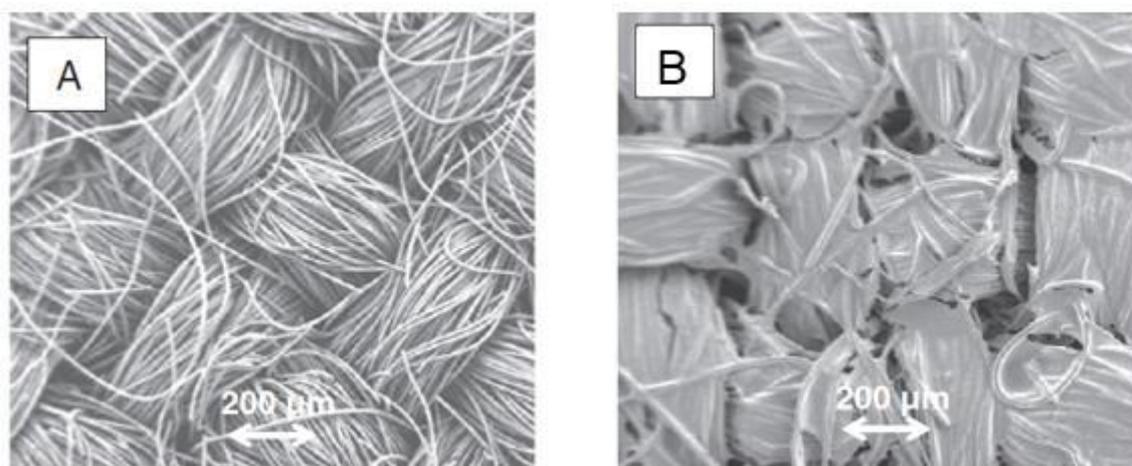


Figure 11: SEM images of A) a clean carbon cloth and B) carbon cloth covered by a multi-species biofilm after 37 days of polarization (from Blanchet et al., 2016).

Microbial adhesion can be improved by modifying the carbon cloth surface with additives, such as conductive polymers (polyaniline) (Hou et al., 2013; Lai et al., 2011) or nanomaterials (multi-walled carbon nanotubes) (Tsai et al., 2009), or by electrochemical treatment of the electrode surface in various solutions (Li et al., 2014; Liu et al., 2014; Zhang et al., 2014). Nevertheless, it turned out that some of these surface modifications reduced the spacing between fibres or even totally filled the gap, so colonization of inner fibres did not occur (Hou et al., 2013; Lai et al., 2011; Tsai et al., 2009; Liu et al., 2014; Li et al., 2014; Zhang et al., 2014).

Another way to manufacture porous electrodes from fibres is to pack the fibres in no particular order so as to form felts. Nanofibres have often been used in this manner in order to increase the surface area available for cell adhesion while achieving high porosity (Figure 12.B) (Pham et al., 2006; Smith and Ma, 2004). Manickam et al. thus elaborated a nano-fibrous anode and compared this electrode with carbon cloth having a similar inter-fibre distance of less than 10 μm . Both electrodes were checked in a single chamber MFC inoculated with wastewater and fed with acetate (Manickam et al., 2013). Internal biofilm colonization was observed only in the felt nanofibre anode. It was claimed that the porosity of the felt nanofibre anode enabled easy access of the nutrient through the whole fibrous structure, thus allowing bacterial growth inside the electrode structure. Similarly, an anode made with conductive poly(3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT) nanofibres, with a mean pore size of several micrometres, inoculated with *Shewanella oneidensis* MR-1 and fed with lactate in a dual chamber miniature MFC, showed full bacterial colonization of the internal nanofibre structure (Jiang et al., 2015b).

Apparently, nonwoven nanofibre-based anodes with inter-fibre spacing of less than 10 μm offer a suitable structure for bacterial penetration, internal colonization and appropriate nutrient transport. In contrast, carbon cloth electrodes with similar inter-fibre spacing generally did not lead to the presence of bacteria in between the fibres. Actually, we think that the difference is not related to the type of structure, nonwoven felt vs. woven cloth, but to the difference in the geometric pattern of the felts and cloths that have been commonly used for these studies. The fibres used to weave carbon cloths typically have diameters around 10 μm (Figure 12.A), while felt structures are most often manufactured with much thinner fibres, including nanofibres. The patterns offered to microbial colonization by these cloths and felts are consequently very different because of the difference in the fibre diameters.

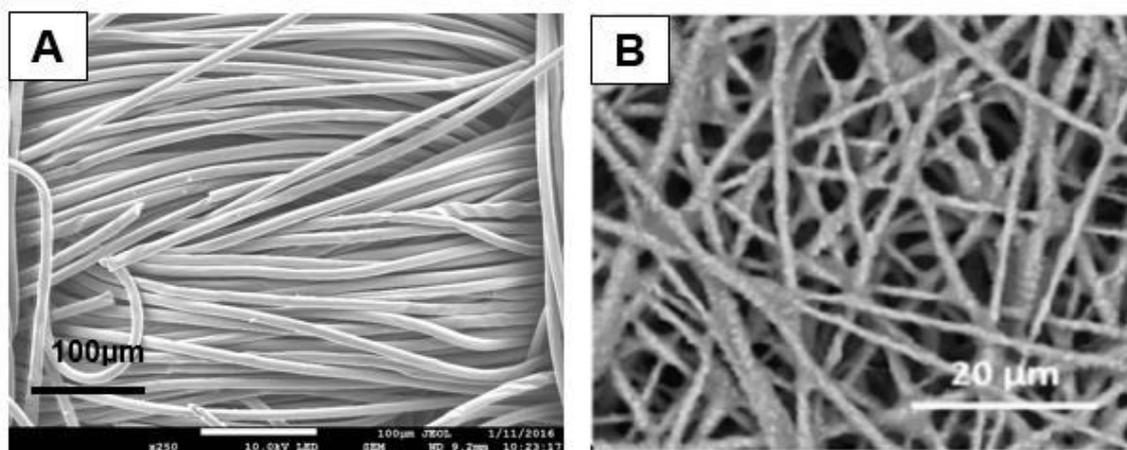


Figure 12 : SEM images of fibre based bioanodes before colonization. (A) Carbon cloth (B) felt made of PEDOT nanofibre (from Jiang et al., 2015b).

A simple model can make this difference easier to grasp. For the sake of simplicity, let us consider layers of parallel fibres disposed as schematized in Figure 13.

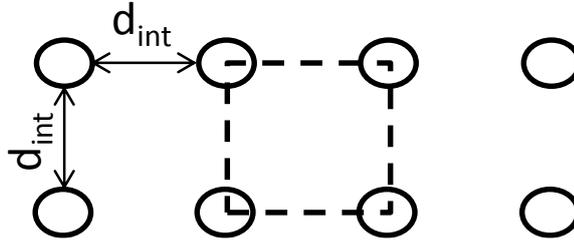


Figure 13 : Scheme of the simplified arrangement of fibres used to establish the model; dotted square represents an elementary area used for calculation.

This representation allows the electrode porosity, also called void fraction (χ), to be calculated easily as:

$$\chi = 1 - \frac{\pi d_f^2}{4} \frac{1}{(d_f + d_{int})^2} \quad (1)$$

where d_f (m) is the fibre diameter, and d_{int} (m) is the inter-fibre distance, and the ratio $\frac{1}{(d_f + d_{int})^2}$ gives the number of fibres that are ordered perpendicularly to a surface area of 1 m²; this ratio is also equal to the total length of the fibres contained in a volume of 1 m³. According to this model, a carbon cloth made with fibres of 10 µm diameter 3 µm apart leads to a porosity of 54%, while a felt made of fibres of 1 µm diameter with the same inter-fibre spacing offers a porosity of 95%. This calculation clearly illustrates that, at identical inter-fibre distance, the electrodes manufactured with thinner fibres display a considerably larger porosity for letting microbial cells penetrate into the structure. Here, the inter-fibre distance (assimilated to an equivalent pore size), is no longer the only relevant parameter because, with similar inter-fibre distance, the space offered to the cells depends on the fibre diameter. If the purpose is to enhance the internal colonization of the electrode, the inter-fibre distance must be large enough and, in addition, the electrode porosity must also be increased as much as possible.

The utility of such a simple model has been confirmed experimentally by He et al., who compared the impact of different fibre diameters from 0.16 to 9.94 µm on the behaviour of biofilm formation in carbon fibre anodes (He et al., 2011). The fibre diameter (d_f), the porosity (χ), and the penetration depth of the biofilm inside the structure were measured experimentally (Table 2). No obvious relationship could be established between the biofilm penetration depth and the porosity. For

instance, the two lowest porosity values (93.5 and 95.2%) led to the smallest and the largest biofilm penetration depths (16.7 and 600 μm), respectively. Actually, the range of porosity values was too limited to be impacting in this case. The inter-fibre distance (d_{int}) was assessed theoretically by using Equation (1). This calculation showed that the inter-fibre distance increased with the fibre diameter (Table 2). This gave an obvious explanation to the evolution of the biofilm penetration depth: the biofilm penetration depth increased with the inter-fibre distance. Moreover, the biofilm morphology changed, from continuous biofilms at small d_{int} to porous biofilms at large d_{int} , the toggle value being between 6.8 and 12.6 μm . This example confirmed the essential importance of the porosity and inter-fibre distance parameters when the objective is to understand the colonization of a fibre-based electrode.

Fibre diameter d_f (μm)	Porosity χ (%)	Current density ($\text{mA}\cdot\text{cm}^{-2}$)	Biofilm penetration length (μm) and morphology	Theoretical inter-fibre distance d_{int} (μm)	Surface area to volume ratio (cm^2/cm^3)
9.94	95.3	1.46	600 - porous	31.7	584
6.98	97.2	1.65	385 - porous	31.0	689
1.42	99.2	2.19	234 - porous	12.6	2007
0.87	99.0	3.08	226 - continuous	6.8	3614
0.64	99.1	2.99	28.9 - continuous	5.3	4691
0.31	97.9	2.52	24.2 - continuous	1.6	13857
0.16	93.5	1.74	16.7 - continuous	0.4	40222

Table 2 :Fibre diameters, porosity and current density are experimental data extracted from (He *et al.*, 2011). The inter-fibre distances and the surface area to volume ratios were assessed theoretically according to Equations (1) and (2), respectively.

The study by He *et al.* also showed that the biofilm penetration remained weak for inter-fibre distances less than 10 μm . Penetration depths did not exceed 226 μm , which remains drastically limited if the objective is to design 3D porous bioanodes. Only a very thin layer of the porous structure would be exploited by the biofilm. Actually, a uniform biofilm of around 200- μm thickness filling the upper layer of a porous electrode may be considered as clogging that prevents the porous structure from being fully exploited. It was necessary to increase the inter-fibre spacing above 10 μm to obtain a porous biofilm that did not clog the open structure of the electrodes (Table 2). To conclude on the colonization of pores with sizes below 10 μm , it can be noted that internal colonization is often due to specific operating conditions that limit biofilm growth. In studies where

the internal colonization was accurately characterized, generally only scattered colonies were observed. Often, a uniform biofilm formed on the upper surface, clogging the porosity.

3.3 Electrochemical performance of monolithic and fibrous bioanodes with pore sizes smaller than 10 μm

A large majority of the bioanodes with pore sizes less than 10 μm delivered weak maximum current densities (Group 1, $J_{max} \leq 5 \text{ A.m}^{-2}$) (Figure 14). As remarked above, many studies were performed with pure cultures (Table 1) and in conditions that would favour the penetration of single cells into the structure rather than the formation of thick biofilms. Conditions optimized to favour internal colonization of narrow pores may consequently be detrimental to the development of efficient electroactive biofilms.

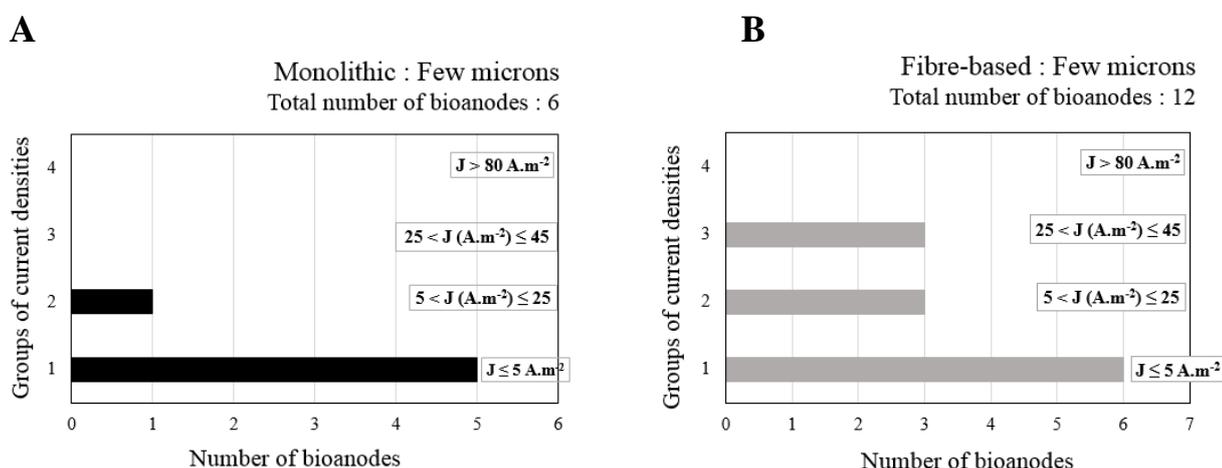


Figure 14: A) Number of monolithic and B) fibre-based porous microbial anodes with pore size of less than 10 μm classified according to the maximum current density produced.

Two exceptions have been reported, which deserve deeper analysis. A monolithic porous anode developed by Karthikeyan et al., with pores of 2-7 μm , delivered current density of 31.2 A.m^{-2} (Karthikeyan et al., 2015b). The nanofibre anodes designed by He et al. produced up to 30.8 A.m^{-2} with pore size assessed as 6.8 μm (Table 2). It should be noted that both studies were carried out under controlled polarization, by using 3-electrode electroanalytical set-ups instead of MFCs. As already suggested, 3-electrode set-ups should be used to characterize electrodes - rather than MFCs, which are not appropriate tools for electroanalysis (Rimboud et al., 2014). The use of MFCs may have led to the performance of some bioanodes being underestimated.

The nature of the inoculum and the composition of the associated medium may also be important. Both of the above studies used a microbial consortium coming from a sewage station (Karthikeyan

et al., 2015b) or wastewater treatment plant (He et al., 2011), instead of pure cultures as in most other reports. Furthermore, the inoculum was implemented in a synthetic medium. In one case, the solution was only phosphate buffer, so the components required for microbial growth were only provided by the inoculum (Karthikeyan et al., 2015b). In the other case, a synthetic medium was used and regularly refreshed. In addition, a prior selection of electroactive microorganisms was performed by forming a primary bioanode that was then used as the inoculum to prepare the porous fibre-based bioanodes (He et al., 2011). In both cases, well-chosen operating conditions probably prevented the development of non-electroactive bacteria. These conditions may well have mitigated clogging of the porous structure by avoiding the development of non-electroactive species. Furthermore, Karthikeyan et al. (2015) used an unusually high substrate (acetate) concentration, of 100 mM, which probably mitigated transport limitation inside the porous structure.

The fibre bioanodes designed by He et al. also pointed out the importance of a third parameter if the objective is to increase the current density. With similar porosities of 97.2 and 97.9 % (Table 2) the bioanodes with the higher inter-fibre distance (31.0 vs 1.6 μm) logically displayed considerably higher biofilm penetration depth (385 vs 24 μm) but they produced lower current density (1.65 vs 2.52 $\text{mA}\cdot\text{cm}^2$). These results illustrate the major importance of the volume of the electroactive biofilm. In this case, it was not measured but the surface area that was available to microbial colonization can be assessed theoretically. Based on the simple representation evoked above, the fibre surface area available per volume unit ($A_s, \text{m}^2\cdot\text{m}^{-3}$) is:

$$A_s = \pi d_f \frac{1}{(d_f + d_{int})^2} \quad (2)$$

This calculation (Table 2) shows that the 20 times smaller surface area (689 vs 13857 cm^2/cm^3) provided by the bioanodes with the higher inter-fibre distance was probably responsible for a smaller amount of biofilm and consequently a lower current density.

To conclude, when the objective is to design efficient porous microbial electrodes, three main parameters must be considered. Porosity and pore size, which can be the inter-fibre distance for fibre electrodes, must be increased to promote the biofilm penetration inside the structure. In contrast, the specific surface area must also be increased to increase the surface area for biofilm development. Increasing these three parameters concomitantly is not possible, so an optimum must be sought. These three parameters provide simple tools to advance towards the optimization of microbial 3D porous electrodes.

4. PORE SIZE FROM 10 TO 100 μM (TABLE 3)

Table 3 : Examples of three-dimensional porous bioanodes with a pore size ranging from 10 to 100 μm used in bioelectrochemical systems.

Bioanodes	Reactor type	Inoculum	Substrate	J_{max} ($\text{A}\cdot\text{m}^{-2}$)	Pore size (μm)	Reference
<u>FIBRE BASED</u>						
<i>Carbon</i>						
Carbon felt	MFC 1C /NA	<i>E.coli</i>	Glucose 2 g/L	1.01	≈ 10	(Wang et al., 2015)
Carbon felt 1	1C / Fed-B <i>Polarization</i> <i>0.2V vs Ag/AgCl</i>	Wastewater	Acetate 10 mM	14.6	≈ 10	(He et al., 2011)
Carbon felt 2	1C / Fed-B <i>Polarization</i> <i>0.2V vs Ag/AgCl</i>	Wastewater	Acetate 10 mM	16.1	≈ 10	(He et al., 2011)
Carbon felt 3	1C / Batch <i>Polarization</i> <i>0.2V vs Ag/AgCl</i>	Secondary biofilm from wastewater	Acetate 10 mM	12.1	47	(Chen et al., 2011a)
Carbon felt 4	1C / Fed-B <i>Polarization</i> <i>0.2V vs Ag/AgCl</i>	Secondary biofilm from wastewater	Acetate NA	16	≈ 10	(Chen et al., 2011b)
Carbon felt + PANI	MFC 2C/ Fed-B	Anaerobic sludge	Acetate 10 mM	0.0986	≈ 10	(Li et al., 2011)
Graphite felt	MFC 1C / Batch	Taihu lake sediment	Acetate 1 g/L	1.5	50	(Huang et al., 2016)
Carbon fibre mat	1C / Batch <i>Polarization</i> <i>0.2V vs Ag/AgCl</i>	Wastewater	Acetate 10 mM	20	50	(Chen et al., 2011a)
Carbon fibre nonwoven	1C / Fed-batch <i>Polarization</i> <i>0.2V vs Ag/AgCl</i>	Wastewater	Acetate NA	30	≈ 10	(Chen et al., 2011b)

Metal						
Stainless steel fibre felt (SSFF)	MFC 2C / Fed-B	Wastewater	Acetate NA	0.035	15.7	(Hou et al., 2014)
SSFF + Graphene	MFC 2C / Fed-B	Wastewater	Acetate NA	6.1	15.7	(Hou et al., 2014)
SSFF + CNT	MFC 2C / Fed-B	Wastewater	Acetate NA	3.76	15.7	(Hou et al., 2014)
SSFF + activated carbon	MFC 2C / Fed-B	Wastewater	Acetate NA	1.47	15.7	(Hou et al., 2014)
MONOLITHIC						
Carbon						
Carbonized King mushrooms	1C / Fed-B <i>Polarization</i> 0.2V vs Ag/AgCl	Sewage station	Acetate 100 mM	10-120	20.9	(Karthikeyan et al., 2015b)
Carbonized kenaf	1C / Batch <i>Polarization</i> 0.2V vs Ag/AgCl	Wastewater	Acetate 10 mM	25-60	32.5	(Chen et al., 2012a)
Carbon foam	MFC 2C/ Batch	<i>S. oneidensis</i>	Lactate 18 mM	16	1.5	(Han et al., 2016)
3D Graphene	MFC 1C/ Batch	Taihu lake sediment	Acetate 1 g/L	12	2	(Huang et al., 2016)
Reduced-graphene-oxide hybridized Graphene foam/MWCN T/FFe ₃ O ₄	MFC 2C/ Fed-B	<i>S. oneidensis</i>	Lactate NA	10-200	5.2	(Yong et al., 2014)
	MFC 2C /	<i>S. oneidensis</i>	Lactate NA	10	782 A.m ⁻³ (1.3 cm ³)	(Song et al., 2016)

Hybrid						
Polymer copper hybrid foams	1C / Batch <i>Polarization</i> <i>-0.2V vs Ag/AgCl</i>	Wastewater	Acetate 10 mM	75	23	(Baudler, 2016)
MWCNT/ chitosan	MFC 2C/ Batch	<i>Geobacter</i>	Acetate 10 mM	16	10.8	(Katuri et al., 2011)
VSG/chitosan	MFC 2C/ Batch	<i>P.aeruginosa</i>	Glucose NA	30-50	2.55	(He et al., 2012)
Metal						
Titanium based ceramic	1C / Fed-batch <i>Polarization</i> <i>0.2V vs Ag/AgCl</i>	<i>Geobacter</i>	Acetate 20 mM	10-15	128	(Massazza et al., 2015)

CNT: Carbon nanotubes, MWCNT: Multi-walled carbon nanotubes, VSG: vacuum stripped graphene.

4.1 Monolithic porous electrodes with pore sizes ranging from 10 to 100 μm

4.1.1 Impact of the pore size on microbial colonization

Pore sizes of a few tens of micrometres are, a priori, large enough to allow microorganisms to penetrate inside the pores easily and to ensure significant mass transport inside the internal structure (Huang et al., 2016) (Yong et al., 2014). All the studies that have examined the internal colonization of such porous electrodes state that microbial biofilm formed on both the external and internal surfaces (Baudler, 2016; Chen et al., 2012a; Han et al., 2016; He et al., 2012; Karthikeyan et al., 2015b; Katuri et al., 2011; Massazza et al., 2015; Yong et al., 2014).

However, as the biofilm continues to grow, pore clogging has often been observed with time since mature biofilm can achieve a thickness of tens or hundreds of micrometres (Baudler et al., 2015b; Chen et al., 2012a). Karthikeyan et al. obtained a porous structure with pore sizes ranging from 10 to 120 μm by carbonizing king mushrooms. They noted that the smallest pores were totally filled after 18 days when sewage was used as the inoculum and acetate as the substrate (Karthikeyan et al., 2015b). Similarly, Baudler et al. confirmed that, after around 10 days, a dense biofilm covered the whole surface of polymer copper hybrid foams with average pore size of 75 μm . After around 15 days, the biofilm limited the substrate supply inside the pores and, after around 40 days, caused complete blocking of pores (Baudler, 2016). Using a 3-dimensional composite electrode made of multiwall carbon nanotubes (MWCNT) and chitosan (average pore size 16 μm) inoculated with *Geobacter sulfurreducens* and fed with acetate, Katuri et al. noted that living cells were only present on the external surfaces after 21 days. In contrast, the internal surfaces were coated by dead or damaged cells (Katuri et al., 2011). Once the biofilm clogged the pores, substrate provision to and metabolite release from the internal structure was no longer ensured, causing the death or damage of the bacteria located inside the pores.

4.1.2 Impact of the pore size on electrochemical performance

Almost half of the porous anodes with pore diameters of a few tens of micrometres produced maximum current density between 5 and 25 $\text{A}\cdot\text{m}^{-2}$ (Group 2, Figure 15.A). This ratio shows better general performance than the anodes with pores only a few micrometres in diameter. Nevertheless, a significant percentage of such anodes produced less than 5 $\text{A}\cdot\text{m}^{-2}$ (Group 1), which can be explained by the same reasons as in the previous section: the use of two-compartment MFCs instead of 3-

electrode electroanalysis set-ups, associated with pure cultures of *Shewanella oneidensis* and *P. aeruginosa*, which are not known to produce the highest possible currents.

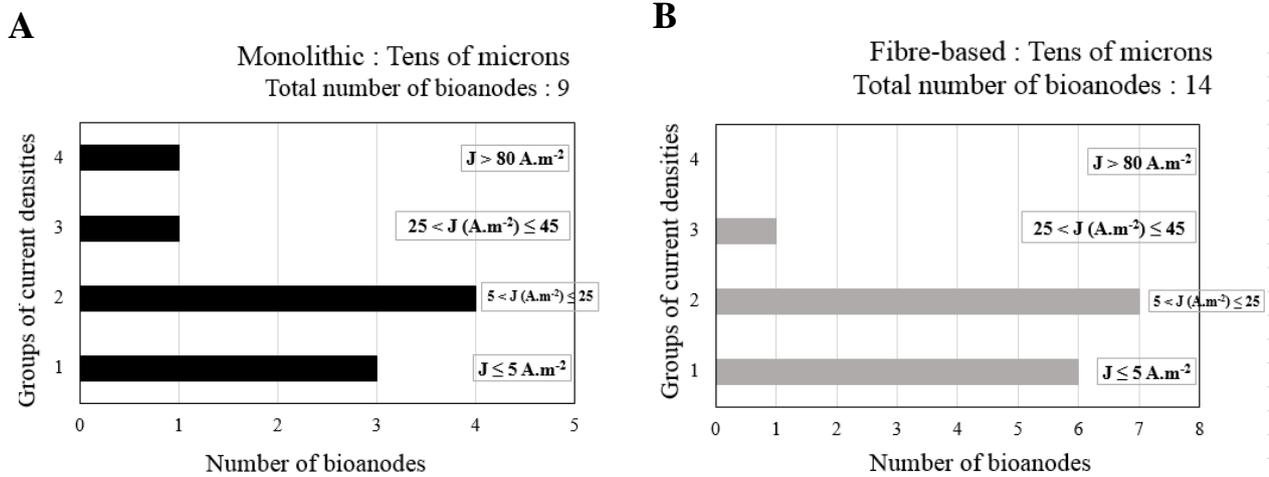


Figure 15: A) Number of monolithic and B) fibre-based porous microbial anodes with a pore size in the order of magnitude of 10-100 μ m classified according to the maximum current density produced.

A few anodes of this range of pore sizes succeeded in producing current density higher than 25 $A.m^{-2}$ (Group 3). Chen et al. manufactured carbonaceous anodes with pore sizes ranging from 25 to 60 μ m by carbonizing a piece of kenaf (hibiscus). These electrodes produced a maximum current density of 32.5 $A.m^{-2}$ when implemented with wastewater (inoculum) and acetate (substrate) (Chen et al., 2012a). Up to 128 $A.m^{-2}$ was reached by Massazza et al. with an innovative titanium-based ceramic anode with pore size of 10 - 15 μ m (Massazza et al., 2015). These two high performances can be related to appropriate experimental conditions. Both studies employed a 3-electrode set-up with polarization at 0.20 vs. Ag/AgCl and acetate as the substrate. Moreover, Massazza et al. worked with *Geobacter sulfurreducens*, which is probably the species that produces the highest current densities among pure cultures, notably on various metallic electrodes (Baudler et al., 2015b; Dumas et al., 2008, 2007; Liu et al., 2010). Furthermore, the bulk solution was continuously stirred, which improved mass transport. Finally, the innovative experimental set-up that allowed acetate and fresh culture medium to be supplied directly through the porous electrode was certainly another major factor in the success (Massazza et al., 2015).

4.2 Fibrous porous electrodes with pore sizes ranging from 10 to 100 μm

The articles dealing with fibre electrodes or porous electrodes made of superimposed sheets did not always give an average value of the inter-fibre or inter-sheet space. Sometimes an equivalent pore size formed by the fibre/sheet array was indicated but, in most cases, the value was assessed in the present review from SEM images available in the papers.

4.2.1 Impact of the pore size on microbial colonization

Most of these porous structures showed microbial development around the fibres and on the surface of sheets as illustrated in Figure 16 (Chen et al., 2011b, 2011a). The possible problem of pore clogging was not evoked in these studies. On the basis of the poor information available in the literature about this topic, it remains difficult to conclude on the development of the internal colonization of such porous structures.

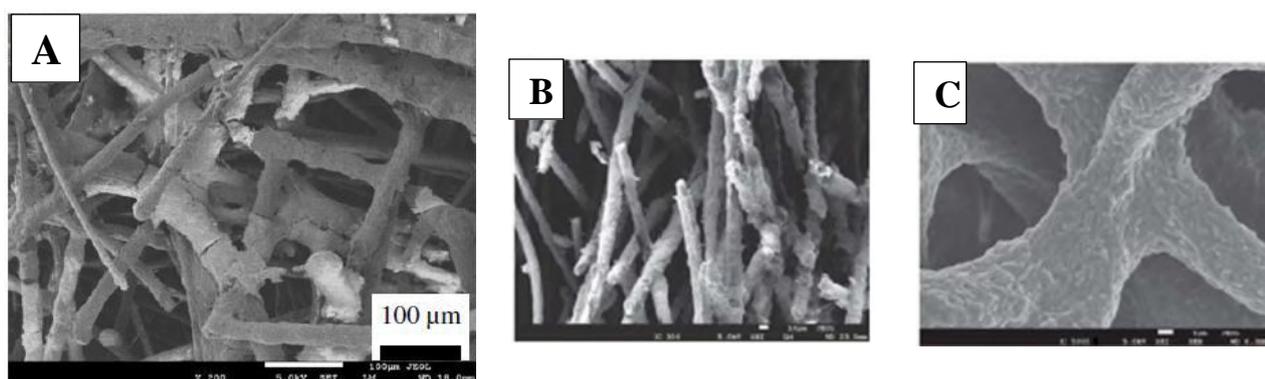


Figure 16: SEM images of multi-species biofilms from wastewater with various ages on fibre-based electrodes polarized at 0.2V vs Ag/AgCl (the biofilm ages were assessed from the polarization times indicated in the article). (A) (Chen et al., 2011a), 11 days on a commercial carbon felt, (B) (Chen et al., 2011b), 8 days on a commercial carbon felt and (C) (Chen et al., 2011b), 8 days on a carbon fibre electrode produced by gas-assisted electrospinning.

4.2.2 Impact of the pore size on electrochemical performance

The majority of fibrous bioanodes with pore sizes assessed as a few tens of micrometres produced maximum current densities of less than 25 $\text{A}\cdot\text{m}^{-2}$ (Groups 1 and 2, Figure 15.B). Most of the anodes related to group 1 were implemented under detrimental conditions: pure culture of poorly efficient species (*E. coli*, Wang et al., 2016), and two-compartment (Li et al., 2011; Hou et al., 2014) or single-compartment MFCs (Huang et al., 2016) instead of a 3-electrode electroanalytical set-up. In this last study, the specific inoculum coming from lake sediment might be another cause of the very

low maximum current density (1.5 A.m^{-2}). The nature of the anode material, made of stainless steel, might also have had a detrimental impact, in spite of various surface modifications (Hou et al., 2014).

The anodes related to group 2 were implemented in more favourable operating conditions, i.e. 3-electrode set-up, polarization at 0.20 V vs. Ag/AgCl, multi-species inoculum (Chen et al., 2011b, 2011a; He et al., 2011). To underline the considerable impact of the operating conditions on the electrochemical performance once again, we note that the system that gave the lowest current densities within this group (5.6 A.m^{-2}) was implemented with a pure culture of *Shewanella oneidensis* in a double-compartment MFC (X. Yang et al., 2016).

Only one anode reached group 3 (Chen et al., 2011a). Obviously, it was implemented in appropriate conditions (polarization with a 3-electrode set-up, multispecies inoculum, acetate as the substrate) and, in addition, the anode structure was particularly optimized. It was composed of successive layers of fibres $50 \mu\text{m}$ apart (Figure 17). The concept of 3D layered carbon nanofiber mats and the careful micro-design of the electrode structure was certainly a key to success here, and is a path to be kept in mind in order to progress towards the optimization of microbial anodes.

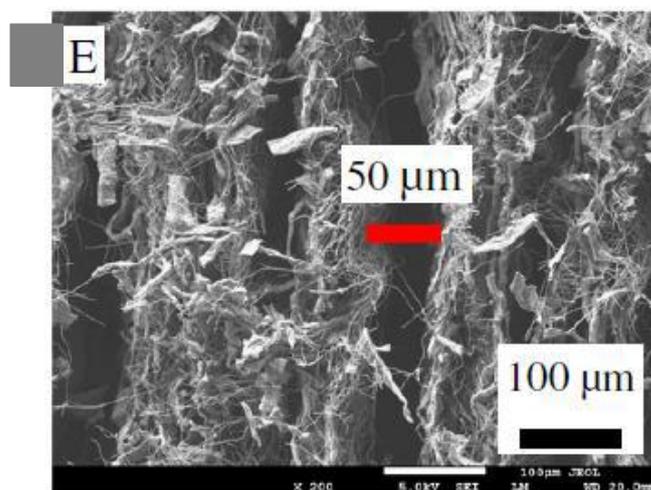


Figure 17: SEM image from (Chen et al., 2011a) of the cross-sectional view of the 3D layered carbon nanofibre mat anodes developed by (Chen et al., 2011a) without biofilm.

5. PORE SIZE FROM 100 TO 500 μM (TABLE 4)

Table 4 : Examples of three-dimensional porous bioanodes with a pore size ranging from 100 to 500 μm used in bioelectrochemical systems.

Bioanodes	Reactor type	Inoculum	Substrate	J_{max} ($\text{A}\cdot\text{m}^{-2}$)	Pore size (μm)	Reference
<u>FIBRE BASED</u>						
<i>Carbon</i>						
Carbon felt 1	1C/Fed-B <i>Polarization</i> 0.2V vs Ag/AgCl	Activated sludge	Food waste	3.5	20-200	(Blanchet et al., 2016)
Carbon felt 2	1C/Fed-B <i>Polarization</i> 0.1V vs ECS	Salt marsh sediments	Acetate 40 mM	85	20-200	(Rousseau et al., 2013)
Graphite felt 1	1C/Fed-B <i>Polarization</i> -0.2V vs ECS	Salt marsh sediments	Acetate 40 mM	37.6	100-500	(Rousseau et al., 2016)
Graphite felt 2	MFC 2C / Batch	<i>S. oneidensis</i>	Lactate 18 mM	0.75	159	(Han et al., 2016)
Graphite felt 3	1C / Batch <i>Polarization</i> 0.3V vs Ag/AgCl	Anaerobic sludge	Acetate 20 mM	5.5	200	(Z. Wang et al., 2015)
Carbonized textile	1C / Batch <i>Polarization</i> 0.3V vs Ag/AgCl	Anaerobic sludge	Acetate 20 mM	8	100	(Z. Wang et al., 2015)
CNT textile	MFC 2C / Fed-B	Domestic wastewater	Glucose 1 g/L	7.2	100	(Xie et al., 2011)

<u>MONOLITHIC</u>						
<i>Carbon</i>						
Graphene	MFC 2C / NA	Anaerobic sludge	Acetate 25 mM	15	100-200	(Ren et al., 2016)
Graphene sponge	MFC 2C / Fed-B	Anaerobic sludge	Acetate 0.8 g/L	2.9	100-500	(Chen et al., 2014)
Graphene + PANI	MFC 2C / NA	<i>S. oneidensis</i>	Lactate NA	4.5	100-300	(Yong et al., 2012)
Carbonized wild mushroom	1C / Fed-B <i>Polarization</i> <i>0.2V vs Ag/AgCl</i>	Sewage station	Acetate 100 mM	30.2	75 - 200	(Karthikeyan et al., 2015b)
Carbonized pomelo peel	1C / Fed-B <i>Polarization</i> <i>0.2V vs Ag/AgCl</i>	Wastewater	Acetate 20 mM	40.2	100-300	(Yuan et al., 2013)
Carbonized Loofah sponge (LSC)	MFC 1C / Batch	Activated anaerobic sludge	Acetate 1 g/L	9.3	≈ 100	(Yuan et al., 2013)
Nitrogen-enriched carbon nanoparticle-modified LSC	MFC 1C / Batch	Activated anaerobic sludge	Acetate 1 g/L	12.4	≈ 100	(Yuan et al., 2013)
RVC	MFC 1C / Batch	Activated anaerobic sludge	Acetate 1 g/L	8.2	≈ 300	(Yuan et al., 2013)
Graphene sponge	MFC 1C / Batch	Activated anaerobic sludge	Acetate 1 g/L	7.5	300-500	(Yuan et al., 2013)
Carbon nanotube sponge	MFC 2C / Fed-B	Domestic wastewater	Glucose 1g/L	21.3	300-500	(Xie et al., 2012)
Reticulated vitreous carbon foam	MFC 2C / Batch	Activated sludge	Acetate NA	0.65	320	(Lepage et al., 2012)

Printed carbon 1	MFC 1C/Batch	<i>S. oneidensis</i>	Lactate 18 mM	0.51	100	(Bian et al., 2018)
Printed carbon 2	MFC 1C/Batch	<i>S. oneidensis</i>	Lactate 18 mM	1.01	200	(Bian et al., 2018)
Printed carbon 3	MFC 1C/Batch	<i>S. oneidensis</i>	Lactate 18 mM	1.72	300	(Bian et al., 2018)
Printed carbon 4	MFC 1C/Batch	<i>S. oneidensis</i>	Lactate 18 mM	0.57	400	(Bian et al., 2018)
Printed carbon 5	MFC 1C/Batch	<i>S. oneidensis</i>	Lactate 18 mM	0.54	500	(Bian et al., 2018)
Metal						
Nickel coated sponge	MFC 2C / Batch	Wastewater	Glucose NA	4.4	230	(Liu et al., 2013)
Nickel foam + graphene oxide	MFC 2C / Batch	<i>S. oneidensis</i>	Lactate 18 Mm	4.3	100-500	(Wang et al., 2013)

RVC: Reticulated vitreous carbon.

5.1 Monolithic porous electrodes with pore sizes ranging from 100 to 500 μm

5.1.1 Impact of the pore size on microbial colonization

In this range of pore sizes, all the studies that examined microbial colonization report an obvious internal colonization of the structures. The question that comes to mind here concerns the behaviour related to clogging over time that can occur because of the biofilm growth. Several studies carried out with various multispecies inocula (anaerobic sludge, activated sludge, wastewater) have described such structures operating for 1 to 2 months without pore clogging (Ren et al., 2016), (Chen et al., 2012c), (Yuan et al., 2013), (Chen et al., 2014).

Lepage et al. formed bioanodes with reticulated carbon foam electrodes, which displayed an average pore size of 320 μm , inoculated with activated sludge (Lepage et al., 2012). Only the pores with diameters smaller than 180 μm were clogged after 6 months of operation. Similarly, an anode composed of a sponge coated by carbon nanotube, with pore size ranging from 300 to 500 μm inoculated with domestic wastewater showed no pore clogging after more than 1 year of operation (Xie et al., 2012).

Pore clogging seems to be avoided at this pore size level but mass transport limitation inside the porous structure may occur. Chen et al., using anodes made of carbonized pomelo peel with pores close to 100 μm , observed that the biofilm penetrated to a maximum depth of 600 μm (Chen et al., 2012c). The biofilm thickness decreased with the penetration depth, from around 15 μm close to the surface to 1.8 μm at 600 μm depth (Figure 18). This thickness decrease was attributed to a mass transport limitation that hindered the biofilm growth as the depth increased. This observation is consistent with a recent study that used gold surfaces with micro-pillar arrays (Champigneux et al., 2018b). The micro-pillars were 500 μm high, 100 μm wide and spaced from 100 to 200 μm apart. This surface topography can be assimilated to pores of 500 μm depth, with pore size of the order of magnitude of the pillar spacing. A theoretical approach indicated that mass transfer was a considerable rate-limiting step. Actually, the limited diffusion of the buffering species was shown to be more detrimental than that of the substrate. It is known that the local acidification of microbial anodes severely limits the efficiency of electroactive biofilm (Harnisch and Schröder, 2009; Popat and Torres, 2016; Torres et al., 2008b). The local acidification of the internal structure may consequently be a major cause of the more difficult biofilm growth in the deepest layers of the structure observed by Chen et al.

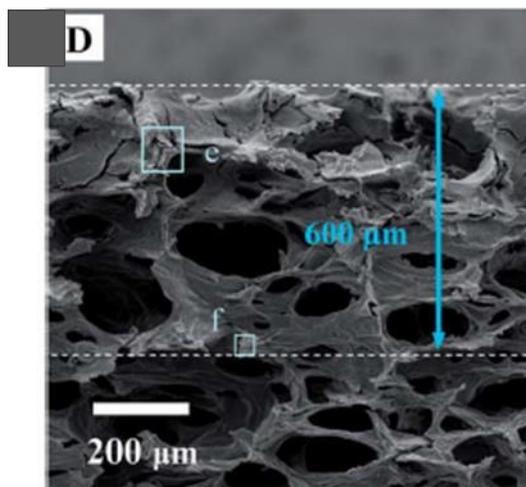


Figure 18: SEM image of biofilm (from wastewater) penetration inside a carbonized pomelo peel polarized at 0.2V vs Ag/AgCl. The biofilm thickness was assessed as 15 μm at the position noted “e” on the picture and 1.8 μm at “f” (from (Chen et al., 2012c).

5.1.2 Impact of the pore size on electrochemical performance

As already commented above, the bioanodes that produced the lowest maximum current density (Group 1) were all implemented in detrimental conditions, notably with an MFC instead of a 3-electrode set-up (Figure 19.A).

The bioanodes related to Group 2 were also all implemented in MFC devices. Within this group, four bioanodes gave modest current densities of 7.5, 8.2, 9.3 and 12.4 (Yuan et al., 2013) $\text{A}\cdot\text{m}^{-2}$, but the two others reached 15 $\text{A}\cdot\text{m}^{-2}$ (Ren et al., 2016) and 21.3 $\text{A}\cdot\text{m}^{-2}$ (Xie et al., 2012). These two values deserve some additional comments because they appear to be high for values recorded in MFCs. The first one, related to a 3D graphene anode elaborated by Ren et al. was obtained by using an inoculum collected from a previous MFC that had run for more than 6 months. This protocol may have had a favourable effect. For the second value, related to a 3D sponge coated with carbon nanotubes elaborated by Xie et al., the anodic compartment of the MFC was continuously stirred and the solution was replaced when the current began to fall. Moreover, coating the sponge-like electrode surface with carbon nanotubes may also have had a positive effect. Here again, this illustrates that the number of operating parameters, which can vary from one study to another, is so high that it is very difficult to extract sound conclusions by comparing results from different sources.

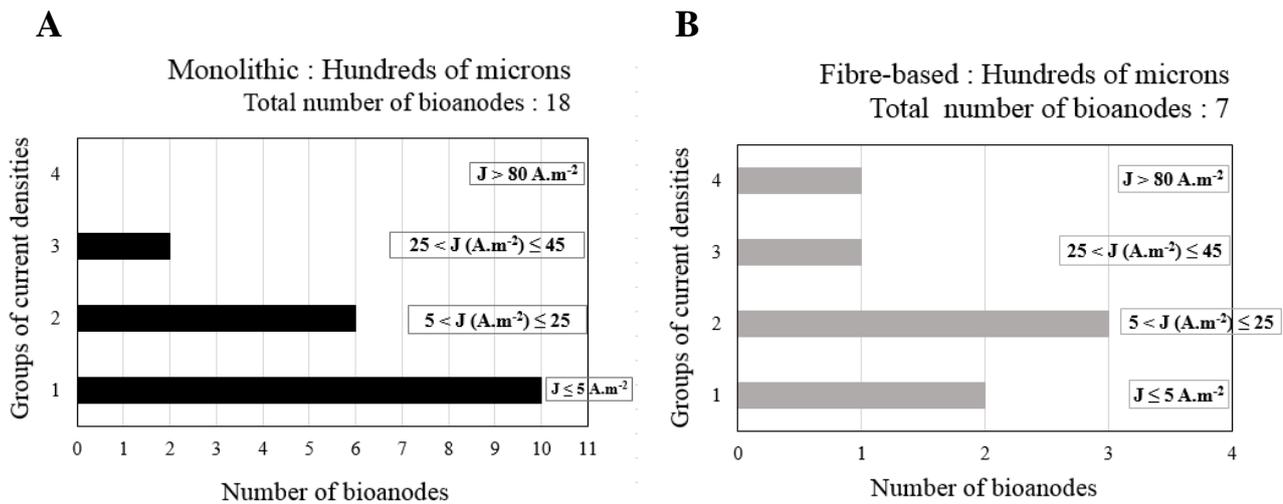


Figure 19: A) Number of monolithic and B) fibre-based porous microbial anodes with a pore size of the order of 100-500 μm classified according to the maximum current density produced.

Logically, the anodes related to Group 3 were all implemented in suitable conditions (polarization at 0.20 V/SCE, multispecies inoculum, acetate as the substrate). This group suggests that the nature of the electrode material may also play an important role. These electrodes were prepared by carbonizing natural templates. Carbonized wild mushroom with pore sizes of 75 – 200 μm produced 30.2 $A.m^{-2}$ (Karthikeyan et al., 2015b) and carbonized pomelo peel with pore sizes of 100 – 300 μm produced 40.2 $A.m^{-2}$ (Chen et al., 2012c). Preparing monolithic porous electrodes from natural templates may consequently be a path worth exploring further. Using loofah led to modified or lower performance (Yuan et al., 2013) but it was implemented in different experimental conditions, for instance in batch mode, while the previous two were implemented in fed-batch.

5.2 Fibrous porous electrodes with pore size ranging from 100 to 500 μm

5.2.1 Impact of the pore size on microbial colonization

When this pore size range was examined, internal microbial colonization was observed in fibrous porous electrodes. Nevertheless, as discussed above for monolithic porous electrodes, the penetration depth could be restricted. For instance, after 37 days of polarization, Blanchet et al. observed a penetration depth of only 200 to 800 μm into 5-mm thick carbon felts (Blanchet et al., 2016). Rousseau et al. reported the formation of a continuous, thin biofilm on the fibres of graphite felt with a thickness approaching 10 μm after 12 days of polarization.

5.2.2 Impact of the pore size on electrochemical performance

From Figure 19.B, it appears that fibrous porous electrodes with this range of pore size led mostly to modest performance from Groups 1 and 2. The lowest current density of 0.75 A.m^{-2} was produced by a pure culture of *Shewanella oneidensis* carried out in a double-compartment MFC (Han et al., 2016). The other bioanode within Group 1 was implemented in a suitable 3-electrode device, under polarization, with a multi-species inoculum, but was fed with food waste as the substrate. In this case, the use of a complex substrate instead of acetate may have been a performance-reducing factor.

For Group 2, the operating conditions (3-electrode device with polarization at 0.30 V Ag/AgCl (Z. Wang et al., 2015; Xie et al., 2011), double-compartment MFC (Xie et al., 2011), electrode surface modifications (graphene (Z. Wang et al., 2015; Xie et al., 2011), carbon nanotubes (Xie et al., 2011)) and substrate (acetate (Z. Wang et al., 2015; Xie et al., 2011), glucose (Xie et al., 2011)) were so diverse that it was difficult to compare one study to another.

For the same reason, when comparing the histograms of Figures 19.A and 19.B we must avoid concluding firmly that monolithic porous electrodes may be more efficient than fibrous carbon electrodes, even if we would like to suggest it. Comparison of the two kinds of electrodes in similar operating conditions and, where appropriate, with similar surface modification would be necessary to conclude on this question.

However, as can be seen in Figure 19.B, there are exceptions: two fibre-based bioanodes succeeded in producing 37.6 (Rousseau et al., 2016) and 85 (Rousseau et al., 2013) A.m^{-2} . The latter performance referred to Group 4 and represents one of the best current outputs reported in this review. Again, these successful results are explained by optimal operating conditions.

6. PORE SIZE GREATER THAN 500 μM (TABLE 5)

Table 5 : Examples of three-dimensional porous bioanodes with a pore size superior to 500 μm used in bioelectrochemical systems.

Bioanodes	Reactor type	Inoculum	Substrate	J_{max} ($\text{A}\cdot\text{m}^{-2}$)	Pore size (μm)	Reference
MONOLITHIC						
Carbon						
Layered corrugated carbon	1C / Fed-B <i>Polarization</i> <i>0.2V vs Ag/AgCl</i>	Wastewater	Acetate 20 mM	390	1000-3000	(Chen et al., 2012b)
Reticulated vitrified carbon foam	1C / Fed-B <i>Polarization</i> <i>0.2V vs Ag/AgCl</i>	Wastewater	Acetate 20 mM	23.9	> 500 μm	(Yuan et al., 2013)
Hybrid						
Polyurethane based activated carbon sponge + carbon black and ammonium persulfate	MFC 1C / Fed-B	Anaerobic sludge	Glucose $1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	32.7	500-2000	(Liu et al., 2015)
Metal						
Stainless steel foam	1C / Fed-B <i>Polarization</i> <i>-0.24V vs Ag/AgCl</i>	Garden compost leachate	Acetate 20 mM	82	200-800	(Ketep et al., 2014)

6.1 Impact of the pore size on microbial colonisation

Only a few articles, around four to the best of our knowledge, have described porous bioanodes with pore sizes of the order of magnitude of a millimetre. Actually, in this pore size range, the relevance of the “porous” denomination can be debated and one can wonder whether qualifications such as “multi-layered” or “three-dimensional architecture” would not be more appropriate for some electrodes. This will not be the subject of the present section.

The four electrodes belonging to this category were made of stainless steel foam with pores of 200 to 800 μm (Ketep et al., 2014), reticulated vitrified carbon foam with pores greater than 500 μm (Chen et al., 2012c), polyurethane-based activated carbon sponge whose surface was modified with carbon black deposition and ammonium persulfate oxidation with pores of 500 to 2000 μm (Liu et al., 2015), and carbonized corrugated cardboard with pore sizes assessed from 1 to 3 mm found from the images in the article (Chen et al., 2012b). All these electrodes could be related to the monolithic type.

According to the large size of the pores, it is not surprising that microbial colonization was generally observed inside these structures, without notable limiting effect. Liu et al. noted a well-developed biofilm inside their carbon sponge electrode after one month of operation (Liu et al., 2015). Ketep et al. (Ketep et al., 2014) and Chen et al. (Chen et al., 2012c, 2012b) measured biofilm thicknesses of 20 μm and 18 μm in their stainless steel foam and carbonaceous anodes after 25 and 100 days’ operation, respectively. No pore clogging was reported, although all these bioanodes were formed with multispecies inoculum (wastewater (Chen et al., 2012c, 2012b), anaerobic sludge (Liu et al., 2015), and soil (Ketep et al., 2014)).

6.2 Impact of the pore size on electrochemical performance

Clearly, these electrodes produced the highest current density (Figure 20). Two of the four belonged to Group 4 of our classification, i.e. produced more than 80 $\text{A}\cdot\text{m}^{-2}$. It could be noted that these bioanodes were implemented in so-called favourable conditions (polarization, multi-species inoculum, acetate as the substrate for 3 out of 4) but many others in the previous sections were also implemented in such conditions and did not produce current densities as high as 82 (Ketep et al., 2014) and 390 $\text{A}\cdot\text{m}^{-2}$ (Chen et al., 2012b). It can consequently be concluded that the larger pore sizes really enhanced the electrochemical performance. Moreover, the highest current density reported so

far, of 390 A.m^{-2} (Chen et al., 2012b), was obtained with the carbonized corrugated cardboard, which displayed the largest pore sizes, of 1 to 3 mm.

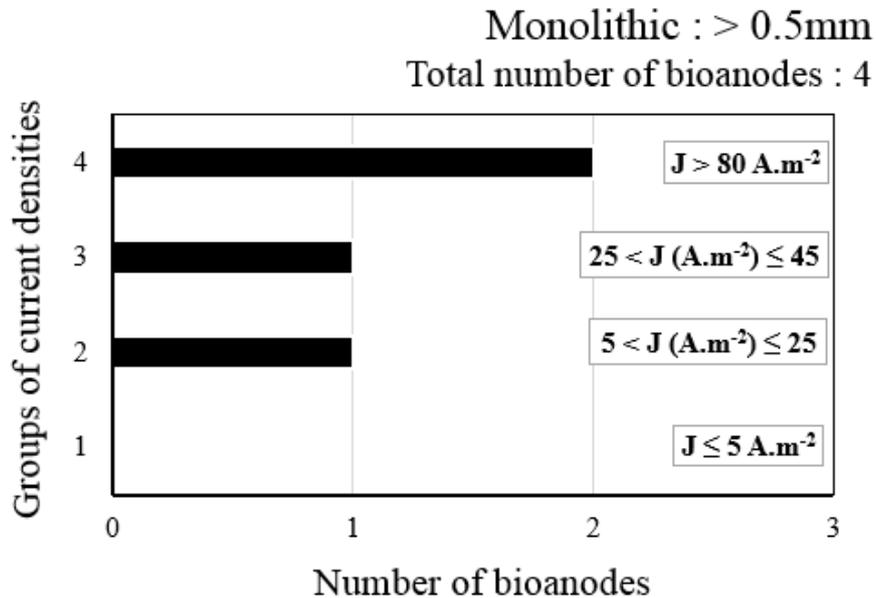


Figure 20 : Number of monolithic porous microbial anodes with pore size bigger than $500 \mu\text{m}$ classified according to the maximum current density produced.

7. ATTEMPT TO DEFINE GENERAL RULES AND RESEARCH OPPORTUNITIES

A quick comparison of the histograms of the four microbial anode categories defined here (Figure 10) shows an obvious trend: current densities are the highest with pore sizes at the millimetre level. This trend can be considered as a general rule to guide further research and technological development endeavours. Smaller pore sizes may possibly be considered for specific purposes but do not seem to be able to compete with millimetre pores when the main objective is to maximize current density related to the electrode projected surface area.

It is difficult to establish an accurate relationship between current density and pore size inside each category. The considerable impact of the experimental conditions appears to be the most important bias that makes comparisons of the different studies difficult. In particular, it was repeatedly observed that appropriate electroanalytical conditions, i.e. polarization using a 3-electrode set-up, led to higher performance, which cannot be compared to the results obtained in MFC devices. In addition to polarization at controlled potential, other operating parameters, relating to electroanalytical conditions, such as small surface area of the working electrode vs. auxiliary

electrode, low ratio of electrode surface area to solution volume, and controlled temperature can also help to maximize the bioanode performance. This has already been reviewed and theorized (Rimboud et al., 2014).

The nature of the inoculum and the substrate also has major importance. Multi-species inoculum generally led to higher current density than pure culture, except in the case of *Geobacter sulfurreducens*, and acetate seemed to be the optimal substrate. Finally, surface modification, with carbon nanotubes, graphene and other compounds is also a factor of variation from one study to another. For all these reasons, some simple, but essential, advice can be given for future studies: if the objective is to assess the impact of the pore size, comparative studies must be performed in electroanalytical conditions and these studies should be distinguished from those dealing with comparison of different electrode materials and surface modifications.

Concerning the nature of the electrode material, it may be suggested that porous monolithic structures obtained by carbonizing natural templates such as wild mushroom, corn stem, king mushroom (Karthikeyan et al., 2015b), kenaf (Chen et al., 2012a) or pomelo peel (Chen et al., 2012c) may be very suitable to form bioanodes. This cannot be stated as absolutely true because of the variability of the experimental conditions noted above, but this track would deserve further research for possible confirmation.

Even though it was not possible to extract accurate correlations, each electrode category gave clear trends on the role of pore size in the performance of microbial anodes. The lowest pore sizes, of a few micrometres (category 1 here), allow internal colonization but the conditions required to favour the internal colonization of such small pores (vs. microbial cell size) are far from those suitable for obtaining fully-developed, efficient electroactive biofilms. In conclusion, internal colonization of small pores is possible but in conditions of weak microbial growth, which do not favour current production.

Pore sizes of the order of several tens of micrometres (category 2 here) are clogged by biofilms that, in conditions suitable to produce current, develop over the porosity. In this case, mature biofilm develops over the external surface of the structure. Porosity can impact the biofilm structure and the thickness but as an underlying 2-dimensional support. The large internal area of the porous structure is not exploited but porosity acts in the same manner as surface topography could (Champigneux et al., 2018a). In contrast, clogging no longer appears, even after several months of operation, with pore sizes of a few hundred micrometres (category 3 here). In this category, mass transport, and

particularly diffusion of the buffering species that mitigate local acidification of the bioanodes (Harnisch and Schröder, 2009; Popat and Torres, 2016; Torres et al., 2008b), become rate-limiting (Champigneux et al., 2018b). Biofilm penetration depth is consequently limited to a few hundreds of micrometres. Finally, pore sizes of the order of magnitude of a millimetre (category 4 here) seem the most suitable for designing porous bioanodes.

If the objective is to design efficient porous microbial electrodes, the attempted theoretical approach described in sections 3.2 and 3.3 has shown that the pore size is not the only parameter to be considered, the other two being the porosity (void fraction) and the specific surface area. The three parameters: pore size, porosity and specific surface area, must be maximized, which requires an optimum to be sought because the specific surface area decreases when porosity and pore size increase. Coupled with theoretical modelling of mass transport inside the porous structure, this could form the basis of microbial anode design engineering.

As final remark, it should be noted that these conclusions are made in the general context of microbial anodes working in usual conditions, for instance monophasic electrodes immersed in quiescent, or weakly stirred, solutions. Conclusions could be different if the anodes were implemented in specific reactor designs, for example as flow-through electrodes (Massazza et al., 2015), granular packed bed electrodes (Aelterman et al., 2008; I. Rabaey et al., 2005; Tran et al., 2010) or fluidized electrodes (Kong et al., 2011; Ren et al., 2014). In particular, the discussion of biofilm development and mass transport should take place in the specific context relating to the reactor configuration.

8. CONCLUSION

As a major conclusion, this review suggests that pore sizes of the order of magnitude of a millimetre seem the most suitable for designing porous microbial anodes. Surprisingly, studies on electrode architecture at the millimetre scale remain rare, although they have led to the highest current densities (Chen et al., 2012b; Ketep et al., 2014). We hope that this review will convince the research community to go ahead in this direction and that useful guidelines have been established to encourage progress in the engineering of porous electrode architecture.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful for the financial support of the French state, managed by the Agence Nationale de la Recherche (ANR), within the framework of the Bioelec project (ANR-13-BIME-006) and the “Koropokkuru” project (ANR-14-CE05-0004).

DECLARATION OF INTEREST

None.

REFERENCES

- Aelterman, P., Versichele, M., Marzorati, M., Boon, N., Verstraete, W., 2008. Loading rate and external resistance control the electricity generation of microbial fuel cells with different three-dimensional anodes. *Bioresour. Technol.* 99, 8895–8902. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.04.061>
- Bajracharya, S., Sharma, M., Mohanakrishna, G., Dominguez Benneton, X., Strik, D.P.B.T.B., Sarma, P.M., Pant, D., 2016. An overview on emerging bioelectrochemical systems (BESs): Technology for sustainable electricity, waste remediation, resource recovery, chemical production and beyond. *Renew. Energy, Special Issue: New Horizons in Biofuels Production and Technologies* 98, 153–170. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2016.03.002>
- Baudler, A., 2016. Metal-polymer hybrid architectures as novel anode platform for microbial electrochemical technologies.
- Baudler, A., Schmidt, I., Langner, M., Greiner, A., Schroeder, U., 2015a. Does it have to be carbon? Metal anodes in microbial fuel cells and related bioelectrochemical systems. *Energy Environ. Sci.* 8, 2048–2055. <https://doi.org/10.1039/c5ee00866b>
- Bian, B., Shi, D., Cai, X., Hu, M., Guo, Q., Zhang, C., Wang, Q., Sun, A.X., Yang, J., 2018. 3D printed porous carbon anode for enhanced power generation in microbial fuel cell. *Nano Energy* 44, 174–180. <https://doi.org/10.1016/j.nanoen.2017.11.070>
- Blanchet, E., Erable, B., De Solan, M.-L., Bergel, A., 2016. Two-dimensional carbon cloth and three-dimensional carbon felt perform similarly to form bioanode fed with food waste. *Electrochem. Commun.* 66, 38–41. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2016.02.017>
- Champigneux, P., Delia, M.-L., Bergel, A., 2018a. Impact of electrode micro- and nano-scale topography on the formation and performance of microbial electrodes. *Biosens. Bioelectron.* in press.
- Champigneux, P., Renault-Sentenac, C., Bourrier, D., Rossi, C., Delia, M.-L., Bergel, A., 2018b. Effect of surface nano/micro-structuring on the early formation of microbial anodes with *Geobacter sulfurreducens*: Experimental and theoretical approaches. *Bioelectrochemistry* 121, 191–200. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2018.02.005>
- Chen, S., He, G., Carmona-Martinez, A.A., Agarwal, S., Greiner, A., Hou, H., Schröder, U., 2011a. Electrospun carbon fiber mat with layered architecture for anode in microbial fuel cells. *Electrochem. Commun.* 13, 1026–1029. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2011.06.009>
- Chen, S., He, G., Hu, X., Xie, M., Wang, S., Zeng, D., Hou, H., Schroeder, U., 2012a. A Three-Dimensionally Ordered Macroporous Carbon Derived From a Natural Resource as Anode for

- Microbial Bioelectrochemical Systems. *ChemSusChem* 5, 1059–1063. <https://doi.org/10.1002/cssc.201100783>
- Chen, S., He, G., Liu, Q., Harnisch, F., Zhou, Y., Chen, Y., Hanif, M., Wang, S., Peng, X., Hou, H., Schroder, U., 2012b. Layered corrugated electrode macrostructures boost microbial bioelectrocatalysis. *Energy Environ. Sci.* 5, 9769–9772. <https://doi.org/10.1039/C2EE23344D>
- Chen, S., Hou, H., Harnisch, F., Patil, S.A., Carmona-Martinez, A.A., Agarwal, S., Zhang, Y., Sinha-Ray, S., Yarin, A.L., Greiner, A., Schröder, U., 2011b. Electrospun and solution blown three-dimensional carbon fiber nonwovens for application as electrodes in microbial fuel cells. *Energy Environ. Sci.* 4, 1417–1421. <https://doi.org/10.1039/C0EE00446D>
- Chen, S., Liu, Q., He, G., Zhou, Y., Hanif, M., Peng, X., Wang, S., Hou, H., 2012c. Reticulated carbon foam derived from a sponge-like natural product as a high-performance anode in microbial fuel cells. *J. Mater. Chem.* 22, 18609–18613. <https://doi.org/10.1039/c2jm33733a>
- Chen, W., Huang, Y.-X., Li, D.-B., Yu, H.-Q., Yan, L., 2014. Preparation of a macroporous flexible three dimensional graphene sponge using an ice-template as the anode material for microbial fuel cells. *RSC Adv.* 4, 21619–21624. <https://doi.org/10.1039/C4RA00914B>
- Dewan, A., Ay, S.U., Karim, M.N., Beyenal, H., 2014. Alternative power sources for remote sensors: A review. *J. Power Sources* 245, 129–143. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2013.06.081>
- Di Lorenzo, M., Curtis, T.P., Head, I.M., Scott, K., 2009. A single-chamber microbial fuel cell as a biosensor for wastewaters. *Water Res.* 43, 3145–3154. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.01.005>
- Dumas, C., Basséguy, R., Bergel, A., 2008. Electrochemical activity of *Geobacter sulfurreducens* biofilms on stainless steel anodes. *Electrochimica Acta* 53 n° 16., 5235–5241, available on : http://oatao.univ-toulouse.fr/984/1/basseguy_984.pdf.
- Dumas, C., Basséguy, R., Bergel, A., 2007. DSA to grow electrochemically active biofilms of *Geobacter sulfurreducens*. *Electrochimica Acta* Vol. 53 N° 7., 3200–3209, available on : http://oatao.univ-toulouse.fr/22/1/basseguy_22.pdf.
- Erable, B., Etcheverry, L., Bergel, A., 2011. From microbial fuel cell (MFC) to microbial electrochemical snorkel (MES): maximizing chemical oxygen demand (COD) removal from wastewater. *Biofouling* 27, 319–326. <https://doi.org/10.1080/08927014.2011.564615>
- Feng, Y., Yang, Q., Wang, X., Logan, B.E., 2010a. Treatment of carbon fiber brush anodes for improving power generation in air-cathode microbial fuel cells. *J. Power Sources* 195, 1841–1844. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2009.10.030>
- Gaveau, A., Coetsier, C., Roques, C., Bacchin, P., Dague, E., Causserand, C., 2017. Bacteria transfer by deformation through microfiltration membrane. *J. Membr. Sci.* 523, 446–455. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2016.10.023>
- Han, T.H., Sawant, S.Y., Hwang, S.-J., Cho, M.H., 2016. Three-dimensional, highly porous N-doped carbon foam as microorganism propitious, efficient anode for high performance microbial fuel cell. *RSC Adv.* 6, 25799–25807. <https://doi.org/10.1039/C6RA01842D>
- Harnisch, F., Schröder, U., 2009. Selectivity versus mobility: separation of anode and cathode in microbial bioelectrochemical systems. *ChemSusChem* 2, 921–926. <https://doi.org/10.1002/cssc.200900111>
- He, G., Gu, Y., He, S., Schröder, U., Chen, S., Hou, H., 2011. Effect of fiber diameter on the behavior of biofilm and anodic performance of fiber electrodes in microbial fuel cells. *Bioresour. Technol.* 102, 10763–10766. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.09.006>
- He, Z., Liu, J., Qiao, Y., Li, C.M., Tan, T.T.Y., 2012. Architecture engineering of hierarchically porous chitosan/vacuum-stripped graphene scaffold as bioanode for high performance microbial fuel cell. *Nano Lett.* 12, 4738–4741. <https://doi.org/10.1021/nl302175j>

- Hou, J., Liu, Z., Yang, S., Zhou, Y., 2014. Three-dimensional macroporous anodes based on stainless steel fiber felt for high-performance microbial fuel cells. *J. Power Sources* 258, 204–209. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2014.02.035>
- Hou, J., Liu, Z., Zhang, P., 2013. A new method for fabrication of graphene/polyaniline nanocomplex modified microbial fuel cell anodes. *J. Power Sources* 224, 139–144. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2012.09.091>
- Huang, L., Li, X., Ren, Y., Wang, X., 2016. A monolithic three-dimensional macroporous graphene anode with low cost for high performance microbial fuel cells. *RSC Adv.* 6, 21001–21010. <https://doi.org/10.1039/C5RA24718G>
- Huang, L., Logan, B.E., 2008. Electricity generation and treatment of paper recycling wastewater using a microbial fuel cell. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80, 349–355. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1546-7>
- Jiang, H., Halverson, L.J., Dong, L., 2015a. A miniature microbial fuel cell with conducting nanofibers-based 3D porous biofilm. *J. Micromechanics Microengineering* 25, 125017. <https://doi.org/10.1088/0960-1317/25/12/125017>
- Jiang, H., Halverson, L.J., Dong, L., 2015b. A miniature microbial fuel cell with conducting nanofibers-based 3D porous biofilm. *J. Micromechanics Microengineering* 25, 125017. <https://doi.org/10.1088/0960-1317/25/12/125017>
- Jiang, X., Hu, J., Lieber, A.M., Jackan, C.S., Biffinger, J.C., Fitzgerald, L.A., Ringeisen, B.R., Lieber, C.M., 2014. Nanoparticle facilitated extracellular electron transfer in microbial fuel cells. *Nano Lett.* 14, 6737–6742. <https://doi.org/10.1021/nl503668q>
- Karthikeyan, R., Wang, B., Xuan, J., Wong, J.W.C., Lee, P.K.H., Leung, M.K.H., 2015a. Interfacial electron transfer and bioelectrocatalysis of carbonized plant material as effective anode of microbial fuel cell. *Electrochimica Acta* 157, 314–323. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2015.01.029>
- Kato, S., Hashimoto, K., Watanabe, K., 2012. Microbial interspecies electron transfer via electric currents through conductive minerals. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 10042–10046. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117592109>
- Kato, S., Hashimoto, K., Watanabe, K., 2011. Methanogenesis facilitated by electric syntrophy via (semi)conductive iron-oxide minerals. *Environ. Microbiol.* 14, 1646–1654. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02611.x>
- Katuri, K., Ferrer, M.L., Gutierrez, M.C., Jimenez, R., del Monte, F., Leech, D., 2011. Three-dimensional microchanneled electrodes in flow-through configuration for bioanode formation and current generation. *Energy Environ. Sci.* 4, 4201–4210. <https://doi.org/10.1039/C1EE01477C>
- Ketep, S.F., Bergel, A., Calmet, A., Erable, B., 2014. Stainless steel foam increases the current produced by microbial bioanodes in bioelectrochemical systems. *Energy Environ. Sci.* 7, 1633–1637. <https://doi.org/10.1039/c3ee44114h>
- Kong, W., Guo, Q., Wang, X., Yue, X., 2011. Electricity Generation from Wastewater Using an Anaerobic Fluidized Bed Microbial Fuel Cell. *Ind. Eng. Chem. Res.* 50, 12225–12232. <https://doi.org/10.1021/ie2007505>
- Lai, B., Tang, X., Li, H., Du, Z., Liu, X., Zhang, Q., 2011. Power production enhancement with a polyaniline modified anode in microbial fuel cells. *Biosens. Bioelectron.* 28, 373–377. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2011.07.050>
- Lai, J., Nsabimana, A., Luque, R., Xu, G., 2018. 3D Porous Carbonaceous Electrodes for Electrocatalytic Applications. *Joule* 2, 76–93. <https://doi.org/10.1016/j.joule.2017.10.005>
- Lepage, G., Albernaz, F.O., Perrier, G., Merlin, G., 2012. Characterization of a microbial fuel cell with reticulated carbon foam electrodes. *Bioresour. Technol.* 124, 199–207. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.07.067>

- Li, B., Zhou, J., Zhou, X., Wang, X., Li, B., Santoro, C., Grattieri, M., Babanova, S., Artyushkova, K., Atanassov, P., Schuler, A.J., 2014. Surface Modification of Microbial Fuel Cells Anodes: Approaches to Practical Design. *Electrochimica Acta* 134, 116–126. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2014.04.136>
- Li, C., Zhang, L., Ding, L., Ren, H., Cui, H., 2011. Effect of conductive polymers coated anode on the performance of microbial fuel cells (MFCs) and its biodiversity analysis. *Biosens. Bioelectron.* 26, 4169–4176. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2011.04.018>
- Lin, X., Nishio, K., Konno, T., Ishihara, K., 2012. The effect of the encapsulation of bacteria in redox phospholipid polymer hydrogels on electron transfer efficiency in living cell-based devices. *Biomaterials* 33, 8221–8227. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.08.035>
- Liu, F., Rotaru, A.-E., Shrestha, P.M., Malvankar, N.S., Nevin, K.P., Lovley, D.R., 2012. Promoting direct interspecies electron transfer with activated carbon. *Energy Environ. Sci.* 5, 8982–8989. <https://doi.org/10.1039/C2EE22459C>
- Liu, J., Liu, J., He, W., Qu, Y., Ren, N., Feng, Y., 2014. Enhanced electricity generation for microbial fuel cell by using electrochemical oxidation to modify carbon cloth anode. *J. Power Sources* 265, 391–396. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2014.04.005>
- Liu, M., Zhou, M., Yang, H., Zhao, Y., Hu, Y., 2015. A cost-effective polyurethane based activated carbon sponge anode for high-performance microbial fuel cells. *RSC Adv.* 5, 84269–84275. <https://doi.org/10.1039/C5RA14644E>
- Liu, X., Du, X., Wang, X., Li, N., Xu, P., Ding, Y., 2013. Improved microbial fuel cell performance by encapsulating microbial cells with a nickel-coated sponge. *Biosens. Bioelectron.* 41, 848–851. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.08.014>
- Liu, Y., Kim, H., Franklin, R., Bond, D.R., 2010. Gold line array electrodes increase substrate affinity and current density of electricity-producing *G. sulfurreducens* biofilms. *Energy Environ. Sci.* 3, 1782–1788. <https://doi.org/10.1039/C0EE00242A>
- Logan, B., Cheng, S., Watson, V., Estadt, G., 2007. Graphite Fiber Brush Anodes for Increased Power Production in Air-Cathode Microbial Fuel Cells. *Environ. Sci. Technol.* 41, 3341–3346. <https://doi.org/10.1021/es062644y>
- Manickam, S.S., Karra, U., Huang, L., Bui, N.-N., Li, B., McCutcheon, J.R., 2013. Activated carbon nanofiber anodes for microbial fuel cells. *Carbon* 53, 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2012.10.009>
- Mashkour, M., Rahimnejad, M., Mashkour, M., 2016. Bacterial cellulose-polyaniline nano-biocomposite: A porous media hydrogel bioanode enhancing the performance of microbial fuel cell. *J. Power Sources* 325, 322–328. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2016.06.063>
- Massazza, D., Parra, R., Busalmen, J.P., Romeo, H.E., 2015. New ceramic electrodes allow reaching the target current density in bioelectrochemical systems. *Energy Environ. Sci.* 8, 2707–2712. <https://doi.org/10.1039/C5EE01498K>
- Pasternak, G., Greenman, J., Ieropoulos, I., 2017. Self-powered, autonomous Biological Oxygen Demand biosensor for online water quality monitoring. *Sens. Actuators B Chem.* 244, 815–822. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.01.019>
- Pham, Q.P., Sharma, U., Mikos, A.G., 2006. Electrospinning of polymeric nanofibers for tissue engineering applications: a review. *Tissue Eng.* 12, 1197–1211. <https://doi.org/10.1089/ten.2006.12.1197>
- Popat, S.C., Torres, C.I., 2016. Critical transport rates that limit the performance of microbial electrochemistry technologies. *Bioresour. Technol., Waste Biorefinery - Advocating Circular Economy* 215, 265–273. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.04.136>
- Rabaey, I., Ossiur, W., Verhaege, M., Verstraete, W., 2005. Continuous microbial fuel cells convert carbohydrates to electricity. *Water Sci. Technol. J. Int. Assoc. Water Pollut. Res.* 52, 515–523.

- Rabaey, K., Clauwaert, P., Aelterman, P., Verstraete, W., 2005. Tubular microbial fuel cells for efficient electricity generation. *Environ. Sci. Technol.* 39, 8077–8082.
- Ren, H., Tian, H., Gardner, C.L., Ren, T.-L., Chae, J., 2016. A miniaturized microbial fuel cell with three-dimensional graphene macroporous scaffold anode demonstrating a record power density of over 10 000 W m⁻³. *Nanoscale* 8, 3539–3547. <https://doi.org/10.1039/c5nr07267k>
- Ren, L., Ahn, Y., Logan, B.E., 2014. A Two-Stage Microbial Fuel Cell and Anaerobic Fluidized Bed Membrane Bioreactor (MFC-AFMBR) System for Effective Domestic Wastewater Treatment. *Environ. Sci. Technol.* 48, 4199–4206. <https://doi.org/10.1021/es500737m>
- Rimboud, M., Pocaznoi, D., Erable, B., Bergel, A., 2014. Electroanalysis of microbial anodes for bioelectrochemical systems: basics, progress and perspectives. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 16, 16349–16366. <https://doi.org/10.1039/C4CP01698J>
- Rousseau, R., Dominguez-Benetton, X., Délia, M.-L., Bergel, A., 2013. Microbial bioanodes with high salinity tolerance for microbial fuel cells and microbial electrolysis cells. *Electrochem. Commun.* 33, 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2013.04.002>
- Rousseau, R., Santaella, C., Bonnafous, A., Achouak, W., Godon, J.-J., Delia, M.-L., Bergel, A., 2016. Halotolerant bioanodes: The applied potential modulates the electrochemical characteristics, the biofilm structure and the ratio of the two dominant genera. *Bioelectrochemistry* 112, 24–32. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2016.06.006>
- Schröder, U., Harnisch, F., Angenent, L.T., 2015. Microbial electrochemistry and technology: terminology and classification. *Energy Environ. Sci.* 8, 513–519. <https://doi.org/10.1039/C4EE03359K>
- Smith, L.A., Ma, P.X., 2004. Nano-fibrous scaffolds for tissue engineering. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 39, 125–131. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2003.12.004>
- Somerscales, E.F.C., Rensselaer Polytechnic Institute, 1981. Fouling of heat transfer equipment. Hemisphere Pub. Corp.
- Song, R.-B., Zhao, C.-E., Jiang, L.-P., Abdel-Halim, E.S., Zhang, J.-R., Zhu, J.-J., 2016. Bacteria-Affinity 3D Macroporous Graphene/MWCNTs/Fe₃O₄ Foams for High-Performance Microbial Fuel Cells. *Acs Appl. Mater. Interfaces* 8, 16170–16177. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b03425>
- Torres, C.I., Kato Marcus, A., Rittmann, B.E., 2008a. Proton transport inside the biofilm limits electrical current generation by anode-respiring bacteria. *Biotechnol. Bioeng.* 100, 872–881. <https://doi.org/10.1002/bit.21821>
- Tran, H.-T., Ryu, J.-H., Jia, Y.-H., Oh, S.-J., Choi, J.-Y., Park, D.-H., Ahn, D.-H., 2010. Continuous bioelectricity production and sustainable wastewater treatment in a microbial fuel cell constructed with non-catalyzed granular graphite electrodes and permeable membrane. *Water Sci. Technol. J. Int. Assoc. Water Pollut. Res.* 61, 1819–1827. <https://doi.org/10.2166/wst.2010.140>
- Tsai, H.-Y., Wu, C.-C., Lee, C.-Y., Shih, E.P., 2009. Microbial fuel cell performance of multiwall carbon nanotubes on carbon cloth as electrodes. *J. Power Sources* 194, 199–205. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2009.05.018>
- Wang, H., Davidson, M., Zuo, Y., Ren, Z., 2011. Recycled tire crumb rubber anodes for sustainable power production in microbial fuel cells. *J. Power Sources* 196, 5863–5866. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2011.01.082>
- Wang, H., Ren, Z.J., 2013. A comprehensive review of microbial electrochemical systems as a platform technology. *Biotechnol. Adv.* 31, 1796–1807. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.10.001>
- Wang, H., Wang, G., Ling, Y., Qian, F., Song, Y., Lu, X., Chen, S., Tong, Y., Li, Y., 2013. High power density microbial fuel cell with flexible 3D graphene-nickel foam as anode. *Nanoscale* 5, 10283–10290. <https://doi.org/10.1039/c3nr03487a>

- Wang, Y.-Q., Huang, H.-X., Li, B., Li, W.-S., 2015. Novelty developed three-dimensional carbon scaffold anodes from polyacrylonitrile for microbial fuel cells. *J. Mater. Chem. A* 3, 5110–5118. <https://doi.org/10.1039/C4TA06007E>
- Wang, Z., Zheng, Z., Zheng, S., Chen, S., Zhao, F., 2015. Carbonized textile with free-standing threads as an efficient anode material for bioelectrochemical systems. *J. Power Sources* 287, 269–275. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2015.04.058>
- Xie, X., Criddle, C., Cui, Y., 2015. Design and fabrication of bioelectrodes for microbial bioelectrochemical systems. *Energy Environ. Sci.* 8, 3418–3441. <https://doi.org/10.1039/C5EE01862E>
- Xie, X., Hu, L., Pasta, M., Wells, G.F., Kong, D., Criddle, C.S., Cui, Y., 2011. Three-Dimensional Carbon Nanotube–Textile Anode for High-Performance Microbial Fuel Cells. *Nano Lett.* 11, 291–296. <https://doi.org/10.1021/nl103905t>
- Xie, X., Meng, Y., Yi, C., 2012. Carbon nanotube-coated macroporous sponge for microbial fuel cell electrodes 5265–5270. <https://doi.org/10.1039/C1EE02122B>
- Xu, Y., Sheng, K., Li, C., Shi, G., 2010. Self-Assembled Graphene Hydrogel via a One-Step Hydrothermal Process. *ACS Nano* 4, 4324–4330. <https://doi.org/10.1021/nn101187z>
- Yang, X., Ma, X., Wang, K., Wu, D., Lei, Z., Feng, C., 2016. Eighteen-month assessment of 3D graphene oxide aerogel-modified 3D graphite fiber brush electrode as a high-performance microbial fuel cell anode. *Electrochimica Acta* 210, 846–853. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2016.05.215>
- Yang, Y., Liu, T., Zhu, X., Zhang, F., Ye, D., Liao, Q., Li, Y., 2016. Boosting Power Density of Microbial Fuel Cells with 3D Nitrogen-Doped Graphene Aerogel Electrode. *Adv. Sci.* 3. <https://doi.org/10.1002/advs.201600097>
- Yin, H., Zhao, S., Wan, J., Tang, H., Chang, L., He, L., Zhao, H., Gao, Y., Tang, Z., 2013. Three-dimensional graphene/metal oxide nanoparticle hybrids for high-performance capacitive deionization of saline water. *Adv. Mater. Deerfield Beach Fla* 25, 6270–6276. <https://doi.org/10.1002/adma.201302223>
- Yong, Y.-C., Dong, X.-C., Chan-Park, M.B., Song, H., Chen, P., 2012. Macroporous and monolithic anode based on polyaniline hybridized three-dimensional graphene for high-performance microbial fuel cells. *ACS Nano* 6, 2394–2400. <https://doi.org/10.1021/nn204656d>
- Yong, Y.-C., Yu, Y.-Y., Zhang, X., Song, H., 2014. Highly Active Bidirectional Electron Transfer by a Self-Assembled Electroactive Reduced-Graphene-Oxide-Hybridized Biofilm. *Angew. Chem. Int. Ed.* 53, 4480–4483. <https://doi.org/10.1002/anie.201400463>
- Yu, Y.-Y., Zhai, D.-D., Si, R.-W., Sun, J.-Z., Liu, X., Yong, Y.-C., 2017. Three-Dimensional Electrodes for High-Performance Bioelectrochemical Systems. *Int. J. Mol. Sci.* 18. <https://doi.org/10.3390/ijms18010090>
- Yuan, Y., Zhou, S., Liu, Y., Tang, J., 2013. Nanostructured macroporous bioanode based on polyaniline-modified natural loofah sponge for high-performance microbial fuel cells. *Environ. Sci. Technol.* 47, 14525–14532. <https://doi.org/10.1021/es404163g>
- Zhang, J., Li, J., Ye, D., Zhu, X., Liao, Q., Zhang, B., 2014. Enhanced performances of microbial fuel cells using surface-modified carbon cloth anodes: A comparative study. *Int. J. Hydrog. Energy* 39, 19148–19155. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.09.067>
- Zhao, S., Li, Y., Yin, H., Liu, Z., Luan, E., Zhao, F., Tang, Z., Liu, S., 2015. Three-dimensional graphene/Pt nanoparticle composites as freestanding anode for enhancing performance of microbial fuel cells. *Sci. Adv.* 1, e1500372. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1500372>

5 PHENOMENE D'ELECTROTACTISME ?

A ce jour, la majorité des études menées sur les biofilms EA se concentrent sur des biofilms « matures », c'est-à-dire des biofilms à un stade de développement correspondant aux étapes 4 et 5 de la mise en place d'un biofilm décrites sur la Figure 2 (section 1.2 de ce chapitre). Or, avant de former un biofilm, les bactéries doivent dans un premier temps arriver sur la surface de l'électrode. A notre connaissance, très peu d'études se sont penchées sur les tous premiers instants de la mise en place d'un biofilm EA (étape 1 de la Figure 2, section 1.2 de ce chapitre). Pourtant, la connaissance des mécanismes permettant aux bactéries d'arriver à la surface des électrodes serait sans aucun doute bénéfique pour élaborer des stratégies visant à accélérer la sélection des bactéries EA à la surface des électrodes.

Il est généralement admis que les bactéries sont capables de se mouvoir par chimiotaxie ou par énergie taxie, le terme « taxie » désignant le déplacement orienté d'un organisme vivant en réponse à un stimulus extérieur. Un déplacement des bactéries induit par un gradient de composition chimique de leur environnement est qualifié de **chimiotaxie**. Les bactéries se déplacent depuis des zones de faibles concentrations vers des zones plus concentrées en molécules d'intérêt pour elles. Ou à l'inverse vers des zones moins concentrées si elles ont affaire à des toxiques. Durant leur déplacement, elles sont censées percevoir les gradients spatiaux de concentrations via des capteurs (Macnab and Koshland, 1972; Symposium and Microbiology, 1990; Vladimirov and Sourjik, 2009). En effet, les bactéries sont dotées de capteurs spécifiques à certaines molécules telles que des nutriments, des sources de carbone ou des accepteurs d'électrons (Alexandre, 2010; Schweinitzer and Josenhans, 2010).

Lorsque le niveau d'énergie cellulaire ou l'activité métabolique d'une bactérie diminue, celle-ci cherche à combler cette diminution d'énergie en se déplaçant vers des micro-environnements susceptibles de lui apporter plus d'énergie. Ce déplacement est qualifié d'« **énergie taxie** » qui, à l'inverse du chimiotactisme, répond à un stimulus intracellulaire. En effet, lorsque la bactérie « sent » que son activité métabolique devient critique via l'apparition d'un gradient de la force proton-motrice par exemple, celle-ci initie un signal qui altère la direction de sa nage (Schweinitzer and Josenhans, 2010; Taylor et al., 1999).

Ces phénomènes de taxies sont aujourd'hui bien connues et quantifiés pour le déplacement des bactéries vers des composés solubles (Oram and Jeuken, 2017). Mais il y a très peu de phénomènes

de taxie décrits en réponse à la présence d'une électrode solide. Par conséquent, notre recherche bibliographique a été essentiellement orientée sur les mécanismes permettant d'expliquer le déplacement des bactéries vers des composés insolubles et notamment des accepteurs insolubles d'électrons.

5.1 Taxie vers des accepteurs insolubles d'électrons

Quelques études se sont intéressées à la taxie de *Shewanella oneidensis* MR-1 vers des accepteurs insolubles d'électrons (oxydes métalliques et électrodes) (Oram et Jeuken 2017). En effet, MR-1 est une souche bactérienne capable de respirer une large gamme d'accepteurs d'électrons solubles tels que des nitrates, du fumarate, mais aussi des accepteurs insolubles tels que des particules de Fe(III) dans des conditions anaérobies (Baraquet et al., 2009; Bencharit and Ward, 2005; Nealson et al., 1995). De plus, MR-1 fait partie des bactéries capables de réaliser des transferts extracellulaires d'électrons avec des électrodes.

Li et al., ont réalisé des tests selon la méthode des « swarm/swim plate assay » dont le protocole est illustré sur la Figure 21. Les tests ont été conduits dans des conditions anaérobies sur des boîtes de Pétri dont le milieu est gélifié avec de l'agar (0.25%). Différentes plaques contenant du lactate (40 mM) et un accepteur d'électrons sous forme de particules d'oxydes métalliques MnO₂ ou Fe(OH)₃ à différentes concentrations, sont inoculées avec une souche de MR-1 sous la forme d'une goutte de 8 µL positionnée au centre de la plaque. Les résultats ont montré qu'en présence de particules de MnO₂ ou Fe(OH)₃, MR-1 se déplace au-delà de la zone d'inoculation avec une vitesse qui dépend fortement de la concentration en particules d'oxydes métalliques (Li et al., 2012). En reproduisant les mêmes expériences, mais en ajoutant des riboflavines (200 nM) au sein du milieu gélifié qui contient les particules métalliques, ils ont remarqué que la vitesse de déplacement de MR-1 a considérablement augmenté, de 0.008 cm/h à 0.067 cm/h. Li *et al.* ont ainsi mis en évidence que les flavines sécrétés par MR-1 jouent un rôle dans la taxie de MR-1 vers des accepteurs insolubles d'électrons (Li et al., 2012). Ils ont alors proposé un mécanisme pour expliquer cette taxie. Selon eux, MR-1 sécrèterait des flavines sous forme réduite qui diffusent dans le milieu. Lorsque les flavines entrent en contact avec la surface d'un accepteur insoluble d'électrons, elles sont oxydées ce qui provoque un gradient redox au sein du milieu et induit le déplacement par énergie taxie de MR-1 vers le composé insoluble.

Récemment, Kim *et al.*, ont également observé un déplacement de MR-1 sous l'effet d'un gradient de riboflavine dont la vitesse est accélérée en condition anaérobie (Kim et al., 2016). Ces résultats viennent renforcer le mécanisme proposé par Li et al. invoquant le phénomène d'énergie taxie qui utiliserait des flavines pour déployer un gradient redox vers les molécules insolubles d'intérêt.

Cependant Nealson et al., suggèrent que le gradient de Mn(II) résultant de la réduction de MnO₂ par MR-1 à la surface des particules provoquerait un déplacement par chimiotaxie de MR-1 vers les composés insolubles (Nealson et al., 1995). La même équipe a poursuivi ses recherches sur la taxie de MR-1 mais cette fois vers des micro-électrodes en fibre de carbone polarisées à 600 mV vs. Ag/AgCl. Cette valeur de potentiel a été choisie de sorte à reproduire le potentiel redox des particules de MnO₂ utilisées dans les expériences précédentes. Les résultats ont montré un déplacement de MR-1 presque similaire à celui observé précédemment vers les particules de MnO₂. D'autres valeurs de potentiel ont été expérimentées. Pour des potentiels inférieurs à 500 mV vs. Ag/AgCl aucune réponse n'a été observée, tandis que les meilleures réponses ont été mesurées pour une gamme de potentiels comprise entre 550 et 800 mV vs. Ag/AgCl. Les expériences ont été reproduites en utilisant des mutants de MR-1 déficients de gènes responsables du transfert extracellulaire d'électrons. Les réponses ont alors toutes été négatives (aucun déplacement), aucun déplacement ni vers des particules de MnO₂, Fe(OH)₃ ni vers les électrodes polarisées n'a été constaté. Ces résultats démontrent le rôle central/indispensable des transferts extracellulaires d'électrons dans le déplacement de MR-1 vers des accepteurs insolubles d'électrons, incluant des électrodes (Harris et al., 2010).

Nealson et al., finirent par proposer un mécanisme différent de celui de Li *et al.* Selon les auteurs, l'accumulation de MR-1 autour des accepteurs insolubles d'électrons s'expliquerait par ce qu'ils appellent la « congrégation ». Ce mécanisme serait initié lorsque MR-1 rencontre, au hasard, un accepteur d'électrons insoluble. Il s'en suit un transfert d'électrons entre la bactérie et la surface de l'accepteur d'électrons. Ce transfert induit un changement dans le comportement de nage qui permet aux bactéries de rester à proximité de l'accepteur insoluble d'électrons. Avec le temps, cette congrégation conduit à l'adhésion des bactéries et à la formation du biofilm (Harris et al., 2010).

Bencharit et al., ont observé une réponse électro-tactique de *Shewanella oneidensis* MR-1 pour des accepteurs d'électrons métalliques de type Fe(III) et Mn(III). Ils avancent que *S. oneidensis* est capable d'énergie taxie lorsque les métaux sont sous leur forme oxydée (Fe III et Mn III) et de chimiotaxie sous leur forme réduite (Fe II et Mn II) (Bencharit and Ward, 2005).

Bien que la taxie de MR-1 ait fait l'objet de plusieurs travaux, la question de savoir comment les bactéries localisent et migrent vers des accepteurs insolubles d'électrons, et notamment vers les électrodes, n'a pas encore été totalement résolue. L'observation de certains flocs de MR-1 au voisinage des électrodes polarisées laisse penser que les bactéries seraient capables de « sentir » (dans le sens détecter) un champ électrique (Oram and Jeuken, 2017). Il a donc été choisi de diriger la recherche bibliographique vers ce possible phénomène de migration des bactéries en réponse à un champ électrique.

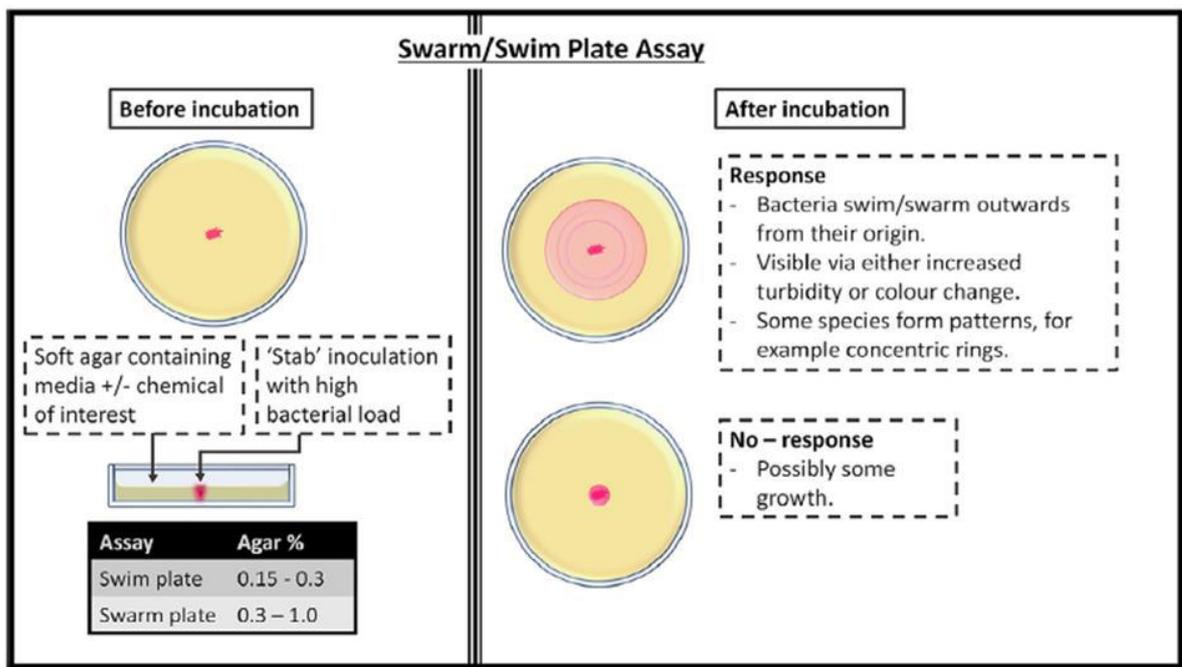


Figure 21 : Illustration de la méthode « Swarm/swim plate assay » utilisée pour étudier la taxie de *Shewanella oneidensis* MR-1 (schéma de (Oram and Jeuken, 2017)).

5.2 Electrotaxie - galvanotaxie

La galvanotaxie ou électrotaxie, les deux termes semblent équivalents, est définie comme étant le mouvement d'un organisme ou d'une cellule mobile en réponse à un courant ou champ électrique (Adler and Shi, 1988; McCaig et al., 2005; Mycielska and Djamgoz, 2004). Cette migration peut se faire vers l'anode ou vers la cathode. A notre connaissance les premières mises en évidence de ce phénomène auraient été réalisées par des chercheurs allemands à la fin du 19^{ème} siècle (Ludloff, 1895; M. Verwoorn, 1896; Verwoorn M., 1889).

Un grand nombre d'eucaryotes sont capables de galvanotaxie : des protozoaires tels que *Paramecium* (Bancroft, 1906; Dryl and Grębecki, 1966; Kamada, 1929), *Tetrahymena vorax* (Brown

et al., 1981), des cellules épithéliales (Guo et al., 2010), endothéliales (Zhao et al., 2004), des cellules cancéreuses (Djamgoz et al., 2001; Huang et al., 2009), des leucocytes (Lin et al., 2008) ou encore l'amibe *Dictyostelium* (Sato et al., 2009, 2007). Plusieurs postulats sont émis quant aux mécanismes responsables de la détection des signaux électriques chez les cellules eucaryotes : les canaux ioniques assurant le transfert transmembranaire des ions Ca^{2+} et Na^+ , la signalisation cellulaire ou encore l'électromigration des récepteurs de surface cellulaires semblent être les processus impliqués dans l'électrotactisme chez les eucaryotes (Djamgoz et al., 2001; McCaig et al., 2005; Mycielska and Djamgoz, 2004; Shanley et al., 2006; Trollinger et al., 2002).

En revanche, l'électrotaxie est très peu étudiée chez les procaryotes. Il semble que la première observation avec une bactérie ait été effectuée par Verwon en 1889. Il nota que certaines bactéries exposées à un champ électrique migraient vers l'anode tandis que d'autres se dirigeaient vers la cathode (Verwon M., 1889). Quelques autres études de galvanotaxie avec différents procaryotes ont suivi: *Bacillus et Bacterium termo* (Abbott and Life, 1908), des *cyanobacteria* (Häder, 1977; Murvanidze and Glagolev, 1982), *Escherichia coli* et *Salmonella typhimurium* (Adler and Shi, 1988; Shi et al., 1996). Toutefois, les mécanismes impliqués dans la galvanotaxie des bactéries restent encore non élucidés. Seule l'équipe d'Adler et Shi. ont tenté d'élucider ce mystère (Adler et Shi 1988; Shi, Stocker, et Adler 1996). Ils ont suggéré que les procaryotes et les eucaryotes puissent avoir des mécanismes et des fonctions de galvanotaxie totalement différents. D'après eux, il est probable que la galvanotaxie soit purement un phénomène physique sans aucune implication « volontaire » ni mécanisme actif de la bactérie à l'inverse des eucaryotes.

Adler et Shi ont choisi *Escherichia coli* et *Salmonella typhimurium* comme espèces bactériennes modèles car les connaissances de la biochimie et du code génétique (génomique) de ces bactéries étaient à l'époque (1988) très avancées. Le comportement galvanotactique des bactéries a été observé à l'aide du montage expérimental illustré sur la Figure 22.

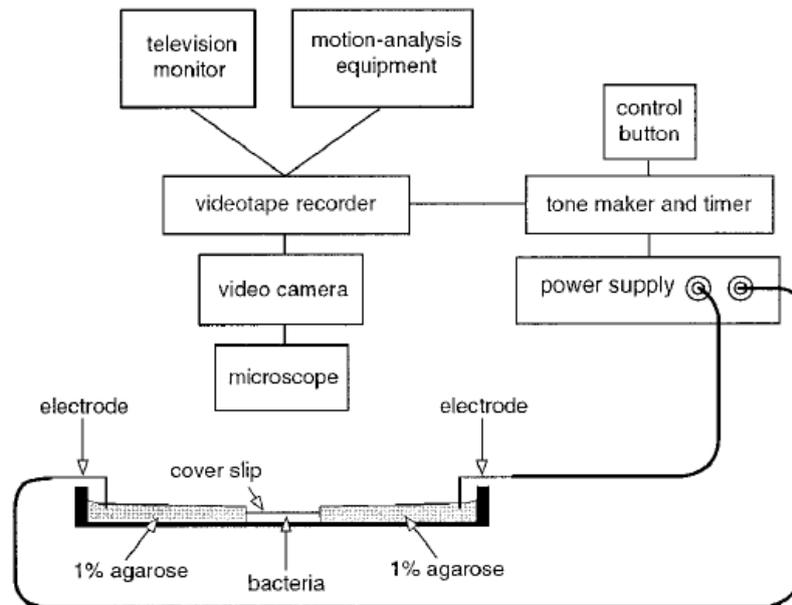


Figure 22 : Montage expérimental utilisé par Adler et Shi pour étudier la galvanotaxie chez *E. coli* et *S. typhimurium* (tiré de (Shi et al., 1996)).

Les bactéries sont insérées dans un petit compartiment (2 cm x 2.5 cm x 1 mm) contenant un mélange de tampon phosphate ($5 \cdot 10^{-3}$ M, pH 7) et d'EDTA (10^{-4} M) positionné au centre d'une boîte de Pétri remplie de gel d'agarose (1%). Deux fils de platine reliés à une alimentation externe sont positionnés aux deux extrémités de la boîte de Pétri pour l'application d'un champ électrique de $3 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$. Le déplacement des bactéries est suivi grâce à un microscope.

En l'absence de courant électrique les bactéries nagent dans des directions totalement aléatoires (Figure 23, gauche). Avec application d'un champ électrique, une trajectoire rectiligne est observée et *E. coli* migre exclusivement vers l'anode à une vitesse de $10 \mu\text{m} \cdot \text{sec}^{-1}$ alors que *S. typhimurium* migre vers la cathode à une vitesse similaire (Figure 23, centre). Suite à l'inversion de la polarité du champ électrique, chaque espèce migre dans la direction opposée (Figure 23, droite).

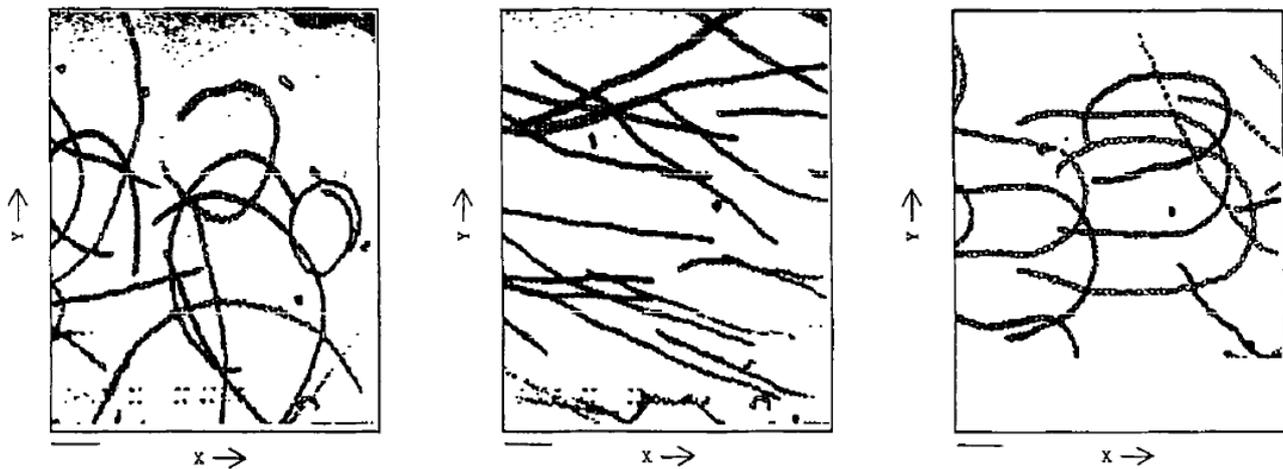


Figure 23 : Observation du comportement de *E. coli* en absence (gauche), en présence (centre) et après inversion (droite) d'un champ électrique de $3V.cm^{-1}$ (Barre = $7\mu m$) (tiré de (Adler and Shi, 1988)).

Ces observations mettent en évidence un phénomène de galvanotaxie chez *E. coli* et *S. typhimurium* avec en outre un résultat très intéressant. Les deux espèces ne vont pas vers la même électrode et après l'inversion du champ électrique (Figure 23, droite) les bactéries suivent une trajectoire en forme de U pour se diriger dans la direction opposée. Les bactéries sembleraient donc se comporter comme un « dipôle permanent » c'est-à-dire avec un côté chargé négativement et un côté chargé positivement. Apparemment le champ électrique ne perturbe pas cette répartition de charges à la surface des bactéries (Adler and Shi, 1988).

Par la suite, Adler et Shi ont tenté d'identifier les mécanismes responsables de la galvanotaxie en créant plusieurs mutants d'*E. coli*, en déléant dans un premiers temps les différents gènes responsables de la chimiotaxie (récepteurs et protéines), puis dans un second temps les gènes impliqués dans la mobilité.

Tous les mutants d'*E. coli* déficients en gènes de la chimiotaxie ont continué à fournir une réponse positive à la galvanotaxie (migration vers l'anode) ce qui signifie que le mécanisme de la galvanotaxie est totalement indépendant de celui de la chimiotaxie chez *E. coli*.

Les autres mutants d'*E. coli*, pour lesquels les flagelles ont été paralysés ou supprimés et qui par conséquent ne peuvent pas se mouvoir, se sont alignés suivant les lignes de courant et, après l'inversion du champ électrique, les cellules se sont tout simplement retournées. Des tests similaires sur des souches mutantes de *Klebsiella planticola* rendues non mobiles ont montré le même alignement en présence d'un champ électrique. Cependant, les cellules ne se sont pas retournées à

l'inversion du champ. Ces résultats combinés permettent de déduire que dans un champ électrique, les bactéries avec ou sans flagelle adoptent un comportement similaire à celui d'un dipôle fixe (un côté – et un côté +) et que le retournement des cellules requière des qualités structurelles spéciales encore non identifiées à l'époque.

Plus tard, la même équipe d'Adler et Shi a pu établir une corrélation entre la direction de la galvanotaxie et la structure de surface d'une cellule (Shi et al., 1996). La surface de la plupart des bactéries est majoritairement composée de lipopolysaccharide (LPS) dont la structure présente :

- l'antigène O spécifique d'une espèce à une autre (O polysaccharide pour *E.coli* et *S.typhimurium*),
- le noyau oligosaccharidique qui est riche en charges négatives, par exemple phosphate et acide 3-désoxy-D-manno-oct-2-ulosonique (KDO),
- le lipide A.

Les bactéries possédant des O polysaccharides (polymères) à leur surface sont qualifiées de bactéries S (pour smooth) et les bactéries R (pour rough) sont celles qui n'en possèdent pas.

Adler et Shi ont remarqué qu'en fonction de leur composition de surface, les bactéries se dirigeaient vers l'anode (bactéries R) ou la cathode (bactéries S). En mesurant les mobilités électrophorétiques passives des deux catégories de bactéries (R et S) vers l'anode ils se sont également rendu compte que les R avaient les valeurs les plus élevées ($2.1 \text{ à } 2.9 \cdot 10^{-8} \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) que les S faibles ($0.5 \text{ à } 0.7 \cdot 10^{-8} \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) (Shi et al., 1996). Par conséquent, un changement dans les valeurs de mobilités électrophorétiques serait accompagné d'un changement de la direction galvanotactique. Les auteurs suggèrent que la bactérie doit être constituée de deux composants distincts :

- le corps bactérien dont la mobilité électrophorétique est déterminée par sa composition de surface (avec ou sans O polysaccharides)
- le flagelle dont la mobilité électrophorétique est déterminé par les charges de surface.

Weibull *et al.* ont démontré que le flagelle de *Proteus vulgaris* a une migration vers l'anode lorsqu'il est soumis à un champ électrique (Weibull Claes, 1950). De ce fait, ils émettent l'hypothèse qu'il en est de même pour les flagelles d'*E.coli* et *S. typhimurium* et que la mobilité électrophorétique du flagelle est comprise entre celle des R et des S.

Selon leur hypothèse :

- Dans le cas d'une bactérie S (avec O polysaccharides), les polymères recouvrent les groupements de charges négatives présents à la surface du corps bactérien, le rendant ainsi « moins négative » que son flagelle. Par conséquent, la mobilité électrophorétique passive du corps bactérien devient plus faible que celle du flagelle. La cellule sera donc orientée dans le champ électrique de façon à ce que le flagelle soit du côté de l'anode. Avec cette orientation, le flagelle propulse la cellule dans la direction opposée, soit vers la cathode.

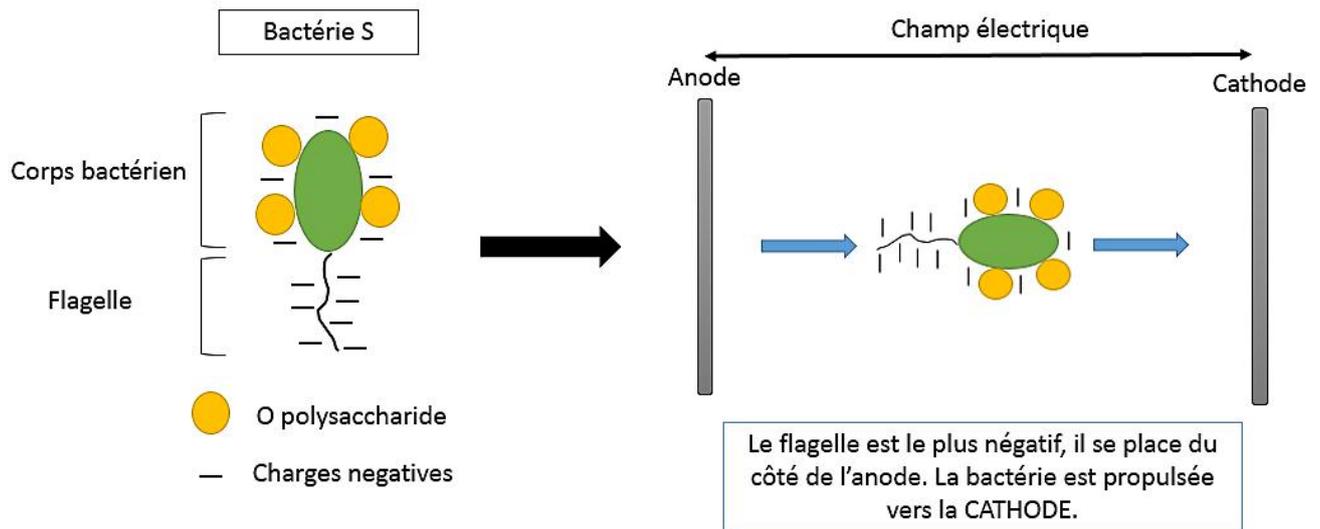


Figure 24 : Représentation schématique de la migration d'une bactérie S dans un champ électrique.

- Dans le cas d'une bactérie R (sans O polysaccharides), le corps bactérien présente davantage de charges négatives que son flagelle par conséquent sa mobilité électrophorétique vers l'anode est supérieure à celle de son flagelle. Ce dernier va se retrouver du côté de la cathode, propulsant ainsi la cellule vers l'anode.

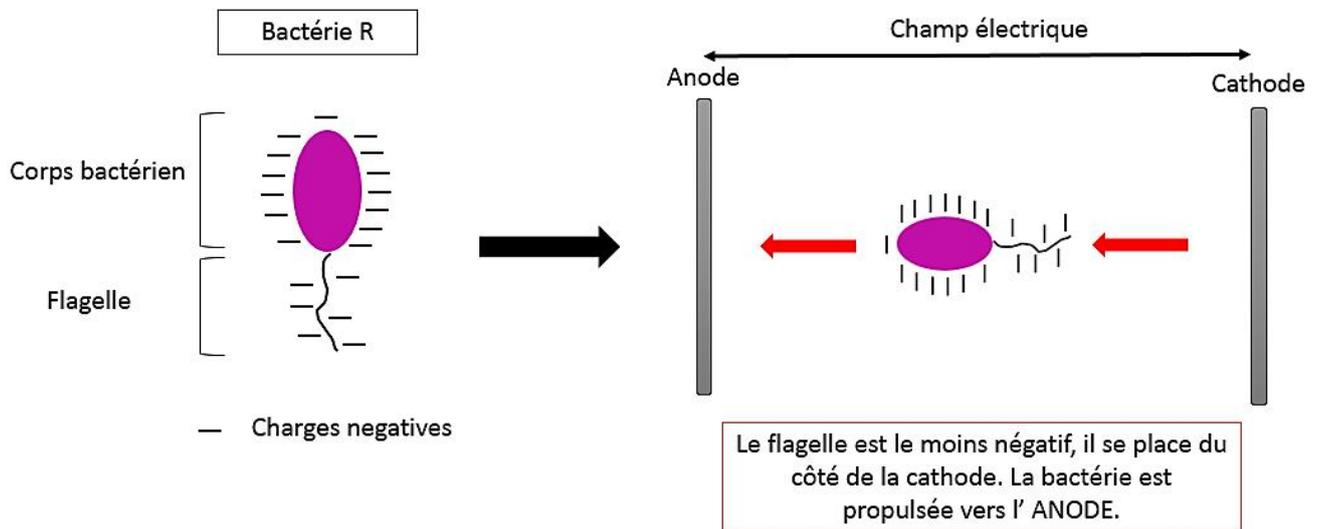


Figure 25 : Représentation schématique de la migration d'une bactérie R dans un champ électrique.

En résumé, la bibliographie donne quelques exemples de taxie de bactéries EA vers des accepteurs d'électrons insolubles qui peuvent être des électrodes. Les mécanismes invoquent de l'énergie-tactisme, dû au gradient redox établi par un composé sécrété par la cellule, ou du chimiotactisme, dû au gradient de concentration d'un composé.

La réponse directe de bactéries à un champ électrique par galvanotaxie ou électrotaxie n'a été que rarement étudiée. En effet, d'abondantes études font état des capacités d'électrotactisme d'eucaryotes. De nombreux mécanismes ont été proposés dans ce contexte, faisant intervenir des processus de détection et signalisation cellulaires, mais beaucoup moins de travaux se sont attachés à comprendre ce qui se passe chez les procaryotes. Pour les bactéries, il semblerait que la réponse à un champ électrique soit le résultat d'un processus passif de migration, La bactérie est orientée dans le champ électrique en fonction de la répartition et de la quantité de charges négatives respectives du corps bactérien et du flagelle et elle se dirige ainsi vers l'anode ou la cathode sous l'effet de la propulsion du flagelle. En somme, le champ électrique est responsable de l'orientation des cellules bactériennes et le flagelle assure le déplacement. La rareté des études est une incitation supplémentaire à aborder ce sujet dans la seconde partie des travaux de thèse.

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

1	INOCULA MICROBIENS ET MILIEU SYNTHETIQUE	101
1.1	Préparation du lixiviat de terreau	101
1.2	Formation de la bioanode primaire	102
1.3	Milieu synthétique.....	102
2	DISPOSITIFS EXPERIMENTAUX.....	103
2.1	Montage électrochimique à trois électrodes.....	103
2.1.1	Electrodes de travail support de biofilms EA	104
2.1.2	Dispositif « canal »	105
2.1.3	Dispositif « multi-pores »	106
2.1.4	Electrode de référence et contre-électrode.....	107
2.1.5	N-stat.....	108
2.2	Montage électrochimique à 2 électrodes	108
2.3	Réacteurs électrochimiques.....	109
3	TECHNIQUES D'ANALYSES	113
3.1	Techniques électrochimiques	113
3.1.1	Chronoampérométrie	113
3.1.2	Voltammétrie cyclique.....	114
3.2	Dosage enzymatique de l'acétate	114
3.3	Techniques microscopiques	115
3.3.1	Microscopie à épifluorescence.....	116
3.3.2	Microscopie électronique à balayage.....	117
3.3.3	Analyse par diffraction électronique (EDX).....	119
3.4	Analyse des populations bactériennes par pyroséquençage.....	119

1 INOCULA MICROBIENS ET MILIEU SYNTHETIQUE

Au cours de ses travaux de thèse, la source de microorganismes utilisée pour former les biofilms électroactifs est du terreau de jardin. Une thèse antérieure réalisée au LGC (Pocaznoi, 2012) a en effet déjà établi que le terreau de jardin *Lombri-compost* de la marque Or-Brun (Tableau 1) est une source de microorganismes électroactifs qui permet d'obtenir des densités de courant élevées et reproductibles ($\sim 20 \text{ A.m}^{-2}$). Dans le cadre de ma thèse, deux types d'inocula différents, tous les deux préparés à l'origine à partir du terreau de jardin, ont été utilisés : un lixiviat de terreau et une bioanode primaire. Les procédures de fabrication du lixiviat de terreau et de formation d'une anode primaire sont détaillées par la suite.

Tableau 1 : Composition et caractéristiques du terreau de jardin *Lombri-compost* (Or-Brun).

Composition	Caractéristiques (*en % de masse sur produit brut)
Fumier de bovin	Matière sèche : 44* Matière organique : 26* Azote total : 0.65* Azote organique non uréique : 0.6* Rapport C/N total : 20

1.1 Préparation du lixiviat de terreau

La préparation de l'inoculum « lixiviat de terreau » est faite selon la méthode décrite dans la thèse de Manon Oliot (2017) : 1.5 L de terreau de jardin sont mélangés avec 2.25 L d'une solution à 60 mM de KCl. Ce mélange est agité durant une nuit à température ambiante avant d'être filtré à l'aide d'un textile en coton à large maille (serpillère) vendu dans le commerce. La conductivité du milieu « lixiviat de terreau » est de l'ordre de 0.8 à 1 S.m⁻¹ pour un pH d'environ 7.6. Après transfert dans les réacteurs électrochimiques, le lixiviat de terreau est systématiquement complété par 20 mM d'acétate de sodium utilisé comme substrat anodique pour l'ensemble des travaux de thèse présentés dans ce manuscrit.

1.2 Formation de la bioanode primaire

Une bioanode primaire (ou bioanode de 1^{ère} génération) est une bioanode déjà formée que l'on utilise comme inoculum pour former une nouvelle génération de bioanodes dites alors « bioanodes secondaires » (ou bioanode de 2^{nde} génération). Pour la formation de la bioanode primaire, un système électrochimique à 3 électrodes est utilisé dans un réacteur électrochimique « standard » (décrit à la section 2.3.1). La bioanode primaire est obtenue après polarisation d'une électrode de travail en tissu de carbone à -0.2 V par rapport à une électrode de référence au calomel saturée dans du lixiviat de terreau pendant plusieurs jours à 40°C. Avant la polarisation, un bullage d'azote est effectué dans le réacteur pendant 10 minutes pour éliminer toute trace d'oxygène. De l'acétate de sodium (20 mM) est ajouté dans le milieu au t0 de la polarisation puis à chaque fois que la densité de courant relevée sur la bioanode tend vers zéro (période correspondant à une carence en acétate). La polarisation est maintenue jusqu'à l'obtention d'une densité de courant stable de 20 A.m⁻² soit généralement au bout de 20 jours. La bioanode primaire est ensuite transférée dans un second réacteur rempli d'un milieu synthétique afin de servir d'unique source de microorganismes pour former une ou plusieurs bioanodes secondaires.

1.3 Milieu synthétique

Le milieu synthétique est constitué d'une solution de tampon bicarbonate à 50 mM (pH 9) enrichie avec des solutions de macronutriments (10 mL.L⁻¹), de micronutriments (1 mL.L⁻¹) et de vitamines (1 mL.L⁻¹) dont les compositions sont fournies au Tableau 2. Ce milieu est ensuite complété par 60 mM de KCl, 20 mM d'acétate de sodium (substrat) et 20 mM de NaH₂PO₄ afin d'avoir un apport en phosphore nécessaire au bon développement microbien. Si nécessaire, le pH du milieu est ajusté à 7 par ajout d' HCl 1 M. La conductivité finale du milieu synthétique est de l'ordre de 1.2 à 1.3 S.m⁻¹.

Tableau 2 : Composition des solutions de macronutriments, micronutriments et vitamines.

Solution de micronutriments		Solution de vitamines	
FeCl ₂ , 4H ₂ O	2 g.l ⁻¹	Pyridoxine HCl	1 g.l ⁻¹
CoCl ₂ , 6H ₂ O	1 g.l ⁻¹	Acide nicotinique	0.5 g.l ⁻¹
MnCl ₂ , 4H ₂ O	0.5 g.l ⁻¹	Riboflavine	0.25 g.l ⁻¹
ZnCl ₂ , 2H ₂ O	0.05 g.l ⁻¹	Thiamine HCl	0.25 g.l ⁻¹
H ₃ BO ₃	0.05 g.l ⁻¹	Biotine	0.2 g.l ⁻¹
CuCl ₂ , 2H ₂ O	0.04 g.l ⁻¹	Acide folique	0.2 g.l ⁻¹
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ , 4H ₂ O	0.07 g.l ⁻¹	Cobalamine	0.01 g.l ⁻¹
NiCl ₂ , 6H ₂ O	1 g.l ⁻¹		
Na ₂ SeO ₃ , 5H ₂ O	0.16 g.l ⁻¹		
HCl 37%	2 mL.l ⁻¹		

Solution de macronutriments	
NH ₄ Cl	28 g.l ⁻¹
MgSO ₄ , 7H ₂ O	10 g.l ⁻¹
CaCl ₂ , 2H ₂ O	0.57 g.l ⁻¹

2 DISPOSITIFS EXPERIMENTAUX

2.1 Montage électrochimique à trois électrodes

L'étude de la formation des biofilms électroactifs a été conduite en utilisant un montage à trois électrodes. Ce montage est constitué d'une électrode de travail qui sert de support pour le développement du biofilm EA, d'une électrode de référence dont le potentiel reste fixe et d'une contre-électrode. Les montages à trois électrodes ont été immergés dans le lixiviat de terreau ou dans le milieu synthétique. Les travaux ont été réalisés dans des conditions électrochimiques contrôlées grâce à l'utilisation d'un potentiostat. Ce dernier permet le contrôle du potentiel de l'électrode de travail par rapport au potentiel de l'électrode de référence et/ou du passage du courant électrique entre l'électrode de travail et la contre-électrode. Un multipotentiostat de type VMP ou VSP (Biologic SA) piloté par un logiciel d'exploitation Ec-Lab (version 10.2) a été employé.

2.1.1 Electrodes de travail support de biofilms EA

Deux matériaux d'électrodes différents, avec des géométries de surface également différentes, ont été utilisés comme support pour la formation des biofilms électroactifs : du tissu de carbone (épaisseur 200 μm) fourni par PaxiTech SAS (Grenoble) et de l'acier inoxydable 316L (épaisseur 5 mm) fourni par Toul'inox (Muret) (Figure 4). La composition massique de l'acier est donnée dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Composition massique de l'acier inoxydable 316 L.

Alliage	Ni	C	Mn	Cu	Si	S	P	Mo	Cr	N
Acier inox 316L	10.69	0.03	1.41	0.33	0.33	0.02	0.04	2.10	17.09	-

Les électrodes en tissu de carbone sont utilisées sans traitement préliminaire. A l'inverse, les électrodes en acier inoxydable 316L sont d'abord nettoyées avant d'être utilisées. Dans un premier temps, elles sont immergées dans une solution 50/50 (v/v) d'acétone/éthanol sous agitation pendant 20 minutes puis rincées à l'eau distillée pendant 10 minutes. Cette première étape permet de dissoudre toutes traces de composés organiques à la surface des électrodes. Ensuite, les électrodes sont traitées dans un mélange d'acides contenant 2% volumique d'acide fluorhydrique et 0.5 M d'acide nitrique puis rincées abondamment à l'eau pendant 10 min. Enfin, les électrodes sont utilisées immédiatement après le nettoyage.

Pour les électrodes en tissu de carbone, la connexion électrique est assurée via un fil de platine (diamètre 1 mm) enfilé sur toute la longueur du tissu. Avant utilisation, le fil de platine est préalablement nettoyé à la flamme d'un bec bunsen. Pour les électrodes métalliques, une tige filetée en titane (diamètre 2 mm) est vissée sur l'acier. La tige est d'abord nettoyée avec du papier abrasif pour retirer les couches d'oxydes puis rincée à l'eau avant d'être utilisée.

Au cours de ses travaux de thèse, les électrodes de travail ont été utilisées « libres » ou parfois « confinées » dans des dispositifs expérimentaux spécifiquement élaborés pour les besoins de la thèse : le dispositif « canal » (décrit à la section 2.1.2) et le dispositif « multi-pores » (décrit à la section 2.1.3).

2.1.2 Dispositif « canal »

Le dispositif « canal » (ou DC) a été fabriqué en deux versions : l'une utilisant comme électrode de travail du tissu de carbone (DC carbone) et l'autre utilisant de l'acier inoxydable 316L (DC acier). Ces deux dispositifs permettent de modéliser expérimentalement un canal d'une hauteur h variable. La surface potentiellement colonisable par les micro-organismes est de 10 cm^2 (représentée en bleu sur la Figure 1 et la Figure 2).

Le **DC carbone** se compose de trois pièces distinctes (Figure 1): deux pièces en Téflon de forme parallélépipédique ($10 \text{ cm} \times 2.5 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$) et une électrode en tissu de carbone ($10 \text{ cm} \times 2.5 \text{ cm} \times 0.02 \text{ cm}$) sur laquelle un fil de platine propre a été enfilé sur toute la longueur. Chaque pièce en téflon a été percée de 14 trous de 4 mm de diamètre répartis de façon homogène comme présenté à la Figure 1. Un canal ($10 \text{ cm} \times 1 \text{ cm} \times h \text{ cm}$) a été usiné au centre de la pièce n°1 de téflon. Deux hauteurs h de canaux ont été testées : **1 et 5 mm**. Pour l'assemblage des trois pièces, le tissu de carbone est pressé entre les deux pièces en téflon via l'utilisation de 14 vis en plastique.

Une couche de vernis isolant (Electrofuge 200-ND, CRC Industries France SAS) est appliquée tout autour du dispositif au niveau des jonctions téflon/tissu de carbone. L'ensemble est ensuite séché dans une étuve à 40°C pendant une nuit avant d'être utilisé. Deux fils en acier 316L isolés par de la gaine thermorétractable et non connectés au montage sont fixés sur deux vis en plastique pour tenir le dispositif « canal ». La portion du fil de platine située en dehors du dispositif canal est isolée par de la gaine thermorétractable.

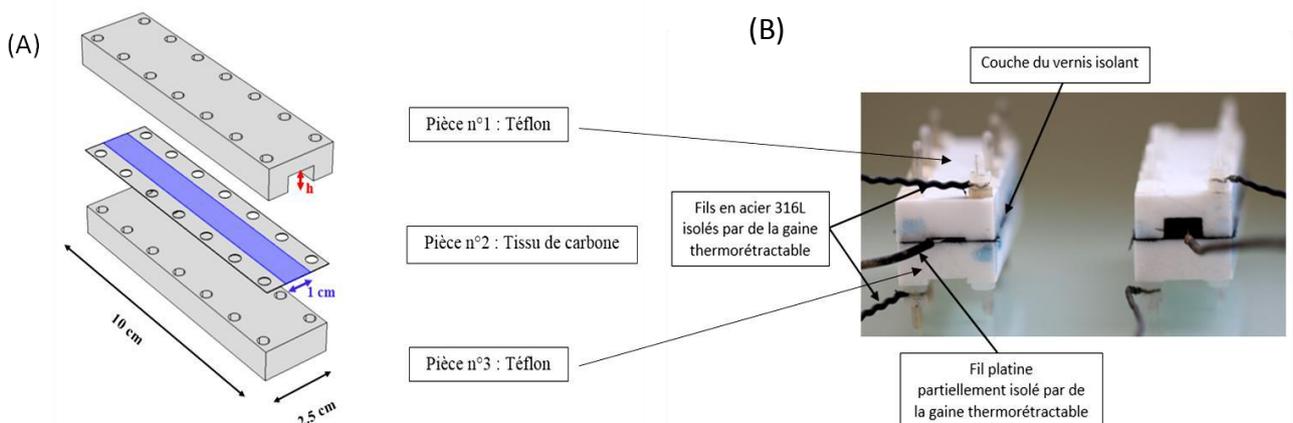


Figure 1 : Représentation schématique (A) et photographies (B) du dispositif « canal » en tissu de carbone ($h = 1$ et 5 mm).

Le **DC acier** est quant à lui constitué de deux pièces (Figure 2) : une pièce en téflon similaire à la pièce n°1 du DC carbone (10 cm x 1 cm x h cm) et une électrode en acier inoxydable 316L (10 cm x 2.5 cm x 0.3 cm) sur laquelle une tige en titane isolé par de la gaine thermorétractable a été vissée. Les deux pièces ont également été percées de 14 trous de diamètre 4 mm (Figure 2). Le DC acier a permis d'explorer une plus grande gamme de hauteur h de canaux : **5 mm, 1 mm, 500 μ m et 200 μ m**.

Les bords de l'électrode en acier ainsi que la face non exposée à la pièce en téflon sont d'abord isolées avec le vernis puis séché une nuit dans une étuve à 40°C. L'électrode est par la suite assemblée à la pièce en téflon grâce à des vis en plastiques. Une couche de vernis est de nouveau appliquée autour du dispositif au niveau des jonctions téflon/acier. L'ensemble est mis à séché à 40°C pendant une nuit avant d'être utilisé. Le dispositif « canal » est maintenu via deux fils en acier 316L isolés par de la gaine thermorétractable et non connectés au montage.

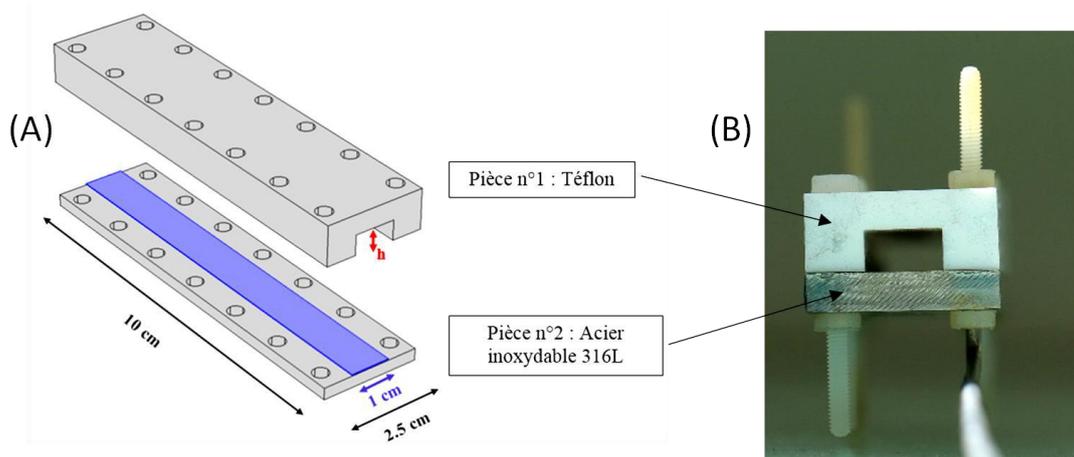


Figure 2 : Représentation schématique (A) et photographie (B) du dispositif « canal » en acier inoxydable 316L ($h = 5 \text{ mm}, 1 \text{ mm}, 500 \mu\text{m}$ et $200 \mu\text{m}$).

2.1.3 Dispositif « multi-pores »

Le dispositif « multi-pores » (ou DMP) a été élaboré afin de modéliser expérimentalement des pores dont le diamètre d'ouverture d est constant et dont la longueur ou profondeur l des pores est variable (Figure 3).

Le DMP est également un assemblage de trois pièces : les pièces n° 2 et n° 3 sont en tous points identiques à celles du DC carbone. La pièce n°1 (10 cm x 2.5 cm x l cm), toujours en téflon, a été perforée de 14 trous (diamètre 4 mm) au niveau des périphéries et de 90 trous (diamètre $d = 2 \text{ mm}$) au

niveau de la partie centrale. Les 90 trous sont répartis sur 3 lignes de 30 trous. Trois longueurs ℓ (ou profondeurs) de pores ont été expérimentées : **5, 10 et 24 mm**. Chaque longueur de pores a nécessité la fabrication d'une pièce n°1 en téflon spécifique. L'assemblage et la préparation du dispositif est similaire à ceux du DC carbone.

La surface potentiellement colonisable par les bactéries équivaut à 90 fois la surface d'un disque de 2 mm de diamètre soit au total $90 \times 0.031 = 2.8 \text{ cm}^2$.

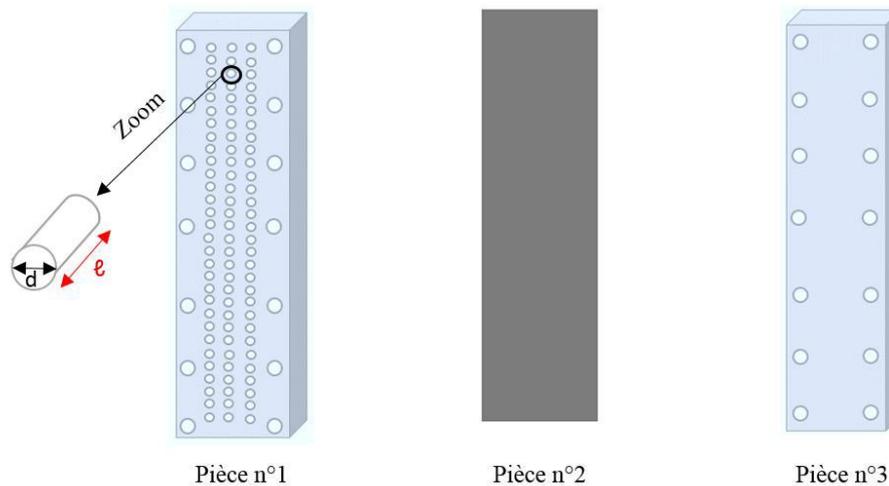


Figure 3 : Représentation schématique du dispositif « multi-pores » modélisant des pores de diamètre d fixe et de longueur ℓ variable ($d = 2 \text{ mm}$ et $\ell = 5, 10 \text{ et } 24 \text{ mm}$).

2.1.4 Electrode de référence et contre-électrode

Pour toutes les expériences, les électrodes de référence sont des ECS, c'est-à-dire des électrodes commerciales au calomel saturées en KCl (Radiometer). La valeur du potentiel d'une ECS par rapport à l'électrode standard à hydrogène est de +0.241 V à 25°C. Avant chaque expérience, le potentiel des électrodes de référence est contrôlé par rapport à une ECS neuve.

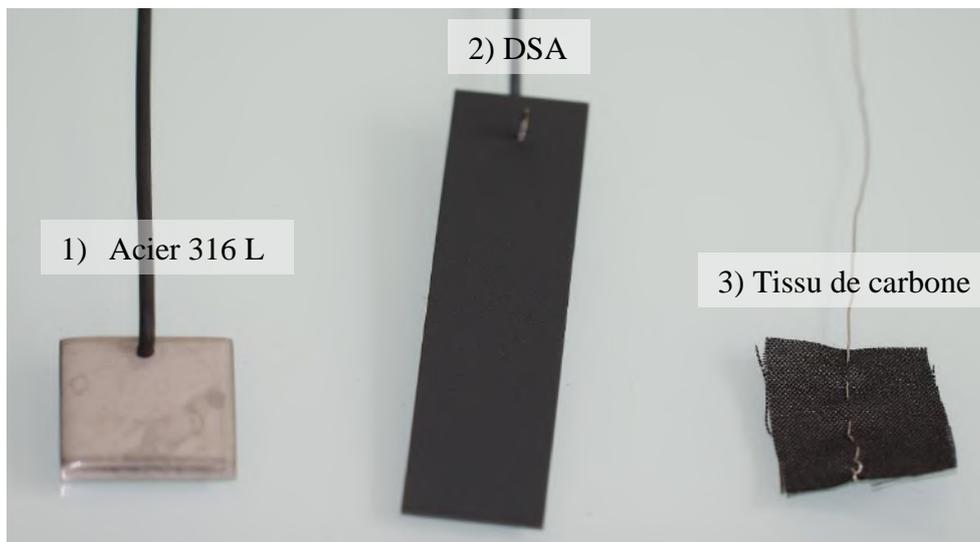
La contre-électrode (ou électrode auxiliaire) assure le passage du courant (balance de courant) et permet d'enregistrer le courant produit à l'électrode de travail. Des grilles de platine (Pt, 10% Ir, de Goodfellow) connectées à des fils de platine ou des grilles en acier inoxydable 316L connectées à des fils en acier ont été utilisées (Figure 4). Les grilles de platine sont préalablement nettoyées à la flamme d'un bec bunsen.

2.1.5 N-stat

La majorité des expériences ont nécessité la présence d'au moins deux électrodes de travail au sein du même réacteur donc dans le même milieu électrolytique. Un dispositif annexe au potentiostat dit N-stat a alors été employé. Il a permis de faire fonctionner indépendamment jusqu'à 4 électrodes de travail dans un même environnement avec des conditions rigoureusement contrôlables en présence d'une seule électrode de référence et une seule contre-électrode.

2.2 Montage électrochimique à 2 électrodes

Dans le chapitre 5 de ce manuscrit de thèse, des expériences ont nécessité l'application d'un champ électrique. Dans ce cas, un montage à deux électrodes (anode et cathode) a été employé. L'anode utilisée est une DSA (8 cm x 2 cm x 0.1 cm) et la cathode est en acier inoxydable 316L (3 cm x 3 cm x 0.3 cm) (Figure 4). Une différence de potentiel de 8 V est appliquée entre les deux électrodes distantes de 27 cm pendant 3 heures, ce qui correspond alors à un champ électrique de 30 V.m^{-1} .



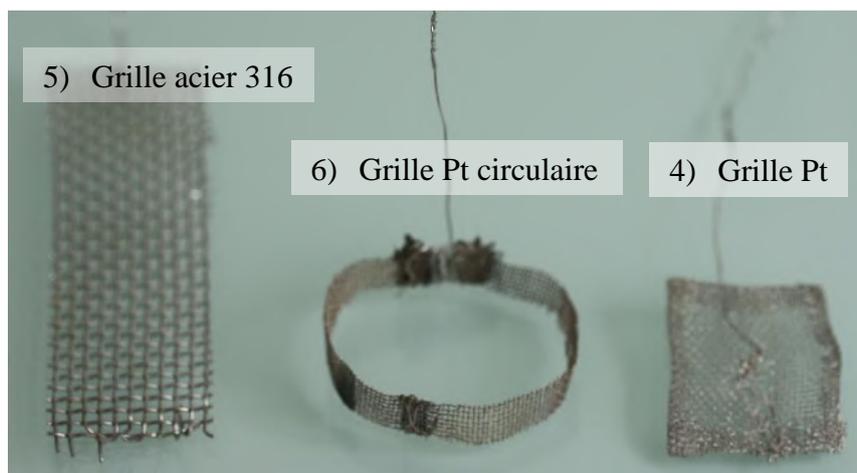


Figure 4 : Photographie de l'ensemble des électrodes utilisées lors de ce travail de thèse.

2.3 Réacteurs électrochimiques

Plusieurs configurations de réacteurs électrochimiques ont été utilisées avec un montage à 3 électrodes. Les réacteurs nommés « standards », « boîte à bonbons » et « multi-anode » sont des réacteurs à simple compartiment de volumes différents. Des réacteurs à « triple compartiments » ont également été employés. Les réacteurs ont tous été maintenus à 40°C grâce à l'utilisation d'un bain ou d'une étuve thermostatés. Au début de chaque expérience, un bullage d'azote est systématiquement réalisé dans chaque réacteur afin d'éliminer toutes traces d'oxygène, qui pourraient jouer un rôle, pour les bactéries EA, d'accepteur d'électrons concurrentiel de l'électrode.

Les réacteurs « **standards** » (Figure 5) sont des flacons en verre de type Schott à col large d'un volume de **700 mL**. Leurs couvercles - bouchons à visser - comportent 4 piquages de type GL18 servant à l'insertion de l'électrode de travail, de la contre-électrode et de l'électrode de référence. Le dernier piquage est réservé au bullage initial d'azote, aux prélèvements de solution pour doser l'acétate et aux ajouts d'acétate. Ces réacteurs ont essentiellement servi à former des bioanodes primaires.

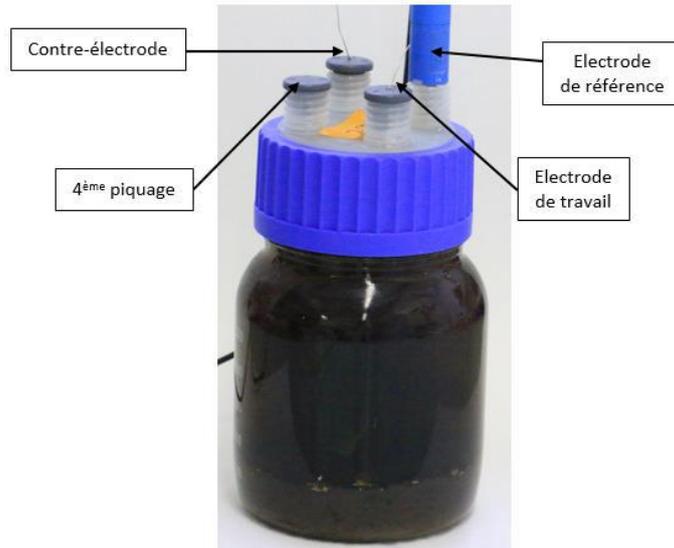


Figure 5 : Photographie d'un réacteur « standard » de 700 mL.

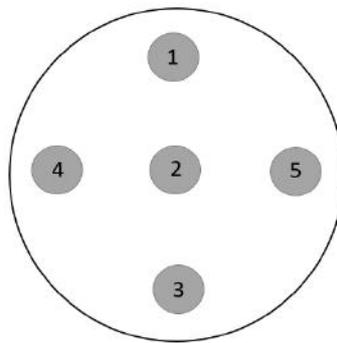
Les réacteurs « **boîte à bonbons** » (Figure 6) sont des bouteilles en verre de la forme d'une boîte à bonbon de volume **1.8 L**. Leurs couvercles sont identiques à ceux des réacteurs « standards ». Ces réacteurs ont été utilisés avec un N-stat pour polariser deux électrodes de travail en parallèle dans le même milieu réactionnel. Une bioanode primaire sert alors d'inoculum pour former les bioanodes secondaires placées par exemple dans un DC ou un DMP. Les 4 piquages ont alors tous été utilisés. Les prélèvements et les ajouts d'acétate ont été effectués via une aiguille et une seringue. L'aiguille a été systématiquement introduite près de la contre électrode. Un bullage initial d'azote pendant 20 minutes est effectué avec ces réacteurs.



Figure 6 : Photographie du réacteur « boîte à bonbon » de 1.8 L.

Les réacteurs « **multi-anodes** » (Figure 8) ont un volume utile plus important de **2.5 L** et sont fermés avec une bride métallique et couvercle en verre doté de 5 piquages. Un bullage initial d'azote de 35 minutes est réalisé au début des expériences. Ces réacteurs ont systématiquement été employés avec un N-stat pour permettre la polarisation individuelle (mais simultanée) de 3 (cas n°1) ou 4 (cas n°2) électrodes de travail en présence d'une seule électrode de référence et une seule contre électrode. Le cas n°2 a été utilisé pour les expériences avec les dispositifs « canaux » (chapitre 3). Le cas n°1 a été adopté pour les expériences avec les dispositifs « multi-pores » (chapitre 4).

Le positionnement des électrodes au sein d'un réacteur « multi-anodes » est décrit à la Figure 7:



Vue du dessus du couvercle d'un réacteur multi-anodes avec les 5 piquages.

Cas n°1 : 3 électrodes de travail

- 1 : Electrode de référence
- 2 : Contre-électrode
- 3 : Electrode simple (contrôle)
- 4 : DMP longueur x
- 5 : DMP longueur y

Cas n°2 : 4 électrodes de travail

- 1 : Electrode de référence
- 2 : Contre-électrode
- 2 : Bioanode primaire
- 3 : Electrode simple (contrôle)
- 4 : DC hauteur x
- 5 : DC hauteur y

Figure 7 : Positionnement des électrodes au sein d'un réacteur multi-anodes avec 3 (cas n°1) ou 4 (cas n°2) électrodes de travail.

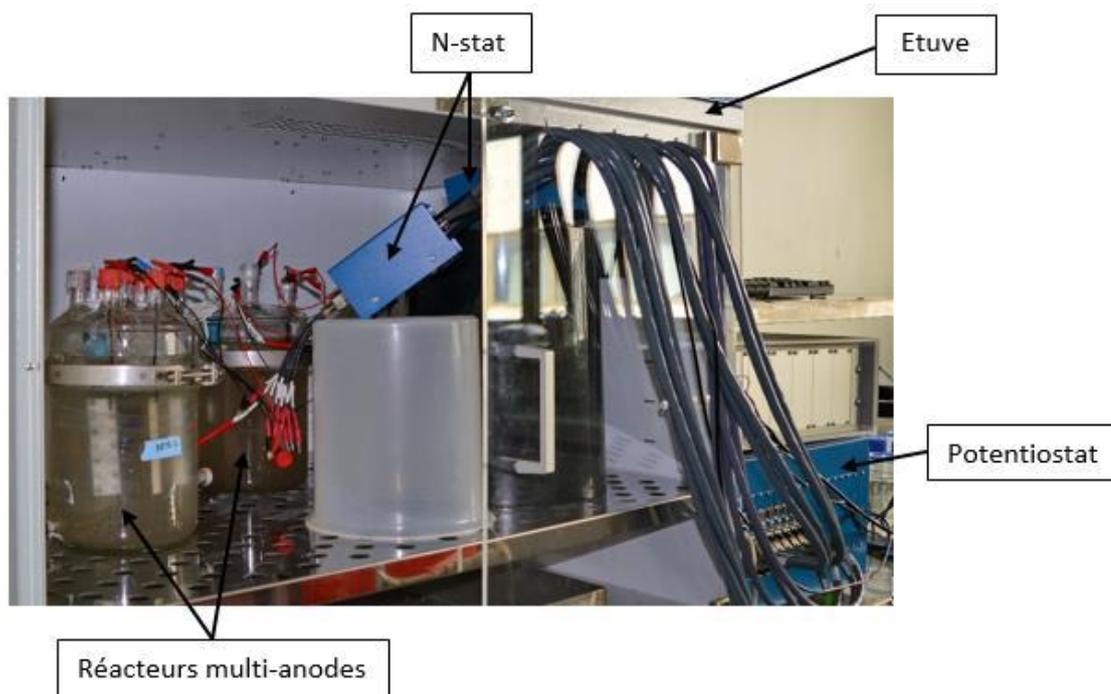


Figure 8 : Photographie de la mise en œuvre des réacteurs multi-anodes et des connectiques du système N-stat dans une étuve thermostatée.

Pour les réacteurs « **triple compartiments** » (Figure 9.A), trois bouteilles Schott de **700 mL** sont associées après qu'aient été réalisées les modifications en position latérale nécessaires à leur assemblage. Le compartiment central est séparé des deux autres compartiments par un système en sandwich (Figure 9.B) constitué (i) d'un joint circulaire en caoutchouc (diamètre 5 cm et épaisseur 5 mm, Midi Caoutchouc), (ii) d'un tissu de carbone de 7.5 cm^2 (diamètre 3 cm), (iii) d'un séparateur avec un seuil de rétention de $0.2 \mu\text{m}$ de 20 cm^2 (diamètre 5 cm, PALL) et enfin (iv) d'un second joint circulaire en caoutchouc (diamètre 5 cm et épaisseur 5 mm, Midi Caoutchouc). Un fil de platine est enfilé sur le tissu de carbone pour assurer la connexion électrique. Le tissu de carbone est plaqué au séparateur grâce aux deux joints. Le tissu de carbone est exposé au milieu du compartiment central.

Ces réacteurs ont été employés avec un montage à deux électrodes. Les électrodes sont placées dans les compartiments situés aux extrémités : l'anode en DSA ($3 \times 10 \text{ cm}^2$) est placée dans un compartiment extérieur et la cathode en acier inoxydable 316L ($3 \times 3 \text{ cm}^2$) dans l'autre. Un champ électrique de 30 V.m^{-1} est appliqué entre l'anode et la cathode. Lorsque nécessaire, une ECS et une grille en platine sont introduites dans le compartiment central afin de polariser simultanément, grâce à un N-stat, les deux tissus de carbone exposés au milieu réactionnel du compartiment central (Figure 9). Un bullage d'azote dans les deux compartiments extérieurs est maintenu tout au long de l'expérience.

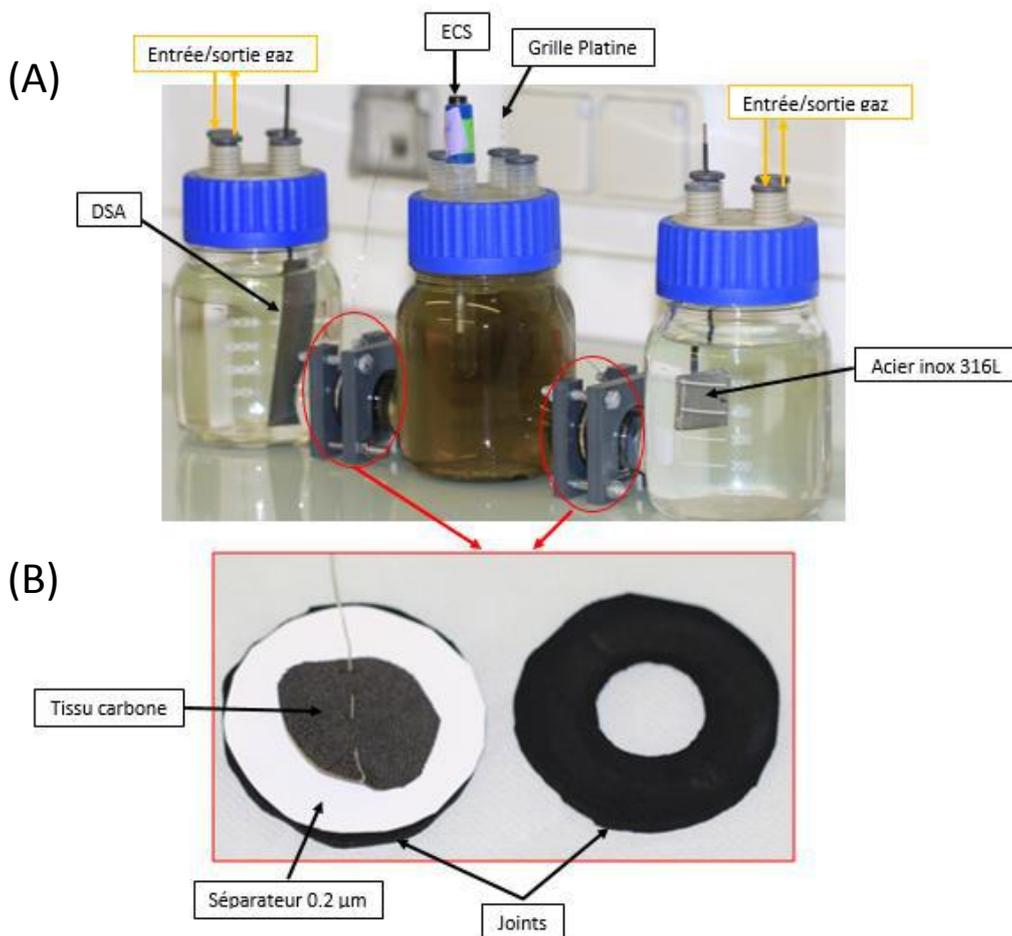


Figure 9 : Photographies du réacteur « triple compartiments » (A) et de l'assemblage joint-électrode-séparateur-joint (B) utilisé pour séparer les trois compartiments.

3 TECHNIQUES D'ANALYSES

3.1 Techniques électrochimiques

Deux techniques d'électroanalyse ont été employées au cours de cette thèse : la chronoampérométrie (CA) et la voltammétrie cyclique (CV).

3.1.1 Chronoampérométrie

La chronoampérométrie consiste à imposer à l'électrode de travail un potentiel fixe par rapport à l'électrode de référence et à mesurer ensuite la réponse en courant du système au cours du temps. Sauf précision contraire, les électrodes de travail ont été polarisées à -0.2 V vs ECS. Le courant électrique mesuré peut être exprimé en intensité (mA) ou en densité de courant ($A \cdot m^{-2}$), c'est-à-dire rapporté par rapport à la surface géométrique (projetée ou spécifique) de l'électrode de travail. Dans ce travail de

thèse, cette technique a été majoritairement appliquée pour former et suivre le développement du biofilm électroactif au cours du temps sur la surface des électrodes de travail.

3.1.2 Voltammétrie cyclique

La voltammétrie cyclique (CV) consiste à faire varier le potentiel de l'électrode de travail entre deux bornes de potentiel de façon réversible dans le sens de la réduction et de l'oxydation (cycle) et à enregistrer le courant électrique. La vitesse de variation du potentiel est communément appelée vitesse de balayage. Dans cette thèse, sauf indication contraire, la plage de potentiel balayée varie de -0.5 à +0.2 V vs ECS et la vitesse de balayage est fixée à $1 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Trois cycles successifs sont réalisés pour chaque analyse en CV. Généralement, la réponse en courant du premier cycle diffère légèrement des deux suivantes, qui, elles, se superposent très bien. Le deuxième cycle est alors celui qui est systématiquement représenté dans les chapitres de résultats de ce manuscrit. La plupart du temps, des CVs sont enregistrées à deux moments clefs : avant le démarrage de la chronoampérométrie (lorsque l'électrode n'est pas encore colonisée) et à la fin de la chronoampérométrie en présence d'acétate lorsque le biofilm EA s'est développé. Le terme de CV catalytique ou « turn-over » est utilisé lorsqu'une CV est réalisée sur une bioanode active en présence de substrat à oxyder dans le milieu (en présence d'acétate dans ces travaux). A l'inverse, en absence de substrat oxydable par le biofilm EA (déplétion d'acétate), le terme de CV non-catalytique ou « non turn-over » est employé.

3.2 Dosage enzymatique de l'acétate

Le kit enzymatique K-ACETAK (Megazyme, Libios) a été utilisé pour doser l'acétate. Ce kit contient trois solutions : une solution tampon (pH 7.4), une solution de cofacteur NADH, d'adénosine triphosphate (ATP) et de phosphoénolpyruvate (PEP) et une solution d'enzymes contenant de l'acétate kinase (AK), de la pyruvate kinase (PK) et de la D-lactate déshydrogénase (D-LDH). Trois réactions successives sont mises en jeu lors du dosage (Figure 10) : *i)* L'acide acétique et l'ATP échangent un groupement phosphate afin de former de l'acétylphosphate et de l'ADP. *ii)* Par la suite, l'ADP récupère un groupement phosphate auprès du PEP pour former de l'ATP et du pyruvate. *iii)* Enfin le pyruvate est hydrogéné en acide lactique par le cofacteur NADH, H⁺.

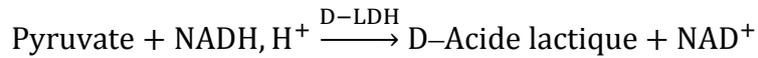
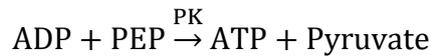
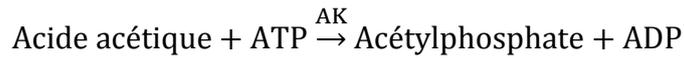


Figure 10 : Réactions mises en jeu lors du dosage de l'acétate avec le kit enzymatique K-ACETAK (Megazyme, Libios).

La méthode consiste en un dosage indirect de la quantité restante de NADH par absorbance à 340 nm (spectromètre JENWAY 7315) après 10 minutes de réactions. La concentration mesurée en NADH est inversement proportionnelle à la quantité d'acétate que l'on cherche à doser. L'étalonnage a été effectué à partir de solutions d'acétate de sodium de concentrations croissantes allant de 0 à 500 mg.L⁻¹ (Figure 11).

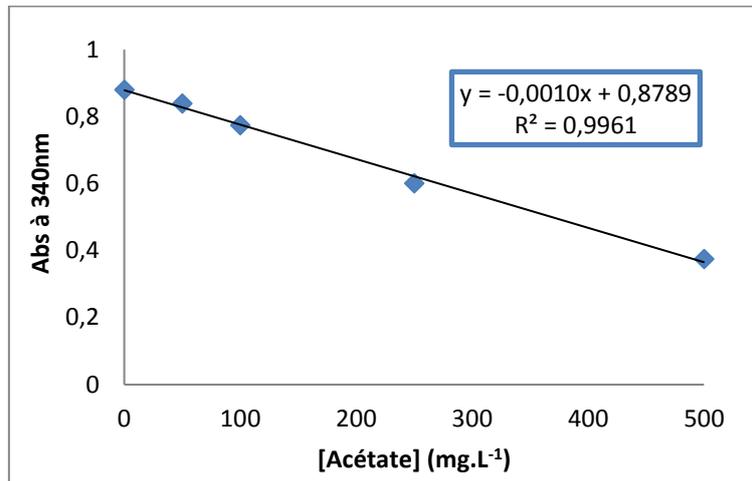


Figure 11 : Exemple de gamme étalon obtenue pour le dosage de l'acétate à l'aide du kit enzymatique K-ACETAK (Libios).

3.3 Techniques microscopiques

La couverture microbienne (ou colonisation) des bioanodes a été évaluée à deux échelles d'observation. La microscopie à épifluorescence a permis de visualiser la structure globale du biofilm bactérien à la surface des électrodes, de quantifier des biovolumes de biofilms, et d'évaluer la viabilité des bactéries. La microscopie électronique à balayage, quant à elle, a permis d'accéder à l'échelle des bactéries et ainsi apporter des renseignements sur la densité cellulaire et l'homogénéité des biofilms.

3.3.1 Microscopie à épifluorescence

Appareillage

Les biofilms ont été observés avec un microscope Carl Zeiss Axio ImagerM2 motorisé en Z et équipé avec une source de lumière (HBO 200) et un filtre Zeiss 09 (excitateur HP450-490, réflecteur FT-10, filtre barrière LP520). L'acquisition des images est réalisée avec une caméra monochrome numérique (Evolution VF). Avec l'aide du logiciel Zen, les images sont traitées pour obtenir des projections, des reconstructions 3D, le taux de recouvrement de l'électrode par le biofilm ou encore le biovolume des électrodes.

Préparation des électrodes

A la fin des expériences, les électrodes sont retirées des réacteurs puis marquées avec une solution de fluorochrome spécifique en fonction du type d'observation souhaitée.

Pour visualiser la répartition globale du biofilm (Figure 12.B), le fluorochrome employé est l'acridine orange à 0.01 % (A6014 Sigma). Ce marqueur est capable de traverser la membrane des cellules et de se fixer à l'ARN ou à l'ADN des cellules. Les caractéristiques d'excitation et d'émission ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{ém}}$) de l'acridine orange sont : 460/650 nm lorsqu'il se fixe sur l'ARN et 502/525 nm lorsqu'il se fixe sur l'ADN. Pour le marquage, les électrodes sont recouvertes de la solution d'acridine orange durant 10 minutes, puis rincées délicatement avec de l'eau physiologique et séchées à température ambiante pendant au moins 12 heures avant observation.

Pour évaluer la viabilité des bactéries, le LIVE/DEAD[®] BacLight[™] Bacterial viability kit (Molecular Probe) a été employé. Le principe repose sur une double coloration avec deux fluorochromes : le SYTO9 et le Propidium Iodide (PI). Après excitation à 470 nm, le SYTO9 émet une fluorescence de couleur verte (540 nm). Ce marqueur est capable de diffuser dans les cellules, intègres ou non, et d'émettre de la fluorescence verte après s'être fixé à l'ADN. Le SYTO9 permet donc de marquer la totalité des cellules de l'échantillon. Le Propidium Iodide (ou iodure de propidium en français) est un intercalant de l'ADN, après excitation à 470 nm ce marqueur émet une fluorescence rouge (635 nm) une fois lié à l'ADN. Le PI ne peut pénétrer dans les cellules que si les membranes sont altérées, par conséquent seules les cellules mortes fluorescent en rouge. Pour faciliter l'interprétation de nos observations, nous avons choisi de représenter les cellules mortes en orange sur nos photos afin de rendre le contraste entre les deux marqueurs plus visible (Figure 12.A). Une fois les électrodes sorties des réacteurs, elles sont entreposées dans une boîte à gant (système gonflable jetable) afin de réaliser les opérations (marquages, rinçages...) dans une atmosphère dépourvue de dioxygène. Les électrodes

sont d'abord immergées dans une solution de NaCl à 8.5 g.l^{-1} pendant 1 minute pour rinçage. Chaque électrode est ensuite mise en contact avec 2 mL de solution de marquage préalablement désaérée à l'azote pendant 5 minutes. La solution de coloration est préparée en ajoutant à 12 mL d'eau distillée : 18 μL de SYTO9 à 5 mM et 180 μL d'IP à 10 mg.mL^{-1} . Après deux heures d'incubation à température ambiante et dans l'obscurité, les électrodes sont rincées une première fois avec une solution de NaCl à 8.5 g.l^{-1} , puis avec de l'eau distillée. Les électrodes sont enfin séchées au moins 12 heures avant observation.

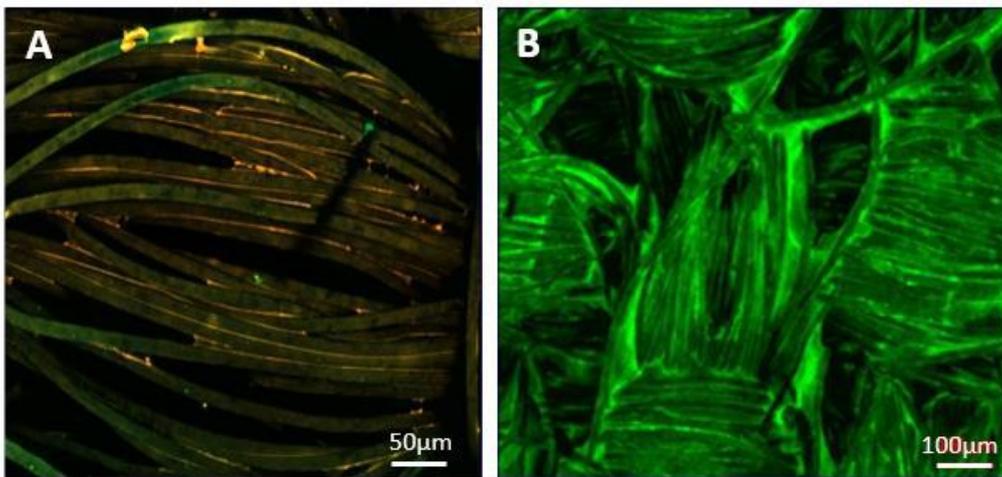


Figure 12 : Visualisation d'un biofilm EA sur tissu de carbone de 4 jours formé à partir d'une bioanode primaire et marqué au SYTO9 et au propidium iodide (A), et d'un autre biofilm EA, également sur tissu de carbone, de 20 jours formé à partir d'un lixiviat de terreau et marqué à l'acridine orange (B).

3.3.2 Microscopie électronique à balayage

Appareillage

Les observations ont été réalisées au Service d'Analyse et Procédé du Laboratoire de Génie Chimique avec un microscope électronique à balayage (Leo 435 VP-Carl Zeiss SMT) doté de diaphragmes de 30, 50 et 700 μm et avec l'aide très précieuse de Marie-Line de Solan.

Préparation des électrodes

Pour une observation en microscopie électronique à balayage, l'échantillon est bombardé d'électrons qui viennent s'intercaler dans les atomes de l'échantillon. Par la suite, des électrons secondaires sont émis et leur détection permet la retransmission d'une image de l'échantillon (Figure 13).

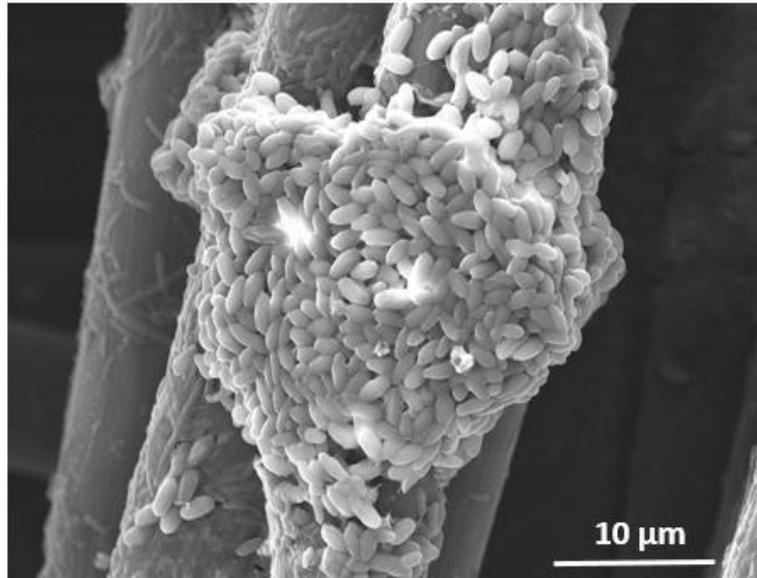


Figure 13 : Image MEB d'un biofilm électroactif de 7 jours formé à partir d'un lixiviat de terreau sur tissu de carbone au grossissement $\times 2500$.

Afin de pouvoir observer ce phénomène, l'échantillon doit subir en amont un traitement en trois étapes successives : une fixation, une déshydratation et une métallisation.

Fixation : les échantillons d'électrodes sont immergés pendant 20 minutes dans une solution contenant 1 volume de tampon phosphate (0.4 M, pH 7.4), 2 volumes de glutaraldéhyde à 4% vol et 1 volume d'eau distillée. Les échantillons sont ensuite rincés dans deux bains successifs de 15 minutes grâce à une solution composée de 1 volume de tampon phosphate (0.4 M, pH 7.4), 2 volumes de saccharose (0.6 M) et 1 volume d'eau distillée.

Déshydratation : la déshydratation des échantillons a été effectuée à l'acétone en plongeant les échantillons dans des solutions de plus en plus concentrée en acétone de la manière suivante : acétone 50% (5 minutes), acétone 70% (5 minutes), acétone 100% (30 minutes). Les échantillons sont ensuite plongés 30 minutes dans un mélange 50% acétone + 50% hexaméthylsilazane (HDMS) puis dans 100% HDMS jusqu'à évaporation totale du solvant.

Métallisation : les échantillons sont recouverts d'une nanocouche d'or (10/20nm) par pulvérisation cathodique à froid.

3.3.3 Analyse par diffraction électronique (EDX)

Le microscope électronique à balayage a également permis la quantification des différents éléments chimiques présents en surface d'un échantillon. Un faisceau d'électrons d'environ 20 kV de tension d'accélération (sonde Oxford) est appliqué sur l'échantillon. Ces électrons vont alors percuter les électrons des atomes présents dans l'échantillon et les exciter. En se désexcitant, les électrons des atomes émettent alors des photons à une longueur d'onde qui est caractéristique de chaque élément du tableau périodique. Un détecteur permet de mesurer l'intensité lumineuse pour chaque longueur d'onde. Il s'avère que cette intensité est proportionnelle au nombre d'atome émettant les photons, ce qui permet alors de connaître le nombre d'atomes présents dans l'échantillon.

3.4 Analyse des populations bactériennes par pyroséquençage

Préparation des échantillons

En fin d'expérience, les bioanodes sont retirées des réacteurs, rincées avec du milieu synthétique sans nutriments ni vitamines, puis stockées dans un tube falcon stérile de 50 mL avec 15 mL de solution stérile de tampon phosphate (10 mM, pH 7.3). Pour les milieux des réacteurs, un volume de 20 mL est prélevé et stocké dans un tube falcon stérile. Les tubes contenant les électrodes sont ensuite traités pour décrocher le biofilm de l'électrode. Dans un premier temps, les tubes falcon sont placés 30 minutes dans un bain à ultrasons (puissance 80 W) contenant de la glace afin d'éviter de chauffer les échantillons et d'altérer l'ADN. Après sonication, les tubes sont vortexés 1 minute afin de décrocher tout ce qu'il reste sur l'électrode. Chaque électrode est ensuite retirée du tube. Par la suite, les tubes falcon contenant les échantillons des milieux des réacteurs et ceux des bioanodes sont centrifugés à 4700 rpm pendant 8 minutes à 10°C. Chaque surnageant est ensuite délicatement prélevé et les culots sont stockés dans de la glace puis transportés dans les locaux du LGC à la faculté de pharmacie (site de Ranguel).

Extraction d'ADN, pyroséquençage et analyses bio-informatiques

L'extraction de l'ADN est effectuée à la faculté de pharmacie en collaboration avec Sophie Pecastaings et Alexis Simon. L'extraction d'ADN est réalisée en suivant le protocole du kit PowerBiofilm® DNA Isolation Kit (Mobio). L'ADN extrait est identifié avec un nom unique pour chaque échantillon et envoyé en express par voie postale au laboratoire américain Research and Testing Laboratory (RTLab) situé à Lubbock (Texas) Le pyroséquençage et le traitement bio-informatique ont été sous-traités à ce laboratoire. Le pyroséquençage consiste à déterminer l'ordre d'enchaînement des nucléotides, qui sont

les molécules de bases de l'ADN. Le traitement des données consiste d'abord à corriger les erreurs de séquençage et éliminer le « bruit ». Les séquences sont soumises à un nettoyage avec plusieurs niveaux de filtres (motifs répétés, taille minimale de séquences, nettoyage des extrémités de séquences de mauvaise qualité). Les séquences qui passent les filtres sont regroupées en groupe de séquences redondantes par clusterisation avec un taux d'homologie à 96%, avec l'algorithme USEARCH (Edgar, 2010). Toutes les séquences non redondantes (les singletons) sont mises de côté car elles présentent le risque de correspondre à des séquences artificielles (chimériques). Finalement, pour chaque cluster regroupant les séquences homologues est créé un fichier FASTA, interrogé contre une base de données issue du site NCBI (National Center for Biotechnology Information) en utilisant BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool nucleotidic). Basé sur le pourcentage d'identité entre la séquence et celle dérivée du BLASTn, l'identification est réalisée aux niveaux taxonomiques appropriés (un phylum, une classe, un ordre, une famille, un genre, une espèce) sur la base des critères suivants :

Scores d'identité des séquences	Niveaux taxonomiques
Inférieur à 77%	Non pris en compte (non identifié)
Entre 77% et 80%	Phylum
Entre 80% et 85%	Classe
Entre 85% et 90%	Ordre
Entre 90% et 95%	Famille
Entre 95% et 97%	Genre
Supérieur à 97%	Espèce

Une fois les résultats obtenus, chaque niveau taxonomique est analysé individuellement afin de déterminer les abondances relatives au sein de l'échantillon. Cela permet d'identifier les groupes bactériens dominants au sein de l'échantillon et de comparer les échantillons entre eux.

Chapitre 3 : Comportement des biofilms électroactifs à l'échelle d'un pore modèle

1	OBJECTIFS ET STRATEGIE D'ETUDE	125
1.1	Objectif.....	126
1.2	Choix de l'inoculum.....	126
1.3	Modélisation expérimentale d'un pore.....	127
2	TESTS PRELIMINAIRES	128
2.1	Configuration réacteur « boîte à bonbons »	128
2.2	Configuration réacteur « Multi-anodes »	130
3	RESULTATS OBTENUS AVEC LE DISPOSITIF « CANAL » EN TISSU DE CARBONE	132
3.1	Article « Microbial anodes: what actually occurs inside pores?»	133
3.2	Résultats complémentaires non présentés dans l'article	162
3.2.1	Profil de colonisation des électrodes simples (contrôles sans canal).....	162
3.2.2	Analyse des populations microbiennes	163
3.2.3	Analyse de la viabilité.....	174
3.3	Bilan	180
4	RESULTATS OBTENUS AVEC LE DISPOSITIF « CANAL » EN ACIER INOXYDABLE 316L.....	181
4.1	Résultats expérimentaux	182
4.2	Comparaison avec les électrodes en tissu de carbone dans le dispositif « canal »	188
4.3	Bilan	190
5	CONCLUSIONS DU CHAPITRE 3	191

1 OBJECTIFS ET STRATEGIE D'ETUDE

La revue bibliographique présentée à la section 1 du Chapitre 2 a mis en lumière l'importance de la taille des pores lors de l'élaboration d'une anode microbienne 3D poreuse. Une variété importante d'électrodes poreuses a été testée, dont la majorité est sous forme de feutres, de mousses ou encore d'éponges. Elles sont fabriquées à partir de divers matériaux tel que le carbone (le plus utilisé), des métaux ou encore des dérivés de plantes pyrolysés (champignons, pomelo) (Figure 1).

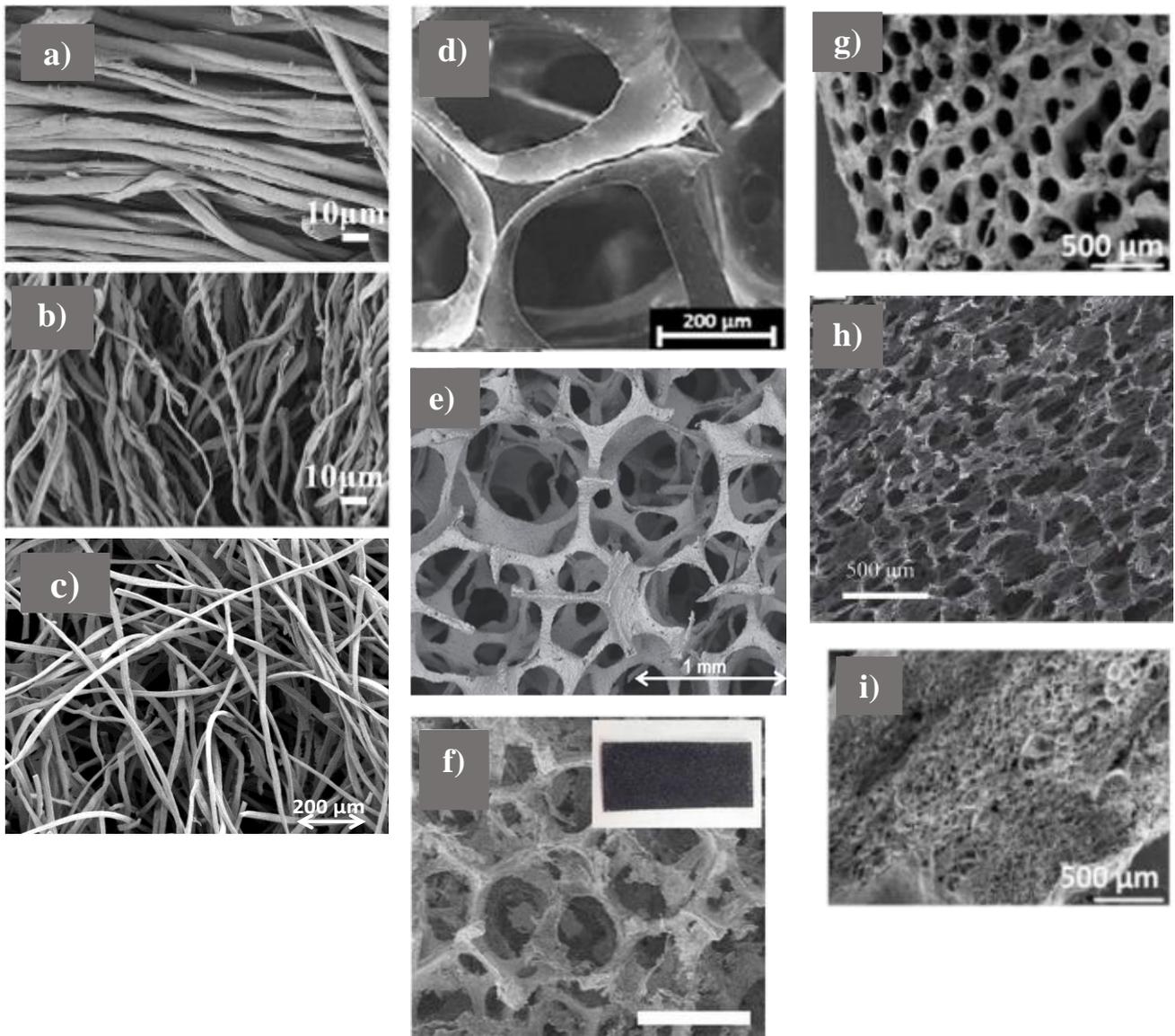


Figure 1 : Images prises au microscope électronique à balayage d'électrodes poreuses sous forme de feutres (a-c), de mousses (d-f) ou d'éponges (g-i) et fabriquées à partir de carbone (a-d), de métaux (e-f) ou de dérivés de plantes (g-i). Images tirées de (Zeng et al., 2018) (a-b), (Rousseau et al., 2013)(c), (Ketep et al., 2014) (e), (Karthikeyan et al., 2015)(g et i), (Chen et al., 2012a) (h) (Lepage et al., 2012) (d) et (Wang et al., 2013) (f).

1.1 Objectif

L'analyse globale présentée dans la Figure 2 de la revue bibliographique (chapitre 2) a mis en évidence que les anodes microbiennes poreuses avec des tailles de pore dépassant 0.5 mm produisent les densités de courant les plus élevées, jusqu'à 390 A.m^{-2} obtenu par le groupe de U. Schröder (Chen et al., 2012b). Dans ce cas les structures poreuses rejoignent les architectures de type multicouches pour lesquelles il n'est plus question de taille de pore mais de distance inter-couche. Toutefois, la très grande variabilité des résultats d'une étude à l'autre montre la nécessité d'apporter des éléments fondamentaux pour tenter de guider l'élaboration de ces électrodes.

Malgré l'abondance des travaux qui mettent en œuvre des anodes microbiennes 3D poreuses, pratiquement aucun ne se penche sur les mécanismes d'établissement du biofilm et des mécanismes électro-catalytiques au sein des structures poreuses. En comparaison, le domaine du génie chimique est riche d'études décrivant et modélisant les couplages entre transports de matière et réaction au sein de catalyseurs poreux. L'élaboration de catalyseurs solides poreux est l'un des piliers historiques du génie chimique notamment pour les applications pétrochimiques.

Par analogie avec les études les plus simples réalisées en génie chimique, nous avons choisi de travailler à l'échelle d'un pore unique qui représente le constituant élémentaire d'une structure poreuse. Pour initier une démarche d'ingénierie avec les anodes microbiennes, il a paru évident de commencer par étudier les effets de la taille des pores sur la colonisation des électrodes et la production de courant. Le but est d'apporter une base de connaissance pour concevoir des anodes 3D poreuses optimales. Comme rappelé ci-dessus, l'analyse bibliographique a fait apparaître des tailles de pores ou, pour les structures multicouches des distances inter-couches, de l'ordre du millimètre comme les plus prometteuses. Nous avons donc opté pour l'étude de tailles de pore de l'ordre de quelques millimètres.

1.2 Choix de l'inoculum

La compréhension et la mise en œuvre des biofilms électroactifs (EA) représentent un axe de recherche au Laboratoire de Génie Chimique (LGC) depuis les années 2000. Durant toutes ces années, le LGC a acquis une expérience dans la formation des biofilms EA à partir de terreau de jardin grâce à plusieurs thèses (Parot, 2007; Cercado Quezada, 2009; Pocaznoi, 2012; Oliot, 2017). De nombreux paramètres expérimentaux ont été étudiés afin de garantir les meilleurs résultats possibles tels que : la préparation du terreau de jardin (marque du terreau, salinité du milieu,

technique de lixiviation...), la concentration du substrat, le matériau d'électrode, le potentiel de polarisation de l'électrode ou encore la température. Grâce à toutes ces connaissances, des densités de courant élevées de l'ordre de 30 A.m^{-2} sont de nos jours atteintes. En conséquence, le terreau de jardin a également été choisi comme source de micro-organismes pour former des biofilms EA pour l'ensemble des travaux de la présente thèse.

Au début de la thèse, les biofilms EA étaient formés uniquement à partir d'un lixiviat de terreau (préparation décrite au chapitre 2). Ensuite, avec Manon Oliot nous avons réalisé des tests consistant à utiliser un biofilm EA déjà formé, dit « primaire » comme seule source de bactéries pour former un biofilm dit « secondaire ». Cette méthode initialement proposée par Liu et al. a montré sa capacité à obtenir des biofilms secondaires plus rapidement que les biofilms primaires (Liu et al., 2008). Un autre avantage de cette méthode est la possibilité de travailler dans des conditions mieux contrôlées grâce à l'utilisation d'un milieu synthétique dont la composition est connue et favorable à la croissance bactérienne. Cette stratégie d'inoculation à partir d'une bioanode primaire a été employée pour l'étude de l'impact de la taille des pores sur la formation des biofilms EA.

1.3 Modélisation expérimentale d'un pore

Un dispositif expérimental a été élaboré pour modéliser un pore d'une ouverture de quelques millimètres. Ce dispositif devait être facilement démontable afin de pouvoir accéder à la colonisation de l'électrode sans endommager le biofilm. Les travaux antérieurs réalisés au LGC ont mis en évidence que le tissu de carbone était un excellent support pour la formation de bioanodes à partir de terreau de jardin. Le dispositif « canal » décrit au chapitre 2 a donc été conçu pour utiliser une électrode en tissu de carbone (DC carbone). Avec ce dispositif, un pore d'un diamètre d est approché par un canal rectangulaire d'une hauteur h (**Figure 2**).

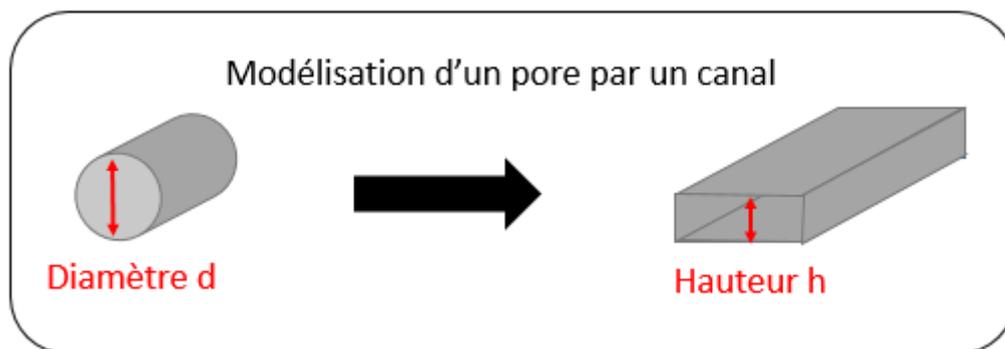


Figure 2 : Représentation schématique du passage d'un pore de diamètre d à un canal de hauteur h .

Le DC carbone a été élaboré avec deux hauteurs de canaux de 1 et 5 mm. Initialement, nous avons envisagé d'explorer une gamme plus large de hauteurs de canaux, en essayant notamment de descendre sous l'échelle du millimètre. Ceci n'était pas du tout envisageable avec le dispositif canal en carbone car le tissu possède une épaisseur non négligeable ($\approx 200 \mu\text{m}$) qui peut facilement obturer les canaux surtout s'il n'est pas parfaitement étiré. C'est pourquoi, un second type de dispositif a été élaboré en remplaçant le tissu de carbone par une électrode métallique plane en acier inoxydable 316L. Ce nouveau dispositif, le DC acier (décrit au chapitre 2), a été étudié d'abord pour des hauteurs de canaux de quelques millimètres pour rester cohérent avec les conclusions issues de l'analyse bibliographique et surtout pour pouvoir s'appuyer sur la base de résultats établis avec le dispositif carbone. Ensuite, l'étude a été complétée avec des hauteurs de canaux de 200 et 500 μm .

2 TESTS PRELIMINAIRES

Des tests préliminaires avec les deux dispositifs « canaux » en carbone et en acier ont été conduits en deux étapes : la formation de la bioanode primaire selon la procédure décrite au chapitre 2, puis le transfert et l'utilisation de cette bioanode pour inoculer un second réacteur contenant le milieu synthétique (composition décrite au chapitre 2) afin de former les bioanodes secondaires.

2.1 Configuration réacteur « boîte à bonbons »

Une première série d'expériences a été effectuée en utilisant lors de la deuxième étape un montage à 3 électrodes avec N-stat dans un réacteur dont la forme se rapproche de celle d'une « boîte à bonbons » (décrit au chapitre 2). Au sein de ce réacteur, l'électrode de référence était une électrode au calomel saturée (ECS), la contre-électrode une grille circulaire de platine et deux électrodes étaient polarisées au titre d'électrodes de travail : la bioanode primaire (3 cm x 3 cm) servant d'inoculum et un dispositif « canal » en carbone ou en acier muni d'une électrode non-colonisée. Les anodes ont été polarisées à -0.2 V/ECS durant 10 jours et la température maintenue à 40°C. La concentration en acétate a été mesurée puis complétée à 20 mM tous les 2 jours. Les hauteurs de 1 et 5 mm ont été testées en dupliqua avec les deux types de dispositifs « canaux » carbone et acier. Les courbes de chronoampérométrie obtenues sont présentées sur la Figure 3. Les densités de courant sont ramenées à la surface potentiellement colonisable par les microorganismes qui est de 18 cm² (2 faces de 9 cm²) pour les bioanodes primaires et de 10 cm² (1 face de 10 cm²) pour les dispositifs « canal ».

Lors de la première étape de formation, les 8 bioanodes primaires ont montré des comportements similaires avec une densité maximale de courant moyenne de $11.20 \pm 1.66 \text{ A.m}^{-2}$. Avant leur transfert dans le réacteur « boîte à bonbons », les bioanodes primaires délivraient une densité de courant d'environ 10 A.m^{-2} . Après leur transfert dans le milieu synthétique pour la seconde étape, les densités de courant initiales étaient plus faibles, entre 3 à 6 A.m^{-2} (Figure 3.A et B). Cette diminution s'explique par l'exposition des bioanodes primaires à l'oxygène de l'air lors de leur transfert dans le nouveau réacteur. En effet, certaines bactéries EA sont anaérobies, comme par exemple *Geobacter sulfurreducens* (Bond and Lovley, 2003; Logan, 2009). Une exposition à l'oxygène, même réduite à quelques minutes, a pu perturber le métabolisme des cellules. Toutefois, les bioanodes primaires retrouvent assez rapidement une densité de courant de l'ordre de 10 A.m^{-2} (en moins de 2 jours).

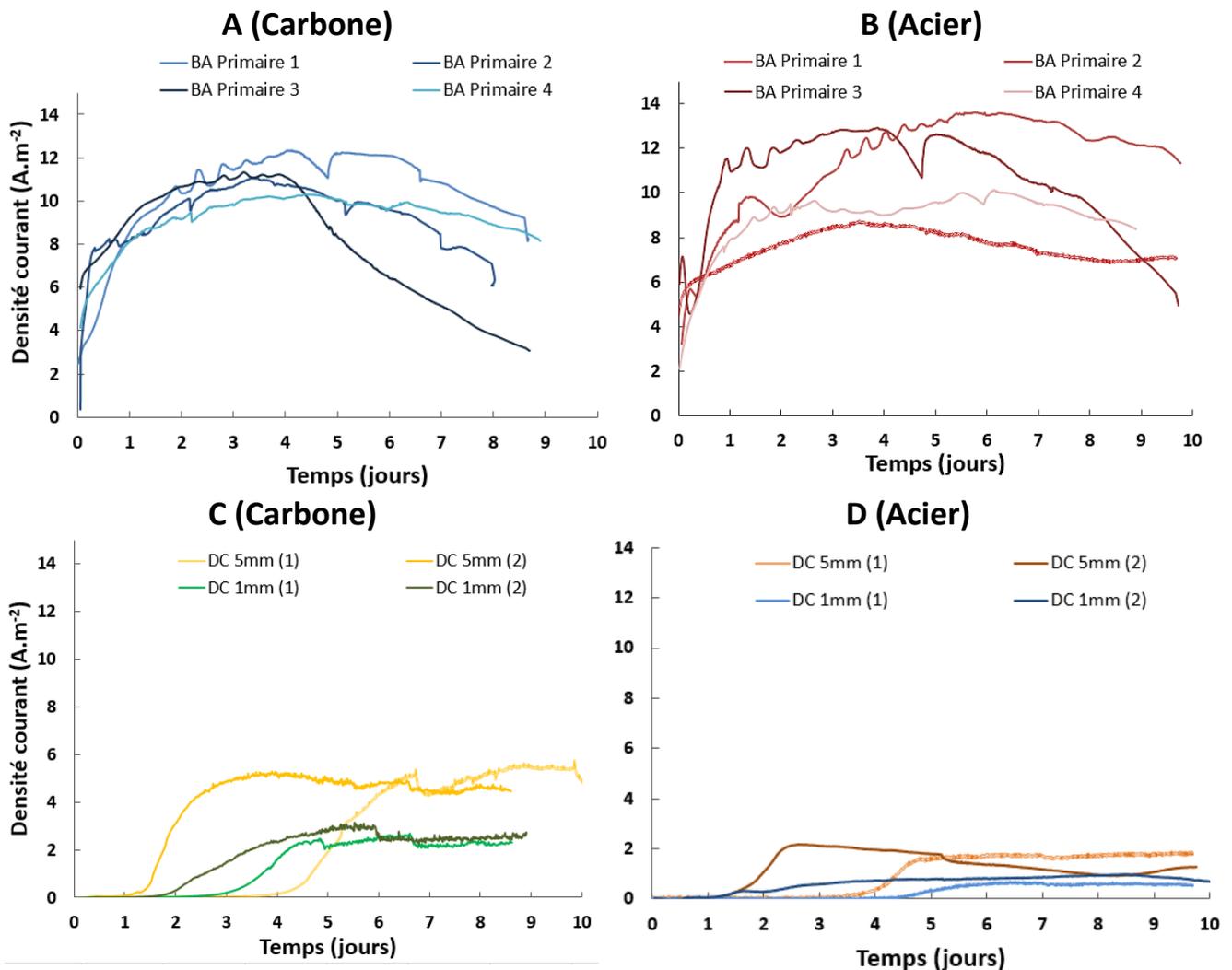


Figure 3 : Courbes de chronoampérométrie lors de l'étape 2, des bioanodes primaires (A et B) et des dispositifs « canal » de 1 et 5 mm (C et D) obtenues lors des tests préliminaires dans un réacteur « boîte à bonbons ». Chacun des 8 réacteurs était équipé d'une bioanode primaire servant d'inoculum (BA) et d'un dispositif « canal » (DC) muni d'une électrode non-colonisée. Pour une comparaison plus facile les courbes ont été regroupées pour les anodes primaires et les deux types de dispositif « canal ».

Les densités de courant enregistrées avec les deux dispositifs « canal » (Figure 3. C et D) restent inférieurs à 6 A.m^{-2} (carbone) et 2 A.m^{-2} (acier) et les résultats sont assez confus. Certes, les valeurs du plateau de courant sont très proches pour chacune des 4 expériences réalisées avec chaque matériau, cependant le démarrage du courant n'est pas reproductible. Pour des réacteurs similaires (dupliqua), un écart allant de 1 à 3 jours est constaté ce qui rend difficile l'analyse et la comparaison des résultats. Ces écarts peuvent être attribués à l'utilisation de différentes bioanodes primaires. En effet, pour ces tests préliminaires 4 bioanodes primaires avaient été formées en parallèle, puis utilisées comme inoculum. Ensuite, ces bioanodes primaires ont été reconditionnées dans un réacteur « standard » avec du milieu synthétique afin d'être réutilisée comme inoculum par la suite. Pour chaque mise en route d'un réacteur « boîte à bonbons », la meilleure bioanode primaire parmi le lot disponible était sélectionnée. Les bioanodes primaires utilisées comme inoculum pouvaient par conséquent avoir un vécu assez différent.

2.2 Configuration réacteur « Multi-anodes »

Ces divergences nous ont amené à optimiser la procédure expérimentale. Il semblait important d'utiliser la même bioanode primaire pour un maximum de dispositifs « canal » afin d'être dans des conditions expérimentales mieux contrôlées. Un réacteur de plus grand volume pouvant permettre la mise en œuvre de plusieurs dispositifs « canal » en parallèle était nécessaire. Le réacteur « multi-anodes » de 2.5 L décrit au chapitre 2 et mis au point par un précédent doctorant de l'équipe, Raphaël Rousseau, a alors été employé.

Ce réacteur est doté de 5 piquages, nous avons réussi à y introduire l'électrode de référence, la contre-électrode et 4 électrodes de travail :

- un dispositif « canal » d'une hauteur de 1 mm,
- un dispositif « canal » d'une hauteur de 5 mm,
- Une électrode « simple » qui n'est autre qu'une électrode libre sans dispositif « canal », de la même forme et de la même surface projetée que les électrodes placées dans les dispositifs « canal » ($1 \times 10 \text{ cm}^2$) qui sert de contrôle.
- une bioanode primaire qui est la seule électrode colonisée et sert d'inoculum.

La bioanode primaire a été systématiquement placée au centre du réacteur et les 3 bioanodes secondaires en périphérie et à égale distance de la bioanode primaire (Figure 7 du chapitre 2). Ayant cette fois-ci 3 bioanodes secondaires à former à partir d'une seule et même bioanode primaire, il a

fallu adapter la surface de la bioanode primaire de sorte à ce qu'il y ait suffisamment de bactéries EA. La surface potentiellement colonisable délivrée par les bioanodes secondaires est de 40 cm² au total : 10 cm² par dispositif « canal » et 20 cm² pour l'électrode « simple » car elle a deux faces de 10 cm² exposées.

En amont de ces tests préliminaires, nous avons évalué avec Manon Oliot (Doctorante 2014-2017) l'effet d'un changement de taille de la bioanode sur les performances anodiques. Nous avons comparé deux tailles de bioanodes : 9 et 50 cm² (surface projetée). Ces travaux ont fait l'objet d'un article intitulé « *Influence of the electrode size on microbial anode performance* » publié dans le journal *Chemical Engineering Journal*. Cette étude a montré que les anodes de 50 cm² étaient moins performantes que celles de 9 cm². Cette perte de performance était causée par la chute ohmique due à la faible conductivité de l'électrolyte et à la non-uniformité du potentiel local de Nernst le long de la surface de la bioanode. Plus l'électrode est grande plus l'hétérogénéité du potentiel local de Nernst devient importante : le potentiel le long de l'électrode de 9 cm² était quasi uniforme (-0.303 à -0.320 V/ECS) et les deux faces de l'électrode ont produit des densités de courant similaires (8.63 et 8.5 A.m⁻²). Pour l'électrode de 50 cm² la situation était différente, une distribution plus hétérogène du potentiel a été détectée (-0.287 à -0.345 V/ECS) et les deux faces de l'électrode ont produit des densités de courant différentes et plus faibles que l'électrode de 9 cm² (8.0 et 7.25 A.m⁻²). L'imagerie par microscopie à épifluorescence a en outre montré que l'hétérogénéité du potentiel a engendré une hétérogénéité dans le développement du biofilm EA. Par conséquent, grâce à cette étude, nous savons qu'une bioanode primaire de surface trop importante perdait en performance électrochimique. Il nous fallait trouver un compromis entre la volonté d'offrir une quantité suffisante de bactéries électroactives d'une part et la contrainte de ne pas trop accroître la surface de l'électrode. Ce fut fait en choisissant des bioanodes primaires de 4 x 8 cm². Au final, pour coloniser les 40 cm² de surface des bioanodes secondaires, il y avait à disposition 64 cm² (2 faces de 32 cm²) de biofilm primaire. Il faut convenir que cette démarche est très, très qualitative. Ceci montre le manque de connaissance fondamentale sur les mécanismes de formation des biofilms EA et tout le champ d'investigation qui s'offre aux chercheurs.

Les tests en réacteur « boîte à bonbons », ont également montré l'importance d'avoir des bioanodes primaires similaires. En conséquence, dans la nouvelle procédure toutes les bioanodes primaires ont été formées dans les mêmes conditions : polarisation à -0.2 V/ECS dans du lixiviat de terreau pendant 20 jours et ne sont pas reconditionnées pour être réutilisées.

3 RESULTATS OBTENUS AVEC LE DISPOSITIF « CANAL » EN TISSU DE CARBONE

Les Tableau 1 et 2 rappellent les conditions opératoires utilisées pour l'étude de l'impact de la taille des pores sur la formation des biofilms EA selon la nouvelle procédure.

Tableau 1 : Conditions expérimentales pour la formation des bioanodes primaires.

Montage expérimental			
Réacteur : « Standard »		Montage à 3 électrodes : Electrode de travail : Tissu carbone 4 x 8 cm ² Contre-électrode : Grille acier 5 x 10 cm ² Référence : ECS	
Conditions opératoires			
Inoculum : Lixiviat de terreau Milieu de culture : Lixiviat de terreau	40°C	Substrat : Acétate batch 20 mM	Bullage N ₂ 10min au démarrage
Enregistrements électrochimiques			
CA : E = -0.2 V/ECS pendant 20 jours		CV : 3 cycles à 1 mV.s ⁻¹ de -0.5 V à 0.2 V/ECS	

Tableau 2 : Conditions expérimentales pour la formation des bioanodes secondaires.

Montage expérimental			
Réacteur : « Multi-anodes »		Montage à 3 électrodes avec N-stat : 4 électrodes de travail Bionaode primaire 8 x 4 cm ² Tissu carbone 10 x 1 cm ² (contrôle) DC Carbone h = 1 mm DC Carbone h = 5 mm Contre-électrode : Grille de platine circulaire Référence : ECS	
Conditions opératoires			
Inoculum : Bioanode primaire Milieu de culture : Milieu synthétique	40°C	Substrat : Acétate maintenu à 20 mM	Bullage de N ₂ 30min au démarrage
Enregistrements électrochimiques			
CA : E = -0.2 V/ECS pendant 4, 10 ou 31 jours		CV : 3 cycles à 1 mV.s ⁻¹ de -0.5 V à 0.2 V/ECS	

La liste des manipulations réalisées suivant la nouvelle procédure ainsi que les analyses effectuées sur les dispositifs « canal » avec électrode en tissu de carbone est dressée au Tableau 3. Une partie des résultats a fait l'objet d'un article accepté pour publication dans le journal *International Journal of Hydrogen Energy* (section 3.1). Les résultats obtenus postérieurement à la soumission de l'article sont présentés dans la section 3.2. Une analyse globale de l'ensemble des résultats est ensuite réalisée dans la section 3.3.

Tableau 3 : Bilan des manipulations et analyses effectuées avec les dispositifs « canal » avec électrode en tissu de carbone lors de ces travaux de thèse.

Durée de la manipulation et nombre de réacteurs	Analyse effectuée en fin d'expérience (référence dans le manuscrit)
4 jours 6 réacteurs	<ul style="list-style-type: none"> • Visualisation du profil de colonisation par microscopie à épifluorescence et analyse statistique du biovolume pour 2 électrodes DC-1 et 2 électrodes DC-5. (<i>Article section 3.1</i>)
	<ul style="list-style-type: none"> • Analyse de la population microbienne par métabarcoding pour 2 électrodes DC-1, 2 électrodes DC-5 et 2 électrodes libres (contrôle). (<i>Article section 3.1</i>)
	<ul style="list-style-type: none"> • Analyse DEAD/LIVE pour 2 électrodes DC-1, 2 électrodes DC-5 et 2 électrodes libres (contrôle). (<i>section 3.2</i>)
10 jours 2 réacteurs	<ul style="list-style-type: none"> • Visualisation du profil de colonisation par microscopie à épifluorescence et analyse statistique du biovolume pour 2 électrodes DC-1 et 2 électrodes DC-5. (<i>Article section 3.1</i>)
31 jours 6 réacteurs	<ul style="list-style-type: none"> • Visualisation du profil de colonisation par microscopie à épifluorescence et analyse statistique du biovolume pour 2 électrodes DC-1 et 2 électrodes DC-5. (<i>Article section 3.1</i>)
	<ul style="list-style-type: none"> • Analyse de la population microbienne par métabarcoding pour 2 électrodes DC-1, 2 électrodes DC-5 et 2 électrodes libres (contrôle). (<i>section 3.2</i>)

3.1 Article « Microbial anodes: what actually occurs inside pores? »

Les “Supplementary Data” de l'article sont présentées en annexe.

Microbial anodes: what actually occurs inside pores?

Poehere Chong*, Benjamin Erable, Alain Bergel

Laboratoire de Génie Chimique, CNRS, Université de Toulouse, 4 allée Emile Monso, 31432 Toulouse, France

E-mail addresses: poehere.chong@ensiacet.fr, benjamin.erable@ensiacet.fr, alain.bergel@ensiacet.fr

**Corresponding author:* poehere.chong@ensiacet.fr, (+33) 5 34 32 36 27

Abstract

Microbial anodes were formed under constant polarization either free in solution or inside channels of 1 mm or 5 mm height. Both the 5 mm and 1 mm high channels allowed the colonization of electrodes over several centimetres of penetration depth. The channel impacted the evolution of the biofilm along the electrode and limited the maximum current density to 5.4 A.m^{-2} , whatever the height, while 13.1 A.m^{-2} was achieved with the free bioanodes. Several effects related to the channel configuration can be explained by a theoretical analysis of mass transfers. Nevertheless, other observations, such as the stabilizing effect of the channels on the long-term current, the time of 2 days that was always sufficient for the electrodes reach the maximum current, and the decoupling between current production and biofilm development, remain difficult to explain and open up exciting questions for future research on the mechanisms of electroactive biofilm formation.

Keywords: bioanode; porous electrode; microbial fuel cell; electroactive biofilm; bioelectrochemical technology.

1. INTRODUCTION

Microbial anodes are the cornerstone of most microbial electrochemical processes (Santoro et al., 2017; Wang and Ren, 2013). A huge number of studies have consequently aimed to improve their electrochemical performance. In this context, 3-dimensional porous electrodes have been increasingly used to offer the largest possible surface area for the development of the microbial electroactive biofilm (Xie et al., 2015). Various types of porous electrodes have been implemented, mainly in the form of felts (Ketep et al., 2014; Lepage et al., 2012; Yang et al., 2016), foams (Ketep et al., 2014; Liu et al., 2013; Wang et al., 2013), sponges (Liu et al., 2013; Xie et al., 2012a, 2012b; Liu et al., 2015), and multi-layered structures (Artyushkova et al., 2016; Chen et al., 2012b), made from a wide range of materials: carbon (Chen et al., 2011a, 2011b; Huang et al., 2016; Ren et al., 2016; Wang et al., 2015), including carbonaceous materials obtained by the pyrolysis of natural plants (pomelo peel, kenaf, corn stem, etc.) (Chen et al., 2012a; Karthikeyan et al., 2015; Yuan et al., 2013) and various metals (Hou et al., 2014; Massazza et al., 2015; Baudler et al., 2015; Liu et al., 2016).

A large range of pore sizes have been investigated, from some nanometres (Qiao et al., 2008), through a few micrometres (Zhao et al., 2015) and hundreds of micrometres (Chen et al., 2014) to several millimetres (Liu et al., 2015). However, correlation between the bioelectrochemical performance of a 3-dimensional porous microbial anode and its pore size is not yet evident. A major obstacle that hinders the advance of knowledge in this area is the practical difficulty of designing experimental set-ups that allow access to the biofilm developing inside a porous structure. A recent study in this direction has described a stacked electrode configuration that allowed each layer to be independently imaged (Artyushkova et al., 2016). The purpose of the present study was to go ahead in this direction by designing a simple experimental set-up that would enable biofilm penetration inside a 3-dimensional structure to be approached. The main idea was to set a long (10 cm), flat electrode at the bottom of an insulating channel (Figure 1) that could be disassembled at the end of the experiment in order to take images of the biofilm development along the electrode length. The width of the channel was chosen large enough (1 cm) not to impact the microbial colonization, so that the study could focus on the impact of the height of the channel as the sole parameter.

A quick glance at the literature helped in choosing characteristic sizes to work with. It is easy to accept that the narrowest pore sizes, smaller than cell sizes, cannot be accessed for biofilm development (although they may impact the performance of microbial anodes by other effects, like

improving biofilm anchorage or the electron transfer rate (Champigneux et al.)). Porous electrodes with pore sizes of a few micrometres been reported to be penetrated by microbial colonization, mostly when specific conditions were implemented with minimal synthetic media and pure cultures (Yang et al., 2016; Zhao et al., 2015; Lin et al., 2012; Jiang et al., 2015). Nevertheless, larger pore sizes are required to avoid clogging by the biofilms that form in rich media. Clogging of the small pore sizes explains why open felts have been reported to produce current density similar to that of two-dimensional electrodes, for instance (Blanchet et al., 2016).

Considering that the thickness of mature electroactive biofilm can reach hundreds of micrometres (Ketep et al., 2014; Blanchet et al., 2016; Dhar et al., 2017), it can be speculated that pore sizes of a few millimetres may be the relevant choice to avoid pore clogging and allow the biofilm to upholster the largest possible surface area inside a porous structure. This kind of rule of thumb is supported by experimental results. The highest current densities reported so far with porous electrodes have generally been obtained with pore sizes of the order of millimetre (Chen et al., 2012b; Ketep et al., 2014; Liu et al., 2015) and multi-layered structures. Current density as high as 390 A.m⁻² has been reached with a multi-layered carbon anode with inter-layer distance of 1 to 3 mm (Chen et al., 2012b). Accordingly, channels characteristic sizes of 1 and 5 mm have been chosen in this study.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Channel device fabrication

The channel device (Figure 1) consisted of two rectangular parallelepiped parts (10 cm x 2.5 cm x 1 cm) made of Teflon. The upper part was machined with a channel along the whole length that was 1 cm wide and had two different heights, h : 1 mm (CH1) and 5 mm (CH5). A carbon cloth (Paxitech SAS France, France) was inserted between the upper and lower Teflon parts, thus forming an anode of 10 cm x 1.0 cm surface area applied against the bottom part. The anode was electrically connected with a platinum wire, whose part outside the carbon cloth was insulated with a heat-shrinkable sheath. The three pieces were assembled by means of 14 plastic screws uniformly distributed over the whole device. Insulating varnish (Electrofuge 200-ND, CRC Industries France SAS) was applied all around the outer section of the carbon cloth and dried overnight in a heat chamber at 40 °C.

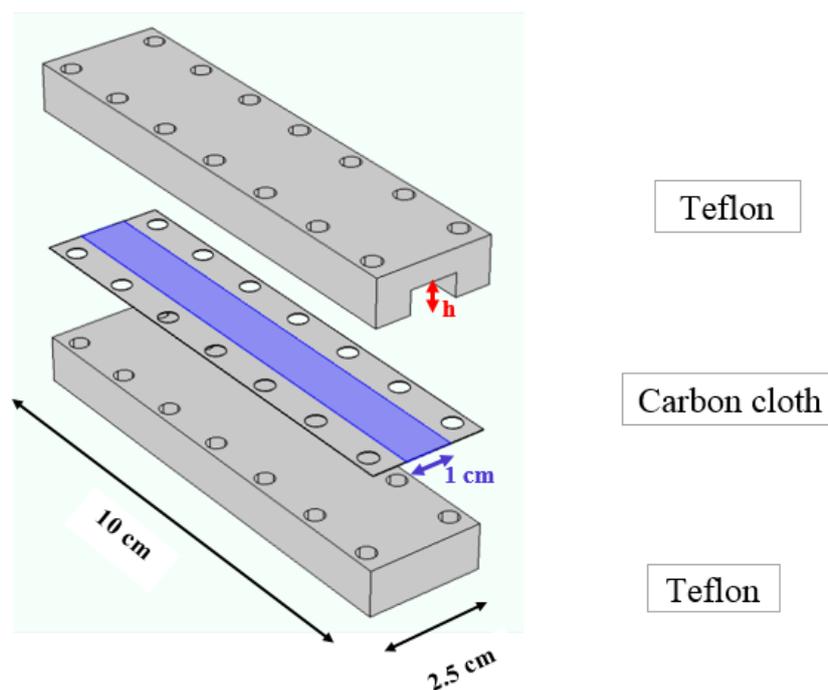


Figure 1. Schematic of the experimental channel device.

2.2 Microbial anode formation

2.2.1 Primary bioanode formation

Primary bioanodes were first prepared to serve as the sole source of microbes for channel device and free electrodes experiments. They were formed using a garden compost leachate as the solution and inoculum. As described elsewhere (Cercado et al., 2013), the leachate was obtained from a mixture of 1.5 L of garden compost and 2.25 L of tap water supplemented with 60 mM of KCl. This mixture was first stirred overnight at room temperature then filtered through a large-mesh cloth. The pH of the final compost leachate was 7.6 and its conductivity was $2.6 \text{ S}\cdot\text{m}^{-1}$.

The 3-electrode electrochemical reactors were composed of a carbon cloth ($8 \times 4 \text{ cm}^2$) as the working electrode (WE), a stainless steel grid as the counter electrode (CE) and a saturated calomel electrode (SCE, Radiometer, $+0.242 \text{ V}/\text{SHE}$) as the reference electrode. The working electrode was electrically connected with a platinum wire, whose part outside the carbon cloth was insulated with a heat-shrinkable sheath. All potentials are expressed with respect to the SCE and current density values for these primary electrodes were calculated with respect to the whole anode surface area of 64 cm^2 (both 32 cm^2 faces of the electrode were exposed to the solution). Reactors were filled with 700 mL of garden compost leachate and deaerated by 15 min nitrogen bubbling. Primary bioanodes

were formed by applying a constant potential (-0.20 V/SCE) with a multi-channel potentiostat (VMP BioLogic SA, France). Sodium acetate (20 mM), used as the substrate, was added every time the current density decreased to around 1 A.m^{-2} . Reactors were placed in a thermostatic bath to maintain the temperature at 40°C. Primary bioanodes were considered mature, i.e. appropriate to be used as inoculum, when a stable current density of around 10 A.m^{-2} was reached.

2.2.2 Formation of secondary bioanodes in the channel devices and on free electrodes

The channel devices were implemented in a batch reactor filled with 2.5 L of minimal synthetic medium composed of 50 mM bicarbonate buffer, 10 mL.L^{-1} macronutrients, 1 mL.L^{-1} micronutrients, 1 mL.L^{-1} vitamins, 4.5 g.L^{-1} KCl and 2.4 g.L^{-1} $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (see Supplementary Data Figure S.1). The mature primary bioanode used to inoculate the reactor was set at the centre. Three clean working electrodes were arranged circularly around the primary bioanode: two channel devices, one 1 mm high (CH1) and the other 5 mm high (CH5), and a free carbon cloth electrode used as the control. The free electrode (a piece of commercial carbon cloth without any treatment) had the same dimensions as the electrode inside the channel devices, i.e. 10 cm x 1 cm, but both its sides were exposed to the solution, while only one side was exposed in the channel devices. Consequently, current densities were related to a surface area of 20 cm^2 for the free bioanodes and 10 cm^2 for the channel devices. The counter electrode was a circular platinum grid of 6 cm diameter, set above the primary bioanode.

The four electrodes (the primary bioanode used as the inoculum, the two channel devices and the free electrode) were individually addressed as WE polarized at -0.20 V/SCE with an N-stat device (Biologic SA, France) added to the multi-channel potentiostat. The concentration of sodium acetate was measured periodically with an enzymatic kit (K-ACETAK, Megazymes) and maintained at 20 mM. Reactors were flushed with nitrogen for 20 min at the beginning and were maintained at 40 °C in a heat chamber. Experiments were performed at least in duplicate and up to 4 identical experiments were carried out for some conditions, as indicated in the Results section.

2.2.3 Microbial anode analysis

At the end of the experiment, the channel devices were disassembled and the bacterial colonization of the electrodes was assessed by epifluorescence microscopy and analysed by statistical analysis of the biofilm volume coverage ratios.

2.2.3.1 Epifluorescence microscopy

Biofilms were observed with a Carl Zeiss Axioimager M2 microscope equipped for epifluorescence with an HBO 50 W ac mercury light source and the Zeiss 09 filter (excitor HP450-490, reflector FT 10, Barrier filter LP520). Images were acquired with a monochrome digital camera (evolution VF) every 0.5 μm along the Z-axis and the set of images was processed with the Axiovision® software. Electrodes were stained with acridine orange 0.01% (A6014 Sigma) for 10 minutes, then thoroughly rinsed in three different water baths before drying at room temperature. Acridine orange stains both the intracellular and extracellular nucleic acids and thus gives a fair representation of the global biofilm structure. To visualize the bacterial profile along the channel, images were taken every 1.5 μm along the electrode (eight different locations). For each location, four different spots were analysed and averaged, so 32 spots (8 locations x 4 spots) were analysed for each bioanode.

2.2.3.2 Biofilm volume coverage ratios

At each spot, a picture was built up to estimate the biofilm volume coverage ratio as described elsewhere (Blanchet et al., 2016; Oliot et al., 2017a). For each picture, n images were taken along the z-axis, every 3.9 μm , forming a stack. For each image (i), the biofilm surface area ratio (θ_i) was determined and then multiplied by the thickness of the layer (δ) and the image surface area A_{image} to calculate the local biofilm volume (V_i):

$$V_i = \theta_i \times \delta \times A_{\text{image}} \quad (1)$$

The final biofilm volume coverage ratio was calculated as:

$$\text{Biofilm volume coverage ratio} = \sum_{i=1}^n V_i / V_T \quad (2)$$

where n varied between 50 and 80, depending on the biofilm thickness, and V_T was the total volume scanned by the n images:

$$V_T = n \times \delta \times A_{\text{image}} \quad (3)$$

3. RESULTS

3.1 Choice of the experimental device

Inside a multi-layered structure or inside a pore of a monolithic electrode, mass transports occur in parallel to the length of the structure. The coupled transports and reactions inside such structures are usually modelled by making differential mass balances inside an elementary unit perpendicular to the main direction (Green and Perry, 2007). In an elementary unit, at stationary state, concentrations are

assumed to be uniform and mass transport through the cross-sections balance the consumption or production by reaction on the electroactive surfaces (Figure 2). This simplified approach allows establishing in an easy way a mono-dimensional transport-reaction equation:

$$d\phi_i \text{ Cross-section area} = \pm \frac{j}{n_i F} \text{ Differential reactive area} \quad (4)$$

where ϕ_i is molar flux of the species i , which can be described through the Nernst-Planck equation, j is the local current density, which may depend on concentrations of different species, n_i is the number of electron exchanged for the consumption/production of 1 mole of the species i , F is the Faraday constant; the sign - or + depends whether the i species is consumed or produced by the reaction, respectively.

For multi-layered electrodes, considering two electrode layers spaced of $2h$ distance (Figure 2) the *Cross-section area* is equal to $2h l$, where h is the half-distance of the electrode layers, and l is the width of the electrode layers, and the *Differential reactive area* is two-times $l dx$ because of the presence of two electrodes. The one-dimensional transport-reaction between two parallel, flat electrodes is thus:

$$d\phi_i h = \pm \frac{j}{n_i F} dx \quad (5)$$

For the channel device elaborated in this study, the *Cross-section area* is equal to $h l$ and the *Differential reactive area* is $l dx$, so that the differential transport-reaction equation is also Equation (5). Actually, the symmetry plane in the middle of two electrode layers is just replaced in the channel device by an insulating plane. Both kinds of interface correspond to Neumann boundary conditions, with the first derivative of the concentrations equal to zero. Consequently, the channel device with a height h gives a right model of what occurs inside a multi-layered structure with an inter-electrode distance of $2h$.

The relevancy of the channel device can enlarge by considering a cylindrical pore (Figure 2). In this case the *Cross-section area* is equal to πr^2 , where r is the pore radius, and the *Differential reactive area* is $2\pi r dx$, which leads to the differential transport-reaction equation:

$$d\phi_i \frac{r}{2} = \pm \frac{j}{n_i F} dx \quad (6)$$

Comparing equations (6) and (5) shows that a channel device with height h gives a relevant approach of a cylindrical pore with radius r equal to $2h$.

In conclusion, the channel devices with height h elaborated in this study give a relevant representation of the transport-reaction behaviour of multi-layered structured spaced by a distance $2h$ and of cylindrical pores of radius $2h$.

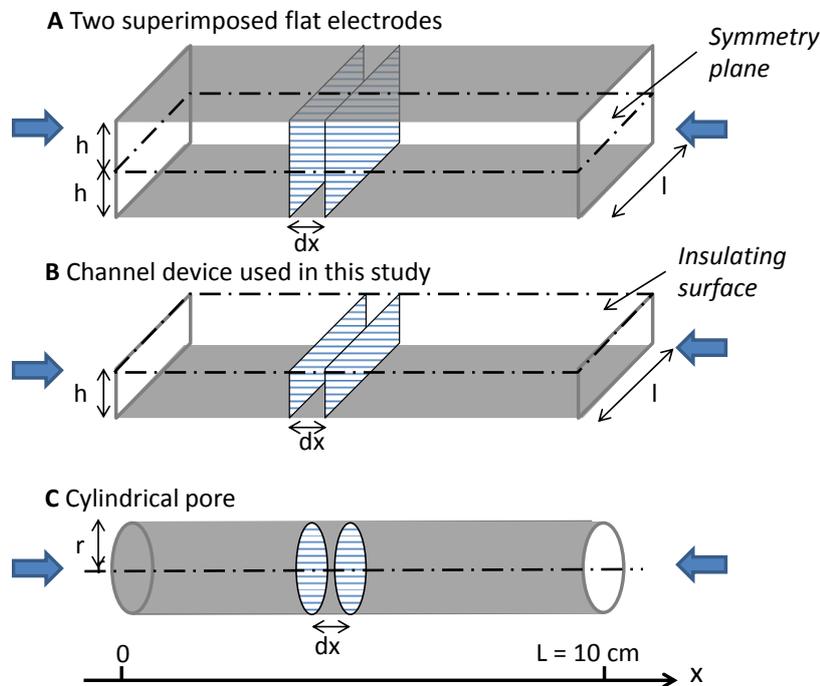


Figure 2: Schematic of one-directional transport for A) two adjacent layers of a multi-layered electrode B) the channel device used in this study, C) a cylindrical pore inside a monolithic electrode. The grey colour corresponds to the electrode surface; the hatched areas show the sections perpendicular to the x -axis, through which mass transports take place; the differential transport-reaction equation is established between two sections spaced of dx .

3.2 Primary bioanode formation

Primary bioanodes were formed on carbon cloth electrodes polarized at -0.20 V/SCE in garden compost leachate with successive acetate additions (20 mM). The chronoamperometry curves of three bioanodes run in parallel gave fairly reproducible results (Figure 3). After around 12 days of polarization, stable and mature electroactive biofilm had developed, which was consistent with previously reported studies [33], [34].

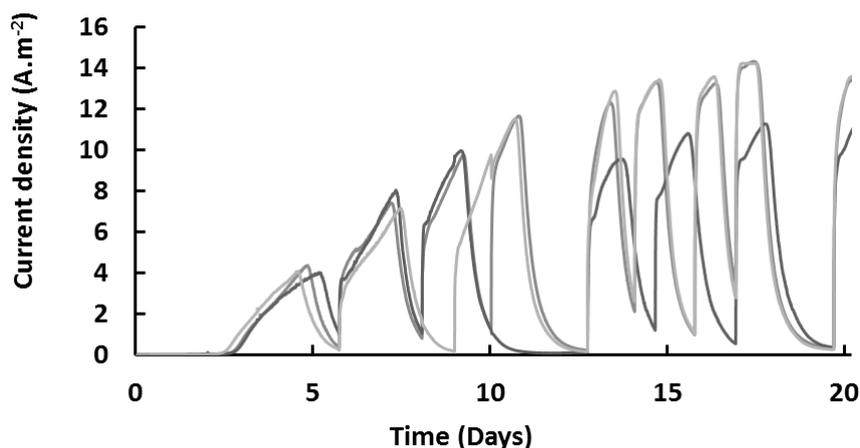


Figure 3 Chronoamperometry of primary bioanodes formed at -0.20 V/SCE with successive additions of 20 mM acetate to garden compost leachate at 40 °C. Acetate was added when current density fell to close to 0.

3.3 Secondary bioanodes in the channel devices and on the free electrodes

The primary bioanodes were used to form secondary bioanodes in a synthetic medium. Each reactor contained two electrodes in channel devices 1 and 5 mm high (CH1 and CH5 respectively) and a free electrode (control) of identical dimensions (1 cm x 10 cm). Experiments with 31 days of polarization were replicated 4 times in identical conditions. For the sake of clarity, the results of only one reactor are plotted in Figure 4 A the other results are provided in Supplementary Data (Fig. S2).

Free electrodes started to generate current after less than 20 hours and reached current densities of around 15 $\text{A}\cdot\text{m}^{-2}$ during the first 3 days. The CH1 and CH5 electrodes needed more time to start producing current, at least 1 and 2 days, respectively, and the maximum current densities remained 2.5 times lower than those of the free electrodes.

The initial behaviour of the free electrodes was similar for all replicates but their long-term performance showed more difference. For all free electrodes, the current decreased after a few days, but at different rates and, at the end of the 31 days of polarization, the free electrodes produced significantly different current densities - from near zero to 3 $\text{A}\cdot\text{m}^{-2}$.

In comparison, the channel devices gave more stable results during the 31 days of experiment. Independently of the channel height, all the CH1 and CH5 chronoamperometry curves presented similar features, which can be described in four successive phases (Figure 4.B): I) an initial lag period, II) a rapid increase of the current density to a maximum value J_{max} , followed by III) a slow decrease, and ending by IV) a long-term stabilization of the current density at a value lower than J_{max} .

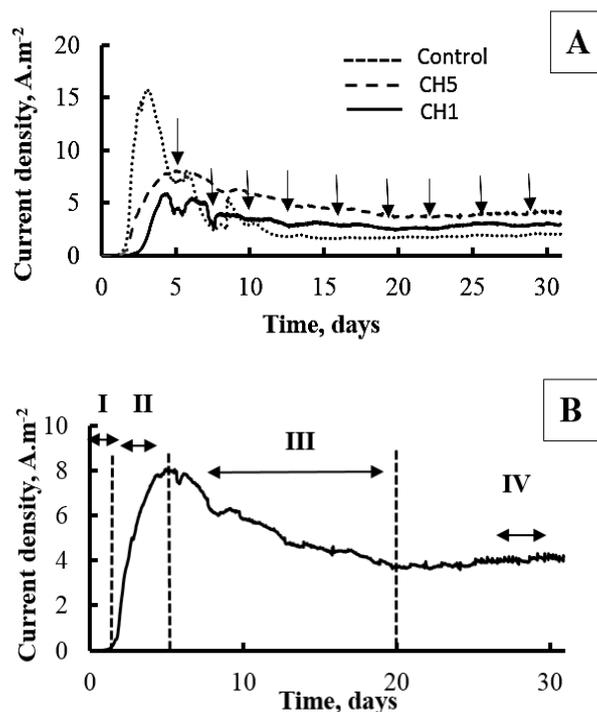


Figure 4. A) Chronoamperometry of secondary bioanodes formed at -0.20 V/SCE in synthetic medium at 40 °C during 31 days (arrows correspond to the acetate additions up to 20 mM) and B) Visualization of the 4 phases observed with a channel of 5 mm height.

3.4 Effect of channel height on electrochemical performance

Four parameters were defined to characterize the formation phases of the secondary bioanodes: i) the start-up time, which corresponded to the duration of phase I and was defined as the time required for the initial current density reach 0.1 A.m⁻², ii) the maximum current density value J_{\max} , iii) the duration of current increase (phase II), which was equal to the difference between the time at which J_{\max} was reached and the start-up time, and iv) the value of the long-term current density. The mean value of each parameter is reported in Table 1. For the first three parameters, the mean value was based on values from ten experiments: quadruplicate of 31 days (Figure 4.A and Figure S.2) duplicate of 10 days (Figure 5.A and Figure S.3) and quadruplicate of 4 days (Figure 5.B and Figure S.4). The mean value of the fourth parameter (long-term current density) was obtained from the four experiments that lasted 31 days (Figure 4.A and Figure S2).

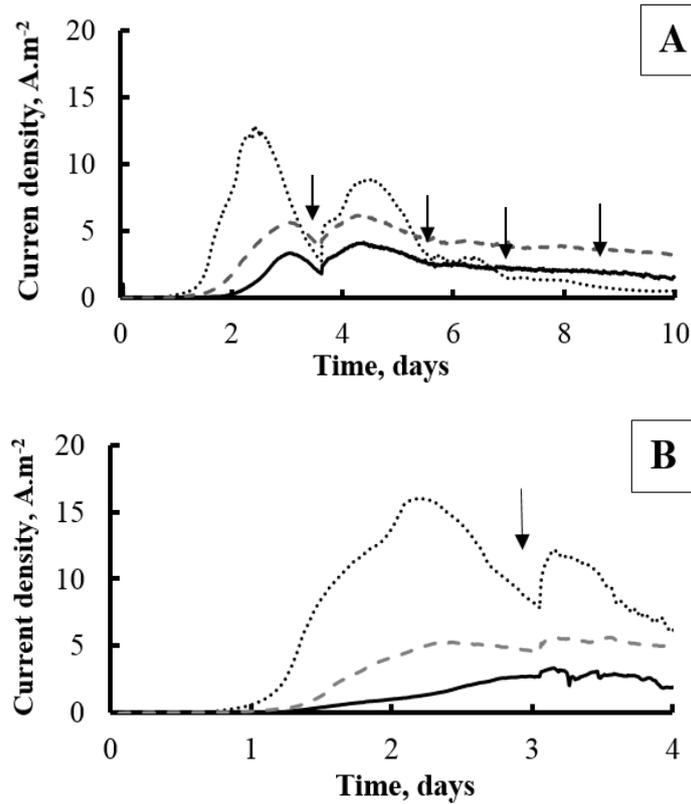


Figure 5. Chronoamperometry of secondary bioanodes formed at -0.20 V/SCE in synthetic medium at 40 °C during A) 10 and B) 4 days (arrows correspond to acetate additions).

	Start-up time (days)	J_{max} (A/m^2)	Duration Phase II (days)	Long term current (A/m^2)
Control	0.8 ± 0.1	13.1 ± 2.9	2 ± 0.6	1.7 ± 0.9
5 mm	1.2 ± 0.1	5.4 ± 1.5	2.2 ± 0.9	2.9 ± 1.0
1 mm	1.8 ± 0.5	5.4 ± 1.5	2.2 ± 1.1	2.2 ± 0.7

Table 1. Average values of the start-up time, J_{max} , duration of phase II (based on 10 experiments) and long-term current density (based on 4 experiments).

Some of the results reported in Table 1 could have been anticipated because of the geometric hindrance created on mass transport by the channel set-up:

- The free bioanodes started producing current at 0.8 days, while the bioanodes inside the channels started at 1.2 and 1.8 days for channel heights of 5 and 1 mm, respectively: decreasing the channel height from 5 to 1 mm decreased the initial lag period by 50 %.
- The bioanodes in the channel devices reached considerably lower maximum current density than the free bioanodes (5.4 ± 1.5 vs. 13.1 ± 2.9 $A.m^{-2}$).

- Decreasing the channel height from 5 to 1 mm decreased the long-term current density by 25%.

Some other results reported in Table 1 are more counter-intuitive:

- The channel height had no effect on the J_{\max} value.
- Free bioanodes and bioanodes inside the different channels always showed an increasing phase (phase II) of two days; it always took two days for all bioanodes to reach the maximum current density, whatever the experimental set-up.
- The long-term current densities provided by CH1 and CH5 electrodes were respectively 30 and 70% higher than those of the free electrodes, suggesting that the channel configuration may favour current stability.

3.5 Effect of channel height on microbial colonization

Bioanodes were formed under identical conditions as previously described but polarization was stopped after 4 days (4 runs) and 10 days (2 runs). Four days of polarization approximately corresponded to the end of phase II, when the bioanodes reached maximum current density, and 10 days corresponded to the current decrease during the third phase. At the end of each experiment of 4, 10 or 31 days, the channel devices were dismantled and biofilm development was assessed by epifluorescence microscopy. Pictures were taken along the 10 cm length of the electrodes at a regular distance of 1.5 cm. An example of the electrode colonization obtained after 31 days along the two channel heights is illustrated in Figure 6.

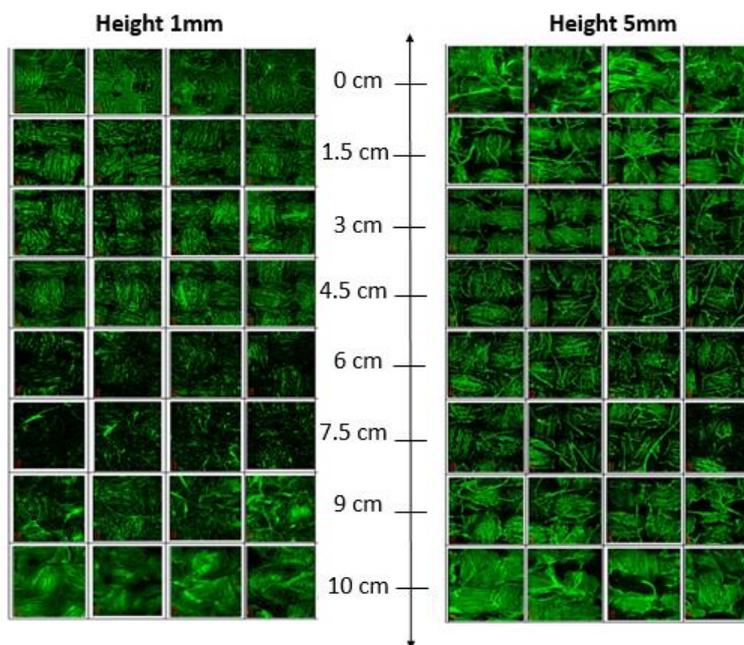


Figure 6. Biofilm profile inside channels of 1 and 5 mm height obtained by epifluorescence microscopy after 31 days of polarization; 4 spots were analysed for each of the 8 locations. (Color)

Such image analysis was performed on duplicates of CH1 and CH5 bioanodes for each operation time (4, 10 and 31 days) to obtain the biofilm volume ratios along the electrode plotted in Figure 7.

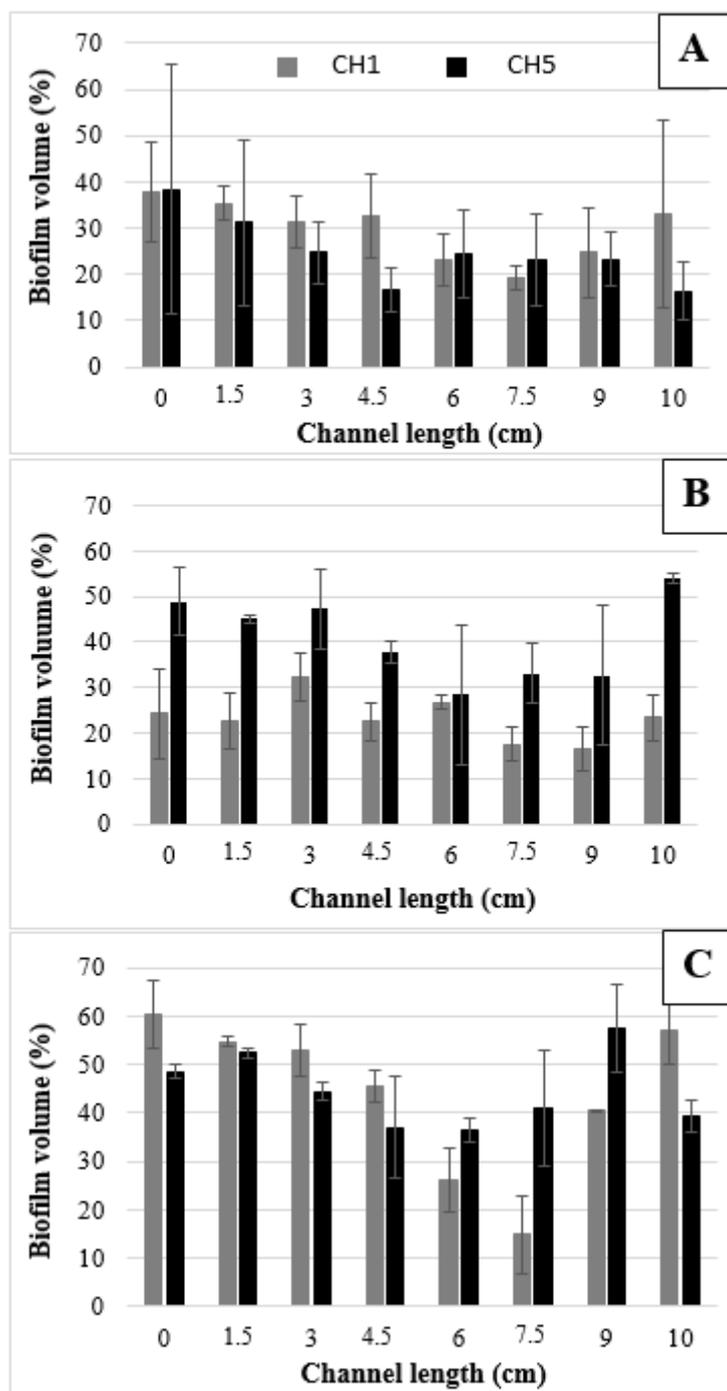


Figure 7. Average value of biofilm volume coverage ratios based on CH1 and CH5 electrodes (duplicates with 4 spots analysed for each at each location) after A) 4 days, B) 10 days and C) 31 days of polarization.

After 4 days, the full length of all bioanodes was colonized by bacteria. CH1 and CH5 provided biofilm volume ratios between 15 and 40%, with a slightly higher microbial density for CH1 bioanodes.

After 10 days, significant differences appeared depending on the channel height. The bioanodes in the 1 mm channels did not show significant evolution compared to their 4 day status and biofilm volume ratios remained less than 32% on most of the length of the bioanodes. In contrast, in the 5 mm channels, colonization had significantly increased. Biofilm volume ratios reached 55% at the extremities and around 30 % at the centre.

After 31 days, the bioanodes in the 5 mm channels had kept the same general colonization profile as after 10 days, with only a global increase in the biofilm volume ratio of around 5%. In contrast, the bioanodes in the 1 mm channels showed significantly higher colonization than at day 10, particularly at the channel extremities, with biofilm volume ratios of up to 60%. The bioanodes in the 1 mm channels showed more pronounced colonization profiles, with a greater difference in biofilm coverage ratios between the centre and the extremities. The channels imposed some limiting constraint on colonization of the centre of the electrodes, and this constraint was stronger in the 1 mm channels.

4. DISCUSSION

4.1 Initial internal colonization (phases I and II)

After 4 days, the full interior length of both CH1 and CH5 electrodes was totally colonized by bacteria (Figure 7.A). This confirmed observations already described in the literature (Chen et al., 2012b; Ketep et al., 2014; Liu et al., 2015; Yuan et al., 2013) that millimetre pore sizes are fully appropriate for deep penetration of electroactive microorganisms. Here, it was shown that, after 4 days, the electrode colonization was almost uniform over the full electrode length, which means that the electroactive microorganisms could penetrate to significant depths, of several centimetres, inside channels at least 1 millimetre high. Accordingly, it might be concluded that a porous structure of a few millimetres in size could be implemented with several centimetres depth. Nevertheless, this conclusion must be qualified, because the maximum current densities, J_{max} , reached by the bioanodes inside the channels were significantly lower, around 2.5 times less, than those reached by the free bioanodes (Table1).

The free bioanodes benefited from the continuous diffusion of acetate from the solution bulk, without any constraint. In contrast, the bioanodes confined in the channels probably consumed the 20

mM acetate contained in the volume of the channel first, and then had to wait for the diffusion of acetate through the small section area of the channel. It would be no surprise to find that this diffusion along narrow channels significantly limited the substrate supply. Consequently, during the initial phases of bioanode formation (phases I and II in Figure 4), the free bioanodes and the bioanodes inside channels encountered very different situations in terms of substrate availability. The free bioanodes benefited from continuous, semi-infinite, linear diffusion with a very low ratio of electrode surface area to solution volume, equal to $8.10^{-3} \text{ cm}^{-1}$ (20 cm^2 in 2.5 L). In contrast, for the bioanodes inside the channels, the initial phases I and II unfolded as if in a small vessel having the volume of the channel, with very high “electrode surface area/solution volume” ratios of 2 and 10 cm^{-1} for CH5 and CH1, respectively. It has been shown and theorized elsewhere (Rimboud et al., 2014) that a high ratio drastically limits the maximum current density that can be reached. Actually, in conditions of high electrode surface area/solution volume ratio, the fast depletion of the substrate precludes the full development of the electroactive biofilm. Here, the bioanodes formed inside the channels reached lower J_{max} than the free bioanodes because their initial formation occurred similarly to what could happen in a small closed vessel having the channel volume.

For a raw theoretical approach to this phenomenon, the time required for the 20 mM of acetate initially present in the volume of the two channel devices be totally consumed was calculated. The charge (Q, coulomb) provided by the initial 20 mM of acetate (C^0) contained in the channel device volume ($V_{CH} = \ell \times L \times h$) was:

$$Q = C^0 n_e F V_{CH} \quad (7)$$

where $n_e = 8$ is the number of moles of electrons consumed by the oxidation of 1 mole of acetate. Integrating the CA curves, from day 0 to different times, gave the time required for this charge be fully consumed by the electrochemical reaction, i.e. the time needed to consume the 20 mM acetate initially present inside the channel volume (Table 2). All the initial acetate was consumed after only 2 (CH5) and 2.3 (CH1) days of polarization. These times correspond to very early bioanode formation, at the beginning of phase II (Figure 4 and Figure 5).

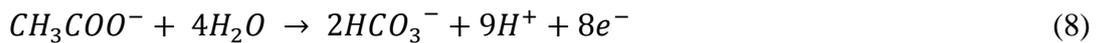
Current then continued to increase for at least more than one day, showing that acetate transport from the bulk solution was an absolute requirement during the bioanode formation.

	C^0 (mol.m ⁻³)	n_e	V_{CH} (m ³)	Q (C)	t (days)
1mm	20	8	1x10 ⁻⁶	15.4	2.3 ± 0.5
5mm	20	8	5x10 ⁻⁶	77.2	2.0 ± 0.2

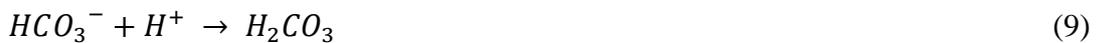
Table 2. Parameter values used to determine the time needed to consume the initial 20 mM of acetate contained inside the channel volume; average values obtained from 6 experimental runs.

4.2 Theoretical approach to mass transport along the channels

Mass transport of the substrate to the electrode is essential and, in addition, it has been shown that mass transport can also severely impact the pH balance of bioanodes. Acetate oxidation led to the formation of protons:



From this equation, it appeared that 1 mole of acetate led to the formation of 9 moles of H⁺ and 2 moles of HCO₃⁻. Each mole of HCO₃⁻ can neutralize 1 mole of H⁺ close to the electrode:



This assumption is valid only at fairly low pH (pK_a = 6.35). Nevertheless, even if the carbonate produced by acetate oxidation consumed the maximum possible amount of protons, 7 moles of H⁺ would still be produced for 1 mole of acetate consumed. The local accumulation of protons has been widely shown to adversely impact bacterial development and the biofilm electrocatalytic activity (Gil et al., 2003; Harnisch and Schröder, 2009; Popat and Torres, 2016; Torres et al., 2008). pH values of less than 6.7 have been shown to lower the electrochemical performance of bioanodes by killing the electroactive bacteria (Franks et al., 2008; Kim and Lee, 2010; Patil et al., 2011). Dhar *et al.* measured the pH gradient inside enriched *Geobacter spp* biofilms (thickness around 130 μm) for concentrations of the phosphate buffer of 2.5, 50 and 100 mM. With phosphate concentrations of 2.5 and 50 mM, they found that local acidification (pH ≤ 6.6) took place in the 40 μm thick inner layer of the bioanodes, which caused bacterial death. Current density was consequently decreased by 40% and 72%, for the phosphate concentrations of 50 mM and 2.5 mM, respectively, relative to that produced with 100 mM phosphate (Dhar et al., 2017). So, to mitigate local acidification near the bioanodes, buffering species must be transported from the bulk solution to the electrode.

In order to assess the impact of mass transport, a simple numerical approach was developed on the basis of the theoretical framework recently detailed elsewhere for micro-structured electrode surfaces (Champigneux et al.). Transport of both the substrate (acetate) and the buffering species (HCO_3^-) inside the channels was modelled. In the present study, buffering was ensured by bicarbonate buffer at 50 mM, which means that the synthetic medium at pH 7.3 contained 45 mM of HCO_3^- ions able to neutralize the H^+ produced.

As demonstrated previously (Champigneux et al.), in the vicinity of the anode surface, mass transport of acetate and HCO_3^- can be assumed to be mainly ensured by diffusion. Migration, playing a minor role, can be neglected. Inside the channels, diffusion is assumed to occur following the x axis across the section area of the channel and to be coupled with the consumption of acetate at the electrode surface (Figure 2). The current is taken to be uniformly distributed along the electrode length. This assumption may be fairly valid during phases I and II, as the electrode colonization is not far from being uniform after 4 days (Figure 7.A). Then, the current probably diverges significantly from a uniform distribution. According to this approach, the differential mass balance done in an elementary unit of thickness dx (Equation 5), only involves the transport by diffusion, which leads to the continuity equation:

$$D \frac{d^2C}{dx^2} = j_{\text{anode}} / (n F h) \quad (10)$$

where D ($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) is the diffusion coefficient of the species, C ($\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}$) the concentration, j_{anode} ($\text{A} \cdot \text{m}^{-2}$) is the current density related to the anode surface area (10 cm^2), F is the Faraday constant ($96485 \text{ C} \cdot \text{mol}^{-1}$), h (m) is the channel height, and n_e is the number of electrons exchanged per mole of substrate consumed. According to the reaction (8), $n = 8$ for acetate and $n = 8/7$ for HCO_3^- , assuming that 2 protons are neutralized by the 2 molecules of HCO_3^- produced by the reaction, so that only 7 HCO_3^- molecules have to come from the bulk.

At the inlet of the channel ($x = 0$) the concentrations are assumed to be equal to the bulk concentration:

$$x = 0, C = C^{\text{bulk}} \quad (11)$$

Mass transport along the channels is assumed to have a plane of symmetry at the centre (Figure 2), so that at $x = L$ ($L = 5 \text{ cm} = \text{half of the channel length}$) the first derivative of the concentration profiles is equal to zero:

$$x = L, \frac{dC}{dx} = 0 \quad (12)$$

With these two boundary conditions, solving equation (10) gives the concentration profiles along the electrode length:

$$C/C_0 = j_{anode} L^2 / (n_e F h D C^{bulk}) (x^2 / (2L^2) - x/L) + 1 \quad (13)$$

where we have the modified Damköhler number Da_{mod} (Scott and Sun, 2007):

$$Da_{mod} = (j_{anode} L) / (n_e F D C^{bulk}) \quad (14)$$

which characterizes the maximum consumption rate by the electrochemical reaction with respect to the maximum diffusion rate, and a geometric ratio:

$$\zeta = L/h \quad (15)$$

which corresponds to the ratio of one-half of the electrode surface area to the section area available for diffusion.

The products ξDa_{mod} (Table 3) were very much higher than 1 for both acetate and HCO_3^- and for both CH1 and CH2 configurations. This means that the consumption rates of acetate and HCO_3^- by the electrochemical reactions (8) and (9) were considerably faster than the maximal diffusion rates inside the channels. Obviously, the situation was worse for the narrower channel (CH1). This simple theoretical approach confirms that mass transport of the substrate, and particularly of the buffering species, was strongly limited inside the channel electrodes.

Actually, such high values of the modified Damköhler number showed that the J_{max} value could not be sustained with a uniform distribution as assumed here for this simple approach. The value of J_{max} was certainly the result of a non-uniform distribution of J_{anode} along the electrode, with higher values at the extremities and lower ones in the central parts. Modelling this situation accurately would require taking the tertiary potential distribution (Lacroix et al., 2014) into account, which would be beyond the scope of the present study.

	h (mm)	D ($m^2 \cdot s^{-1}$)	j_{anode} ($A \cdot m^{-2}$)	n_e	C^{bulk} ($mol \cdot m^{-3}$)	ζ	Da_{mod}	ζDa_{mod}
Acetate	1	$1.64 \cdot 10^{-9}$	5.4	8	20	50	10.3	517
	5	$1.64 \cdot 10^{-9}$	5.4	8	20	10	10.3	103
HCO_3^-	1	$1.18 \cdot 10^{-9}$	5.4	8/7	45	50	46.2	2310
	5	$1.18 \cdot 10^{-9}$	5.4	8/7	45	10	46.2	462

Table 3. Parameter values used to model the diffusion of acetate and HCO_3^- inside the channel devices; the synthetic medium contained 50 mM of bicarbonate buffer at pH 7.3, which means 45 mM of HCO_3^- ions ($pK_a = 6.35$); diffusion coefficients from (Wilke and Chang, 1955).

4.3 Following the initial colonization (phases II and III)

When the acetate initially contained in the channel volume had been completely consumed, i.e. towards the end of phase II (see section 4.1), biofilm development and electrochemical performance were limited by slow mass transfers (see section 4.2). Accordingly, the colonization profiles at days 10 and 31 showed a marked difference between the extremities of the channels and the centre. Biofilm volume ratios were always higher at the extremities and this difference was much more marked on the CH1 electrodes, in which mass transfer was the most constrained. For the same reason, colonization of the CH1 bioanodes was slower than that of the CH5 bioanodes; progress of the internal colonization took more time in the 1-mm-high channels, and the long-term current density was lower (Table 1). These observations are fully consistent with the mass transport limitation expressed by the Damköhler numbers.

4.4 Unsuspected observations and further research needs

In addition to the observations discussed in the three sections above, which were quite easy to explain, the original experimental set-up proposed here also revealed some unsuspected phenomena, opening up new avenues for further basic research on the mechanisms of electroactive biofilm formation.

It was intriguing to note that the start-up time (phase I), i.e. the time necessary for the current to start to be produced, was clearly impacted by the presence or absence of the channel and by the height of the channels (Table 1) while, in contrast, the time required for the current density to reach its maximum (duration of phase II) was not affected, and was equal to around 2 days in all cases. The early colonization of the electrode surface and the mechanisms by which bacteria approach the

electrode and then start to organize an electroactive biofilm on the surface should be the subject of more intensive research, in particular because this early formation phase, during which the biofilm may be the most sensitive to external interventions, might be the most suitable period for driving the biofilm towards the highest possible electroactive efficiency. Here, the electroactive efficiency of the bioanodes inside the channels was fixed in two days. This observation strongly suggests that it will be essential to unravel the mechanisms at work during this short period in order to find levers to boost biofilm electroactivity. In this context, modelling the distribution of the Nernst potential along the electrode may be of interest as it has recently been demonstrated to impact the electroactivity of biofilms (Oliot et al., 2017a).

In the framework of unsuspected results, the decoupling between the evolution of the production of current and the progress of the colonization of the bioanode is noteworthy. The current reached its maximum at the end of phase II and then decreased (phase III) and stabilized (phase IV). In contrast, the biofilm volume continued to increase during phase III in the CH5 channels and even during phase IV in the CH1 channels (Figure 7). Consequently, the current reached its maximum when bacterial colonization showed the lowest biofilm volume coverage ratios and, conversely, the lowest current density was produced at the end of the experiments when microbial colonization of both CH1 and CH5 bioanodes was found to be highest. These observations show the absence of direct correlation between the current density and the global microbial colonization inside a channel a few mm high, which contrasts with some previously reported results on open structures (Champigneux et al.).

Several hypotheses can be suggested. The biofilm development might be related to thickening of the matrix, possibly with DNA release into the matrix, rather than multiplication of the cells. A proportion of the cells might also be dead, notably because of limiting mass transport, while others progress in colonizing the electrode surface. Biofilms may also continue to develop during phases III and IV with non-electroactive cells instead of anode-respiring bacteria. To support or reject these hypotheses, further work is currently in progress to characterize the status of the bioanodes by LIVE/DEAD staining after 4 days and 31 days of polarization and to compare the composition of the microbial communities by 16S RNA sequencing.

Finally, in spite of the detrimental effects, the limited mass transport inside the channels revealed some possibly virtuous effects on the long-term stability here. The free bioanodes did not show excellent stability when maintained for several weeks, some showing drastic falls in current density while, in contrast, all the bioanodes inside channels produced stable and more reproducible long-

term current. Actually, our experience on the medium used here has shown that it was necessary to replace it periodically by fresh medium in order to maintain long-term current density (Oliot et al., 2017c). This effect had so far been attributed to the possible depletion of some micro-nutrients or vitamins. Nevertheless, this hypothesis, which could explain part of the current decrease, cannot explain why the current was more stable inside channels.

The observation made here may suggest that the channel device could protect the biofilm by reducing the opportunities for electroactive bacteria to detach from the electrode surface. Obviously, the channel protected the electrode against all kinds of parasitic liquid movement, but the solution was not stirred and this protecting effect was probably limited. It can also be speculated that the limited mass transport inside the channels resulted in thinner biofilms, which were not at a sufficiently advanced state of development to trigger dispersal mechanisms. When the population density of biofilms reaches a threshold level, internal signals can be produced that induce biofilm dispersion (Boles and Horswill, 2008). The signalling molecules are produced in the deepest layers (Rendueles and Ghigo, 2012) or are linked to quorum sensing (Solano et al., 2014). Here, limited mass transports in the channels may keep the biofilm in an under-developed state, below the threshold where dispersal occurs, while, in contrast, the dispersal phenomena are fully operational in free bioanodes. Further basic research is needed to confirm this hypothesis, which may open up a new way to design bioanode structures and could enhance the stability of current density by limiting the development state of the biofilm.

5. CONCLUSION

The mechanisms of electroactive biofilm settlement inside pores are far from being fully deciphered and designing optimal microbial porous anodes is a fascinating challenge for electrochemical engineers. In this context, an innovative analytical set-up has been presented here. Some of the experimental observations it has brought can be explained by the analysis of mass transports along the channels, while others, more difficult to anticipate, open up intriguing research questioning. In particular, the clear decoupling between the production of current and biofilm development should be an exciting and promising topic to investigate in further research works. Practically, it can be kept in mind that a porosity size of a few millimetres allows electrode colonization on several centimetres of penetration depth and enhances the stability of current density. Nevertheless, it clearly impacts the evolution of the biofilm and limits the maximum current density that can be reached.

Acknowledgements

This work was supported by the French state, managed by the Agence Nationale de la Recherche (ANR), within the framework of the Bioelec project (ANR-13-BIME-006) and the “Koropokkuru” project (ANR-14-CE05-0004).

Declarations of interest

None.

References

- Artyushkova, K., Roizman, D., Santoro, C., Doyle, L.E., Fatima Mohidin, A., Atanassov, P., and Marsili, E. (2016). Anodic biofilms as the interphase for electroactive bacterial growth on carbon veil. *Biointerphases* 11, 031013.
- Baudler, A., Schmidt, I., Langner, M., Greiner, A., and Schroeder, U. (2015). Does it have to be carbon? Metal anodes in microbial fuel cells and related bioelectrochemical systems. *Energy Environ. Sci.* 8, 2048–2055.
- Blanchet, E., Erable, B., De Solan, M.-L., and Bergel, A. (2016). Two-dimensional carbon cloth and three-dimensional carbon felt perform similarly to form bioanode fed with food waste. *Electrochem. Commun.* 66, 38–41.
- Boles, B.R., and Horswill, A.R. (2008). agr-Mediated Dispersal of *Staphylococcus aureus* Biofilms. *PLOS Pathog.* 4, e1000052.
- Bond, D.R., and Lovley, D.R. (2003). Electricity Production by *Geobacter sulfurreducens* Attached to Electrodes. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1548–1555.
- Bond, D.R., Holmes, D.E., Tender, L.M., and Lovley, D.R. (2002). Electrode-Reducing Microorganisms That Harvest Energy from Marine Sediments. *Science* 295, 483–485.
- Caccavo, F., Lonergan, D.J., Lovley, D.R., Davis, M., Stolz, J.F., and McInerney, M.J. (1994). *Geobacter sulfurreducens* sp. nov., a hydrogen- and acetate-oxidizing dissimilatory metal-reducing microorganism. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 3752–3759.
- Cercado, B., Byrne, N., Bertrand, M., Pocaznoi, D., Rimboud, M., Achouak, W., and Bergel, A. (2013). Garden compost inoculum leads to microbial bioanodes with potential-independent characteristics. *Bioresour. Technol.* 134, 276–284.
- Cercado Quezada, B. (2009). Traitement de déchets issus de l'industrie agro-alimentaire par pile à combustible microbienne (Toulouse, INPT).
- Chae, K.-J., Choi, M.-J., Lee, J.-W., Kim, K.-Y., and Kim, I.S. (2009). Effect of different substrates on the performance, bacterial diversity, and bacterial viability in microbial fuel cells. *Bioresour. Technol.* 100, 3518–3525.
- Champigneux, P., Renault-Sentenac, C., Bourrier, D., Rossi, C., Delia, M.-L., and Bergel, A. (2018). Effect of surface nano/micro-structuring on the early formation of microbial anodes with *Geobacter sulfurreducens*: Experimental and theoretical approaches. *Bioelectrochemistry* 121, 191–200.
- Champigneux, P., Renault-Sentenac, C., Bourrier, D., Rossi, C., Delia, M.-L., and Bergel, A. Effect of surface nano/micro-structuring on the early formation of microbial anodes with *Geobacter sulfurreducens*: Experimental and theoretical approaches. *Bioelectrochemistry*.
- Chen, S., Hou, H., Harnisch, F., Patil, S.A., Carmona-Martinez, A.A., Agarwal, S., Zhang, Y., Sinha-Ray, S., Yarin, A.L., Greiner, A., et al. (2011a). Electrospun and solution blown three-dimensional carbon fiber nonwovens for application as electrodes in microbial fuel cells. *Energy Environ. Sci.* 4, 1417–1421.

- Chen, S., He, G., Carmona-Martinez, A.A., Agarwal, S., Greiner, A., Hou, H., and Schröder, U. (2011b). Electrospun carbon fiber mat with layered architecture for anode in microbial fuel cells. *Electrochem. Commun.* 13, 1026–1029.
- Chen, S., Liu, Q., He, G., Zhou, Y., Hanif, M., Peng, X., Wang, S., and Hou, H. (2012a). Reticulated carbon foam derived from a sponge-like natural product as a high-performance anode in microbial fuel cells. *J. Mater. Chem.* 22, 18609–18613.
- Chen, S., He, G., Liu, Q., Harnisch, F., Zhou, Y., Chen, Y., Hanif, M., Wang, S., Peng, X., Hou, H., et al. (2012b). Layered corrugated electrode macrostructures boost microbial bioelectrocatalysis. *Energy Environ. Sci.* 5, 9769–9772.
- Chen, W., Huang, Y.-X., Li, D.-B., Yu, H.-Q., and Yan, L. (2014). Preparation of a macroporous flexible three dimensional graphene sponge using an ice-template as the anode material for microbial fuel cells. *RSC Adv.* 4, 21619–21624.
- Cournet, A., Délia, M.-L., Bergel, A., Roques, C., and Bergé, M. (2010). Electrochemical reduction of oxygen catalyzed by a wide range of bacteria including Gram-positive. *Electrochem. Commun.* 12, 505–508.
- Dhar, B.R., Sim, J., Ryu, H., Ren, H., Santo Domingo, J.W., Chae, J., and Lee, H.-S. (2017). Microbial activity influences electrical conductivity of biofilm anode. *Water Res.* 127, 230–238.
- Erable, B., Byrne, N., Etcheverry, L., Achouak, W., and Bergel, A. (2017). Single medium microbial fuel cell: Stainless steel and graphite electrode materials select bacterial communities resulting in opposite electrocatalytic activities. *Int. J. Hydrog. Energy* 42, 26059–26067.
- Franks, A.E., Nevin, K.P., Jia, H., Izallalen, M., Woodard, T.L., and Lovley, D.R. (2008). Novel strategy for three-dimensional real-time imaging of microbial fuel cell communities: monitoring the inhibitory effects of proton accumulation within the anode biofilm. *Energy Environ. Sci.* 2, 113–119.
- Gil, G.-C., Chang, I.-S., Kim, B.-H., Kim, M., Jang, J.-K., Park, H.S., and Kim, H.-J. (2003). Operational parameters affecting the performance of a mediator-less microbial fuel cell. *Biosens. Bioelectron.* 18, 327–334.
- Green, D.W., and Perry, R.H. (2007). *Perry's Chemical Engineers' Handbook*, Eighth Edition (New York, NY: McGraw-Hill Professional).
- Harnisch, F., and Schröder, U. (2009). Selectivity versus mobility: separation of anode and cathode in microbial bioelectrochemical systems. *ChemSusChem* 2, 921–926.
- Hou, J., Liu, Z., Yang, S., and Zhou, Y. (2014). Three-dimensional macroporous anodes based on stainless steel fiber felt for high-performance microbial fuel cells. *J. Power Sources* 258, 204–209.
- Huang, L., Li, X., Ren, Y., and Wang, X. (2016). A monolithic three-dimensional macroporous graphene anode with low cost for high performance microbial fuel cells. *RSC Adv.* 6, 21001–21010.
- Jiang, H., Halverson, L.J., and Dong, L. (2015). A miniature microbial fuel cell with conducting nanofibers-based 3D porous biofilm. *J. Micromechanics Microengineering* 25, 125017.
- Jumas-Bilak, E., Roudière, L., and Marchandin, H. (2009). Description of “Synergistetes” phyl. nov. and emended description of the phylum “Deferribacteres” and of the family Syntrophomonadaceae, phylum “Firmicutes.” *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59, 1028–1035.
- Karthikeyan, R., Wang, B., Xuan, J., Wong, J.W.C., Lee, P.K.H., and Leung, M.K.H. (2015). Interfacial electron transfer and bioelectrocatalysis of carbonized plant material as effective anode of microbial fuel cell. *Electrochimica Acta* 157, 314–323.
- Ketep, S.F., Bergel, A., Calmet, A., and Erable, B. (2014). Stainless steel foam increases the current produced by microbial bioanodes in bioelectrochemical systems. *Energy Environ. Sci.* 7, 1633–1637.
- Kim, M.-S., and Lee, Y. (2010). Optimization of culture conditions and electricity generation using *Geobacter sulfurreducens* in a dual-chambered microbial fuel-cell. *Int. J. Hydrog. Energy* 35, 13028–13034.
- Kimura, Z., and Okabe, S. (2013). Acetate oxidation by syntrophic association between *Geobacter sulfurreducens* and a hydrogen-utilizing exoelectrogen. *ISME J.* 7, 1472–1482.

- Koch, C., and Harnisch, F. (2016). Is there a Specific Ecological Niche for Electroactive Microorganisms? *ChemElectroChem* 3, 1282–1295.
- Lacroix, R., Silva, S.D., Gaig, M.V., Rousseau, R., Délia, M.-L., and Bergel, A. (2014). Modelling potential/current distribution in microbial electrochemical systems shows how the optimal bioanode architecture depends on electrolyte conductivity. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 16, 22892–22902.
- Lepage, G., Albernaz, F.O., Perrier, G., and Merlin, G. (2012). Characterization of a microbial fuel cell with reticulated carbon foam electrodes. *Bioresour. Technol.* 124, 199–207.
- Lin, X., Nishio, K., Konno, T., and Ishihara, K. (2012). The effect of the encapsulation of bacteria in redox phospholipid polymer hydrogels on electron transfer efficiency in living cell-based devices. *Biomaterials* 33, 8221–8227.
- Liu, M., Zhou, M., Yang, H., Zhao, Y., and Hu, Y. (2015). A cost-effective polyurethane based activated carbon sponge anode for high-performance microbial fuel cells. *RSC Adv.* 5, 84269–84275.
- Liu, M., Zhou, M., Yang, H., Ren, G., and Zhao, Y. (2016). Titanium dioxide nanoparticles modified three dimensional ordered macroporous carbon for improved energy output in microbial fuel cells. *Electrochimica Acta* 190, 463–470.
- Liu, X., Du, X., Wang, X., Li, N., Xu, P., and Ding, Y. (2013). Improved microbial fuel cell performance by encapsulating microbial cells with a nickel-coated sponge. *Biosens. Bioelectron.* 41, 848–851.
- Liu, Y., Harnisch, F., Fricke, K., Sietmann, R., and Schröder, U. (2008). Improvement of the anodic bioelectrocatalytic activity of mixed culture biofilms by a simple consecutive electrochemical selection procedure. *Biosens. Bioelectron.* 24, 1006–1011.
- Liu, Y., Harnisch, F., Fricke, K., Schröder, U., Climent, V., and Feliu, J.M. (2010). The study of electrochemically active microbial biofilms on different carbon-based anode materials in microbial fuel cells. *Biosens. Bioelectron.* 25, 2167–2171.
- Logan, B.E. (2009). Exoelectrogenic bacteria that power microbial fuel cells. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 375–381.
- Logan, B.E., and Regan, J.M. (2006). Electricity-producing bacterial communities in microbial fuel cells. *Trends Microbiol.* 14, 512–518.
- Lovley, D.R. (2006). Bug juice: harvesting electricity with microorganisms. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 497–508.
- Massazza, D., Parra, R., Busalmen, J.P., and Romeo, H.E. (2015). New ceramic electrodes allow reaching the target current density in bioelectrochemical systems. *Energy Environ. Sci.* 8, 2707–2712.
- Oliot, M. (2017). Bio-ingénierie pour les piles à combustible microbiennes (Toulouse, INPT).
- Oliot, M., Chong, P., Erable, B., and Bergel, A. (2017a). Influence of the electrode size on microbial anode performance. *Chem. Eng. J.* 327, 218–227.
- Oliot, M., Erable, B., Solan, M.-L.D., and Bergel, A. (2017b). Increasing the temperature is a relevant strategy to form microbial anodes intended to work at room temperature. *Electrochimica Acta* 258, 134–142.
- Oliot, M., Etcheverry, L., Mosdale, A., Basseguy, R., Délia, M.-L., and Bergel, A. (2017c). Separator electrode assembly (SEA) with 3-dimensional bioanode and removable air-cathode boosts microbial fuel cell performance. *J. Power Sources* 356, 389–399.
- Parot, S. (2007). Biofilms électroactifs : formation, caractérisation et mécanismes (Toulouse, INPT).
- Parot, S., Délia, M.-L., and Bergel, A. (2008b). Acetate to enhance electrochemical activity of biofilms from garden compost. *Electrochimica Acta* 53, 2737–2742.
- Parot, S., Délia, M.-L., and Bergel, A. (2008a). Forming electrochemically active biofilms from garden compost under chronoamperometry. *Bioresour. Technol.* 99, 4809–4816.
- Patil, S.A., Harnisch, F., Koch, C., Hübschmann, T., Fetzer, I., Carmona-Martínez, A.A., Müller, S., and Schröder, U. (2011). Electroactive mixed culture derived biofilms in microbial

- bioelectrochemical systems: The role of pH on biofilm formation, performance and composition. *Bioresour. Technol.* *102*, 9683–9690.
- Pocaznoi, D. (2012). Optimisation d'anodes microbiennes à partir de lixiviat de sol pour la conception de piles à combustible microbiennes (Toulouse, INPT).
- Pocaznoi, D., Calmet, A., Etcheverry, L., Erable, B., and Bergel, A. (2012). Stainless steel is a promising electrode material for anodes of microbial fuel cells. *Energy Environ. Sci.* *5*, 9645–9652.
- Popat, S.C., and Torres, C.I. (2016). Critical transport rates that limit the performance of microbial electrochemistry technologies. *Bioresour. Technol.* *215*, 265–273.
- Qiao, Y., Bao, S.-J., Li, C.M., Cui, X.-Q., Lu, Z.-S., and Guo, J. (2008). Nanostructured polyaniline/titanium dioxide composite anode for microbial fuel cells. *ACS Nano* *2*, 113–119.
- Read, S.T., Dutta, P., Bond, P.L., Keller, J., and Rabaey, K. (2010). Initial development and structure of biofilms on microbial fuel cell anodes. *BMC Microbiol.* *10*, 98.
- Reguera, G., Pollina, R.B., Nicoll, J.S., and Lovley, D.R. (2007). Possible Nonconductive Role of *Geobacter sulfurreducens* Pilus Nanowires in Biofilm Formation. *J. Bacteriol.* *189*, 2125–2127.
- Ren, H., Tian, H., Gardner, C.L., Ren, T.-L., and Chae, J. (2016). A miniaturized microbial fuel cell with three-dimensional graphene macroporous scaffold anode demonstrating a record power density of over 10 000 W m⁻³. *Nanoscale* *8*, 3539–3547.
- Rendueles, O., and Ghigo, J.-M. (2012). Multi-species biofilms: how to avoid unfriendly neighbors. *FEMS Microbiol. Rev.* *36*, 972–989.
- Rimboud, M., Pocaznoi, D., Erable, B., and Bergel, A. (2014). Electroanalysis of microbial anodes for bioelectrochemical systems: basics, progress and perspectives. *Phys. Chem. Chem. Phys.* *16*, 16349–16366.
- Rothballer, M., Picot, M., Sieper, T., Arends, J.B.A., Schmid, M., Hartmann, A., Boon, N., Buisman, C.J.N., Barrière, F., and Strik, D.P.B.T.B. (2015). Monophyletic group of unclassified γ -Proteobacteria dominates in mixed culture biofilm of high-performing oxygen reducing biocathode. *Bioelectrochemistry* *106*, 167–176.
- Rousseau, R., Dominguez-Benetton, X., Délia, M.-L., and Bergel, A. (2013). Microbial bioanodes with high salinity tolerance for microbial fuel cells and microbial electrolysis cells. *Electrochem. Commun.* *33*, 1–4.
- Santoro, C., Arbizzani, C., Erable, B., and Ieropoulos, I. (2017). Microbial fuel cells: From fundamentals to applications. A review. *J. Power Sources* *356*, 225–244.
- Scott, K., and Sun, Y.-P. (2007). Approximate Analytical Solutions for Models of Three-Dimensional Electrodes by Adomian's Decomposition Method. In *Modern Aspects Of Electrochemistry*, (Springer, New York, NY), pp. 221–304.
- Solano, C., Echeverz, M., and Lasa, I. (2014). Biofilm dispersion and quorum sensing. *Curr. Opin. Microbiol.* *18*, 96–104.
- Sun, Y., Wei, J., Liang, P., and Huang, X. (2011). Electricity generation and microbial community changes in microbial fuel cells packed with different anodic materials. *Bioresour. Technol.* *102*, 10886–10891.
- Torres, C.I., Kato Marcus, A., and Rittmann, B.E. (2008). Proton transport inside the biofilm limits electrical current generation by anode-respiring bacteria. *Biotechnol. Bioeng.* *100*, 872–881.
- Wang, H., and Ren, Z.J. (2013). A comprehensive review of microbial electrochemical systems as a platform technology. *Biotechnol. Adv.* *31*, 1796–1807.
- Wang, H., Wang, G., Ling, Y., Qian, F., Song, Y., Lu, X., Chen, S., Tong, Y., and Li, Y. (2013). High power density microbial fuel cell with flexible 3D graphene-nickel foam as anode. *Nanoscale* *5*, 10283–10290.
- Wang, Y.-Q., Huang, H.-X., Li, B., and Li, W.-S. (2015). Novelty developed three-dimensional carbon scaffold anodes from polyacrylonitrile for microbial fuel cells. *J. Mater. Chem. A* *3*, 5110–5118.

- Wilke, C.R., and Chang, P. (1955). Correlation of diffusion coefficients in dilute solutions. *AIChE J. 1*, 264–270.
- Xie, X., Yu, G., Liu, N., Bao, Z., Criddle, C.S., and Cui, Y. (2012a). Graphene–sponges as high-performance low-cost anodes for microbial fuel cells. *Energy Environ. Sci. 5*, 6862–6866.
- Xie, X., Meng, Y., and Yi, C. (2012b). Carbon nanotube-coated macroporous sponge for microbial fuel cell electrodes. *5265–5270*.
- Xie, X., Criddle, C., and Cui, Y. (2015). Design and fabrication of bioelectrodes for microbial bioelectrochemical systems. *Energy Environ. Sci. 8*, 3418–3441.
- Yamashita, T., Ishida, M., Asakawa, S., Kanamori, H., Sasaki, H., Ogino, A., Katayose, Y., Hatta, T., and Yokoyama, H. (2016). Enhanced electrical power generation using flame-oxidized stainless steel anode in microbial fuel cells and the anodic community structure. *Biotechnol. Biofuels 9*, 62.
- Yang, Y., Liu, T., Zhu, X., Zhang, F., Ye, D., Liao, Q., and Li, Y. (2016). Boosting Power Density of Microbial Fuel Cells with 3D Nitrogen-Doped Graphene Aerogel Electrode. *Adv. Sci. 3*.
- Yoshida, N., Yano, K., Morita, T., McNiven, S.J., Nakamura, H., and Karube, I. (2000). A mediator-type biosensor as a new approach to biochemical oxygen demand estimation. *Analyst 125*, 2280–2284.
- Yuan, Y., Zhou, S., Liu, Y., and Tang, J. (2013). Nanostructured macroporous bioanode based on polyaniline-modified natural loofah sponge for high-performance microbial fuel cells. *Environ. Sci. Technol. 47*, 14525–14532.
- Zeng, L., Zhao, S., and He, M. (2018). Macroscale porous carbonized polydopamine-modified cotton textile for application as electrode in microbial fuel cells. *J. Power Sources 376*, 33–40.
- Zhang, G., Zhao, Q., Jiao, Y., Wang, K., Lee, D.-J., and Ren, N. (2012). Biocathode microbial fuel cell for efficient electricity recovery from dairy manure. *Biosens. Bioelectron. 31*, 537–543.
- Zhang, T., Zhang, L., Su, W., Gao, P., Li, D., He, X., and Zhang, Y. (2011). The direct electrocatalysis of phenazine-1-carboxylic acid excreted by *Pseudomonas alcaliphila* under alkaline condition in microbial fuel cells. *Bioresour. Technol. 102*, 7099–7102.
- Zhao, S., Li, Y., Yin, H., Liu, Z., Luan, E., Zhao, F., Tang, Z., and Liu, S. (2015). Three-dimensional graphene/Pt nanoparticle composites as freestanding anode for enhancing performance of microbial fuel cells. *Sci. Adv. 1*, e1500372.

Dans cet article, les résultats essentiels sont :

- Les chronoampérométries de 31 jours avec les dispositifs « canal » montrent une allure d'évolution de la densité de courant en 4 phases : I) Une première phase de latence au cours de laquelle aucun courant n'est enregistré.. Elle est suivie par II) une phase durant laquelle le courant augmente de façon sigmoïdale jusqu'à atteindre une valeur maximale J_{\max} avant III) de diminuer progressivement pendant plusieurs jours et IV) se stabiliser à une valeur dite « à long terme ».
- La hauteur du canal a un effet sur le temps nécessaire au démarrage du courant et sur la valeur de la densité du courant à long terme : en diminuant la hauteur du canal de 5 à 1 mm, le temps de latence est multiplié par deux et le courant à long terme est 25% plus faible.
- La densité de courant maximale des électrodes situées dans les canaux est largement inférieure à celle des électrodes contrôles : 5.4 ± 1.5 vs. 13.1 ± 2.9 A.m⁻².
- L'évaluation théorique des phénomènes de transport de matière au sein du canal via une équation simplifiée de diffusion-réaction, a mis en évidence une forte limitation liée aux transports du substrat et surtout des espèces tampons au sein des canaux. Cette limitation par les transports de matière explique la différence de performance considérable entre les électrodes contrôles et celles placées dans les canaux.
- Un résultat surprenant a été de constater qu'une fois le démarrage du courant initié, il suffit de 2 jours pour atteindre les densités de courant maximales. Ceci est vérifié aussi bien pour les électrodes situées dans les canaux que pour les électrodes de contrôle. Il semblerait que le biofilm EA soit au summum de son activité catalytique à la fin de cette courte période de 2 jours. La connaissance des mécanismes impliqués lors de cette période permettrait certainement de trouver des pistes de recherche afin de booster l'activité électrocatalytique des biofilms. Ceci pourrait constituer un axe de recherche pour de futurs travaux.
- Une analyse statistique du biovolume des biofilms formés sur les électrodes situées dans les canaux de 1 et 5 mm a été menée pour caractériser la colonisation à 4, 10 et 31 jours.
- Un découplage est systématiquement observé entre la production de courant et la colonisation des électrodes situées dans les canaux. En effet, au bout de 4 jours les électrodes présentent de faibles densités de biomasse microbienne, alors que les densités de courant enregistrées sont maximales (J_{\max}). Ce même phénomène, assez paradoxal, est observé pour l'échéance de 31 jours ; dans ce cas les densités de biomasse sont plus élevées et des densités de courant plus faibles.

Pour expliquer ce phénomène de découplage entre la production de courant et la colonisation microbienne, deux hypothèses sont émises :

- *Hypothèse 1* : les quantités de bactéries électroactives sont différentes au jour 4 et au jour 31. Suivant cette hypothèse, au jour 4 les bactéries EA seraient plus nombreuses qu'au jour 31. Ce seraient donc des bactéries non-électroactives qui se développeraient au sein des dispositifs « canal » durant les phases III et IV.
- *Hypothèse 2* : Le ratio entre les bactéries vivantes et les bactéries mortes est différent à 4 et 31 jours. Dans ce cas, la quantité importante de biomasse détectée sur les électrodes de 31 jours comprendrait un grand nombre de bactéries mortes alors qu'à 4 jours le taux de viabilité des bactéries serait bien plus important.

3.2 Résultats complémentaires non présentés dans l'article

3.2.1 Profil de colonisation des électrodes simples (contrôles sans canal)

Comme énoncé dans l'article, les densités de courant produites à long terme (31 jours) par les électrodes de contrôle, c'est-à-dire hors des dispositifs « canal » sont assez erratiques. Parfois, les électrodes de contrôle arrivent à maintenir des densités de courant élevées qui restent supérieures à celles des électrodes situées dans les canaux (Cas n°1). Dans d'autres cas, au bout de 10 jours, leurs densités de courant diminuent progressivement jusqu'à devenir inférieures à celles des électrodes situées dans les canaux (Cas n°2). L'hypothèse émise pour expliquer ce phénomène (Cas n°2), serait liée à l'âge avancé du biofilm qui entrainerait sa dispersion suite à une augmentation considérable de la densité des populations microbiennes sur l'électrode au cours du temps. Il est connu que les densités microbiennes importantes peuvent engendrer la production de signaux spécifiques qui induisent la dispersion du biofilm (Boles et Horswill 2008). Cette hypothèse pourrait être étayée par le profil de colonisation des électrodes simples établi après 31 jours de polarisation (Figure 8). Comme on peut le voir dans le Cas n°1, la surface de l'électrode simple est bien colonisée tandis que dans le Cas n°2 très peu de biomasse bactérienne est visible sur l'électrode. Ces observations sont en cohérence avec l'hypothèse de la dispersion du biofilm.

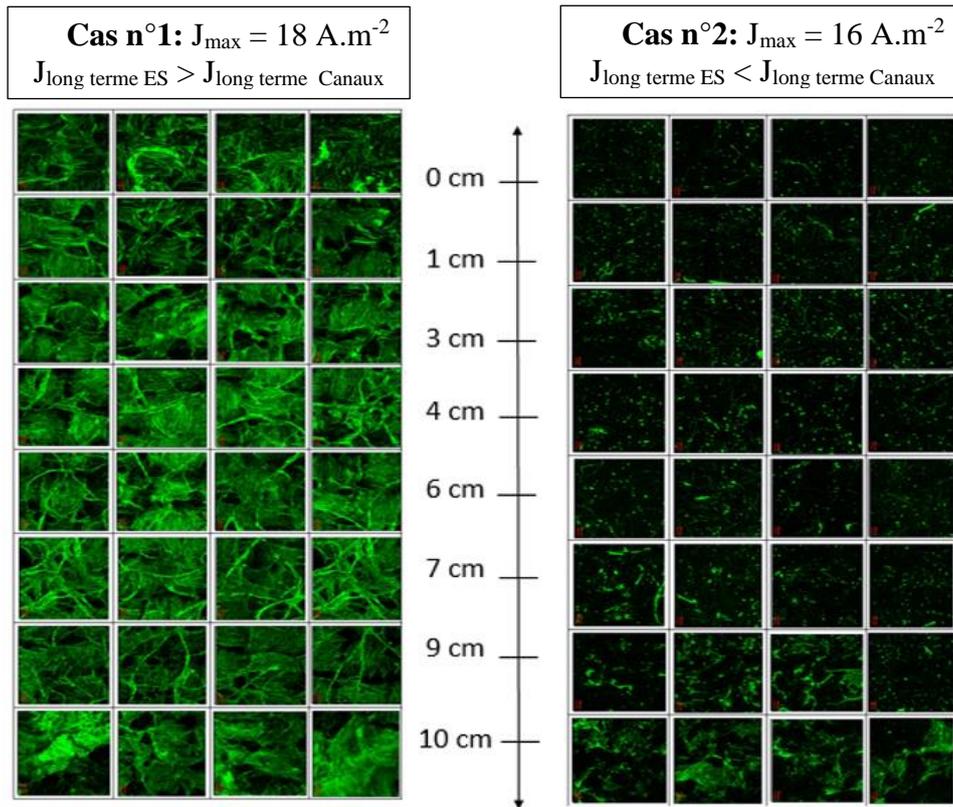


Figure 8 : Images prises au microscope à épifluorescence illustrant le profil de colonisation des électrodes simples (contrôles) lorsque le courant à long terme est supérieur (gauche) ou inférieur (droite) à celui des électrodes situées dans les canaux.

3.2.2 Analyse des populations microbiennes

Les populations microbiennes des biofilms ont été identifiées grâce au pyroséquençage du gène codant pour l'ARN 16S. L'analyse a été réalisée sur quatre réacteurs « Multi-anodes », un duplicata ayant opéré 4 jours (R1 et R2) et un autre 31 jours (R3 et R4). Le but de cette analyse était d'apporter des éléments de discussion des hypothèses émises pour expliquer le découplage entre la production de courant et la colonisation microbienne des électrodes.

A titre de rappel, un réacteur « Multi-anodes » contient : 1 bioanode primaire qui sert d'inoculum, 1 électrode simple (contrôle), 1 dispositif canal de 1 mm et un dispositif canal de 5 mm.

Les populations microbiennes de l'ensemble des électrodes ont été identifiées : les bioanodes primaires (ayant servi d'inoculum) et les bioanodes secondaires (l'électrode simple et les électrodes dans les canaux de 5 et 1 mm de hauteur).

Pour les bioanodes primaires un seul morceau d'électrode a été prélevé. Pour les bioanodes secondaires, les électrodes ont été divisées en trois parties (A, B et C) selon le schéma de la Figure 12. L'estimation du biovolume du biofilm sur les électrodes situées dans les canaux (Figure 7, Article section 3.1) a révélé que la partie centrale, en particulier pour les canaux de 1 mm) présentait toujours des densités de biomasse microbienne plus faibles que les extrémités. Afin de s'assurer d'avoir une quantité d'ADN suffisante pour les analyses il a été choisi d'élargir la partie centrale B par rapport aux extrémités A et C.

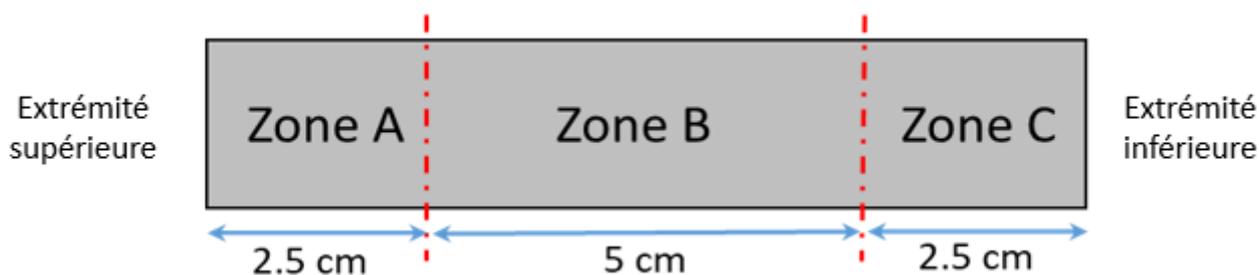


Figure 9 : Echantillonnage des biofilms formés sur les bioanodes secondaires.

Les échantillons provenant des bioanodes primaires sont désignés par « AP », ceux provenant des électrodes simples par « ES » et ceux issus des électrodes situées dans les canaux par « 1mm » et « 5mm ».

Pour les électrodes secondaires, la zone d'échantillonnage est également précisée par A, B ou C pour respectivement l'extrémité supérieure, la partie centrale et l'extrémité inférieure des électrodes.

Enfin, les duplicas sont différenciés via le nom du réacteur : pour les manipulations de 4 jours, les réacteurs R1 et R2 sont des duplicas, de même que les réacteurs R3 et R4 pour les manipulations de 31 jours. Ainsi, l'échantillon R1-1mm-A correspond au biofilm prélevé sur le dispositif « canal » en carbone de 1 mm au niveau de l'extrémité supérieure du canal après 4 jours de polarisation.

Analyse après 4 jours de polarisation

L'analyse de la répartition des populations microbiennes au niveau taxonomique du phylum révèle la nette prédominance du phylum des *Proteobacteria* (55 à 98%) dans l'ensemble des échantillons (Figure 10). Ce phylum bactérien est celui qui revient le plus souvent parmi les communautés microbiennes formant les biofilms électroactifs et il est souvent cité pour jouer un rôle important dans les processus de transfert extracellulaires d'électrons (Koch and Harnisch, 2016; Rothballer et al., 2015; Zhang et al., 2012; Liu et al., 2010; Logan and Regan, 2006; Lovley, 2006;). Le deuxième phylum majoritaire est soit celui des Firmicutes (de 2 à 18%) soit un ensemble de phyla non classifiés à ce jour dans la base de données NCBI.

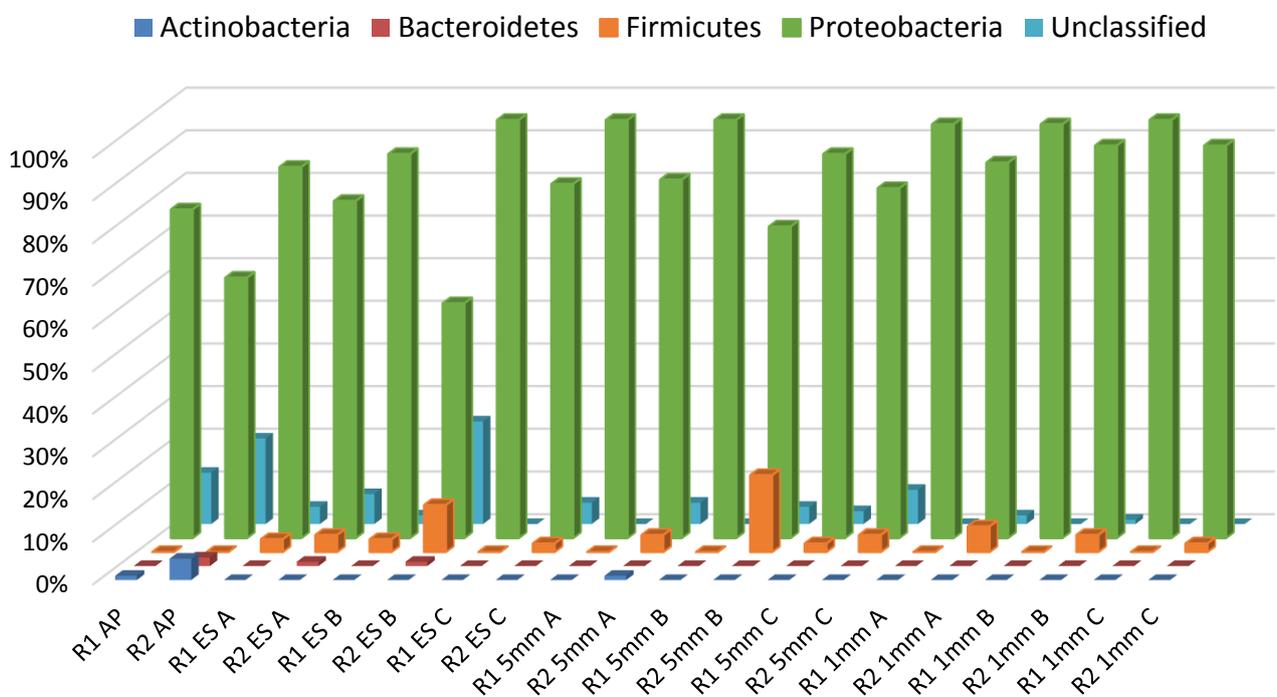


Figure 10 : Abondances relatives des populations bactériennes au niveau taxonomique du phylum dans les biofilms de 4 jours prélevés sur les électrodes simples et les électrodes situées dans les canaux de 1 mm et 5 mm.

Au sein des deux principaux phyla identifiés (Proteobacteria et Firmicutes), l'analyse au niveau du rang taxonomique de la classe (Figure 11) montre que le phylum *Proteobacteria* renferme principalement les classes *Beta*-, *Gamma*- et *Delta-Proteobacteria* et que le phylum *Firmicutes* est uniquement composé de la classe des *Clostridia*.

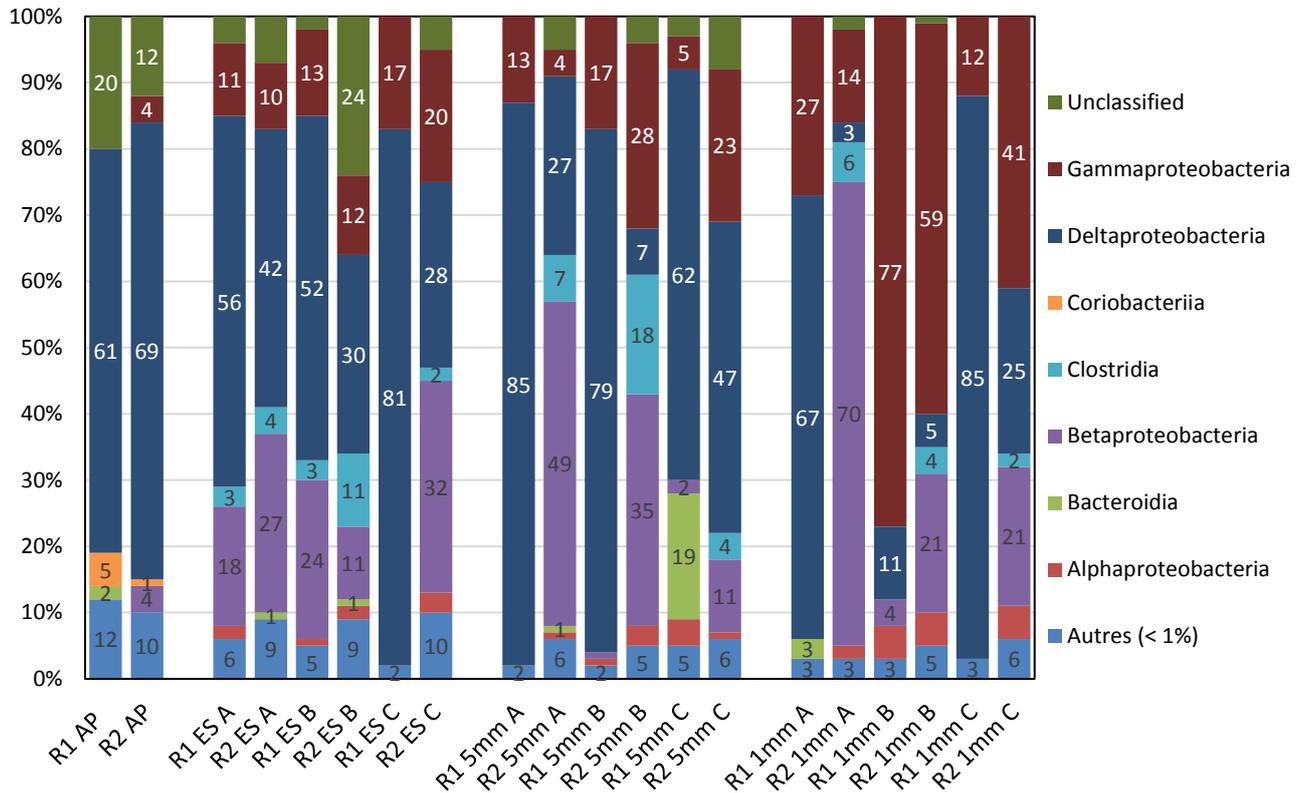


Figure 11 : Comparaison des abondances relatives des populations bactériennes au niveau taxonomique de la classe dans les biofilms de 4 jours prélevés sur les électrodes simples, les électrodes situées dans les canaux de 1 mm et 5 mm. Les classes détectées à un seuil inférieur à 1% sont classifiées dans « Autres ».

Près de 90% des communautés bactériennes présentes sur les deux bioanodes primaires des réacteurs R1 et R2 sont similaires au moins au rang taxonomique de la classe. En effet, sur les deux bioanodes primaires :

- la classe majoritaire est celle des *Deltaproteobacteria* avec 61% sur la bioanode primaire issue de R1 et 69% sur la bioanode primaire issue de R2.
- Au deuxième rang se trouve un ensemble de classes non classifiées à ce jour dans la base de données NCBI qui couvre entre 12 à 20% de la population totale identifiée.

- En moyenne, 11% des populations microbiennes sont détectées à une proportion inférieure à 1%.

Les 10% de familles restantes diffèrent. Les classes minoritairement représentées sont alors :

- Les Coriobacteriia (5%) et les Bacteroidia (2%) pour R1
- Les Gammaproteobacteria (4%) et les Betaproteobacteria (4%) pour R2

Ces différences minimes résultent sans doute des conditions environnementales (complexité de la population microbienne contenue dans le lixiviat de terreau, possibilité de traces d'oxygène dissous non contrôlées car les réacteurs n'étaient pas totalement étanches...) qui ont pu être légèrement différentes soit au sein des deux réacteurs ayant servi à leur formation (étape 1), soit au sein des deux réacteurs multi-anodes (étape 2).

Concernant la colonisation des anodes secondaires (électrodes simples (ES) et électrodes situées dans les canaux), on constate que la classe des *Deltaproteobacteria*, qui est majoritaire sur les anodes primaires, est conservée sur l'ensemble des échantillons : tantôt en tant que classe dominante (11 cas sur 18), tantôt en tant que deuxième classe majoritaire (4 cas sur 18) et parfois en tant que classe minoritaire (3 cas sur 18). Il faut noter que la prédominance de cette classe est moins marquée sur les électrodes situées dans les canaux que sur les électrodes simples. Sur un total de 18 échantillons analysés, soit 6 pour chaque électrode simple et pour chaque électrode située dans les canaux de 1 et 5 mm : 5 sont dominés par les *Deltaproteobacteria* au niveau des ES contre seulement 4 et 2 pour respectivement les canaux de 5 et 1 mm.

Le passage des anodes primaires aux anodes secondaires s'accompagne également d'un enrichissement en certaines classes bactériennes telles que les *Betaproteobacteria*, les *Gammaproteobacteria* et les *Clostridia* qui ne représentaient qu'en moyenne pas plus de 2% de la population totale identifiée sur les deux bioanodes primaires. Pour caractériser cet enrichissement, il est considéré ici qu'une classe a été enrichie dès lors que son abondance relative détectée sur les anodes secondaires est supérieure à la proportion moyenne de cette même classe issue des deux anodes primaires. Le Tableau 4 fait état des enrichissements opérés des classes bactériennes, seules les classes ayant subi une sélection sur plus de deux échantillons d'électrodes sont discutées, le but étant de dégager les grandes lignes de cet enrichissement.

Dans le Tableau 4, pour une même classe de bactéries, l'abondance relative relevée sur les anodes primaires est d'abord rappelée (1^{ère} colonne), puis comparée aux valeurs minimales et maximales des abondances relatives détectée sur les échantillons des biofilms secondaires (2^{ème} colonne). Une attention particulière a été portée sur l'évolution de l'enrichissement le long des électrodes secondaires (3^{ème} colonne). L'idée est de voir si une tendance se dégage en fonction des zones A, B et C (illustrées à la Figure 12). Enfin, le cas échéant, le nombre et l'identité des échantillons n'étant pas concernés par cet enrichissement sont indiqués (4^{ème} colonne).

Tableau 4 : Identification des enrichissements au rang taxonomique des classes des biofilms EA secondaires de 4 jours.

<i>Classe</i> % moyen sur les anodes primaires	Min et max des abondances relatives détectées sur les anodes secondaires	Evolution de l'enrichissement le long de l'électrode	Nombre d'échantillons non concernés par la sélection
<i>Betaproteobacteria</i> 2%	ES : 11-32%	Aléatoire le long de l'électrode	1/6 R1-ES-C
	5mm : 11-49%	Uniquement sur les électrodes de R2 / Marquée en A (49%)	3/6 R1-5mm-A R1-5mm-B R1-5mm-C
	1mm : 21-70%	Uniquement sur les électrodes de R2 / Marquée en A (70%)	3/6 R1-1mm-A R1-1mm-B R1-1mm-C
<i>Gammaproteobacteria</i> 2%	ES : 10-20 %	Aléatoire le long de l'électrode	1/6 R1-ES-A
	5mm : 5-28%	Aléatoire le long de l'électrode	1/6 R2-5mm-A
	1mm : 12-77%	Le long de l'électrode avec accentuation au centre	0/6
<i>Clostridia</i> < 1%	ES : 2-11%	Aléatoire le long de l'électrode	1/6 R1-ES-C
	5mm : 4-18%	Uniquement sur les électrodes de R2	3/6 R1-5mm-A R1-5mm-B R1-5mm-C
	1mm : 2-6%	Uniquement sur les électrodes de R2	3/6 R1-1mm-A R1-1mm-B R1-1mm-C

L'analyse de ce tableau fait apparaître que la sélection des *Gammaproteobacteria* se fait de façon systématique sur une grande majorité des échantillons des électrodes secondaires (16 sur 18) et ce, indépendamment du type d'électrode secondaire, qu'il s'agisse d'une électrode simple ou d'une électrode située dans un canal. Cette classe ne semble avoir aucune difficulté à se développer de façon homogène sur toute la longueur des électrodes simples et de celles situées dans les canaux de 5 mm. Sur les électrodes situées dans les canaux de 1 mm elle semble proliférer de manière plus significative au centre du canal avec une augmentation de sa proportion allant jusqu'à 77%.

Des tendances similaires sont observées pour l'enrichissement des classes des *Betaproteobacteria* et des *Clostridia*. Ces deux classes deviennent plus abondantes sur les duplicatas des électrodes simples au centre ou aux extrémités sans distinction. Cependant, pour les électrodes situées dans les canaux de 1 et 5 mm, on ne retrouve cet enrichissement en *Betaproteobacteria* et *Clostridia* que sur les électrodes issues du réacteur R2. Ce constat pourrait appuyer nos précédentes suppositions selon lesquelles les conditions environnementales du réacteur R2 diffèrent de celles du réacteur R1 (problème d'étanchéité). Une autre explication serait que les deux bioanodes primaires initialement formées dans le lixiviat de terreau présentent des différences en termes de communautés bactériennes. Pour trancher entre ces deux hypothèses, nous aurions dû prélever un échantillon du biofilm primaire à la fin de l'étape 1 et réaliser une analyse globale des communautés bactériennes de ce biofilm.

En descendant dans les rangs taxonomiques, au niveau du genre cette fois-ci (Figure 12), il est noté que le genre *Geobacter* (issu de la classe *Deltaproteobacteria*) est détecté dans tous les échantillons d'électrodes primaires et secondaires avec une dominance sur 65% de nos échantillons. Au sein du genre *Geobacter*, l'espèce majoritairement identifiée est *Geobacter sulfurreducens* dont l'électroactivité et la présence au sein de communautés électroactives a déjà été mise en évidence dans de nombreuses études (Bond et al., 2002; Bond and Lovley, 2003; Reguera et al., 2007). Cette espèce bactérienne électroactive est sans aucun doute l'espèce électroactive la plus rencontrée dans la bibliographie (Koch and Harnisch, 2016). Son importante prolifération sur nos échantillons suggère que l'électroactivité des bioanodes est liée en grande partie à la sélection de cette espèce. Par ailleurs, il peut être noté que le genre *Geobacter* est beaucoup moins présent sur les électrodes placées dans les canaux de 1 mm. Ces électrodes ont du reste produit les plus faibles densités de courant.

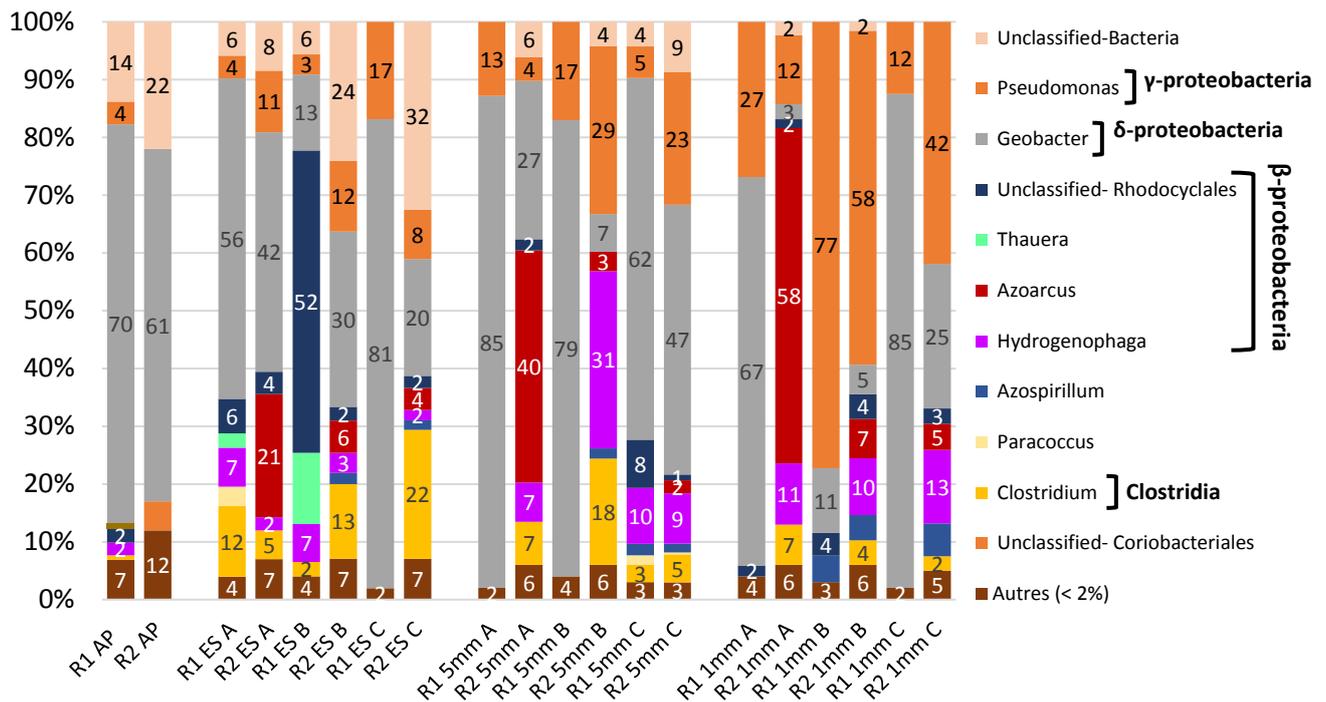


Figure 12 : Abondances relatives des populations bactériennes au niveau taxonomique du genre dans les biofilms de 4 jours prélevés sur les électrodes simples, les électrodes situées dans les canaux de 1 mm et 5 mm. Les électrodes secondaires sont divisées en 3 zones A, B et C. Les classes détectées à un seuil inférieur à 2% sont classifiées dans « Autres ».

Le genre *Pseudomonas* (*Gammaproteobacteria*) est également omniprésent dans tous les biofilms avec néanmoins une proportion inférieure à 2% sur l'échantillon R2-AP (anode primaire du réacteur R2). Ce genre regroupe des bactéries aérobies ubiquitaires largement répandues dans l'environnement tels que les sols et les eaux polluées et participent à la biodégradation de polluants présents dans les sols. Une identification plus précise de l'espèce ou des espèces de ce genre *Pseudomonas* n'a pas abouti pour nos échantillons, mais l'électroactivité de nombreuses espèces de *Pseudomonas* a déjà été mise en évidence, telles que *P. aeruginosa* (Cournet et al., 2010), *P. alcaliphila* (Zhang et al., 2011) ou encore *P. fluorescence* (Yoshida et al., 2000). Une proportion plus importante de ce genre *Pseudomonas* est retrouvée au centre des électrodes situées dans les canaux de 1 mm avec des abondances relatives de 77% (R1) et 54% (R2). Leur enrichissement important sur les électrodes secondaires laisse penser qu'il s'agit de possibles bactéries électroactives.

Quatre genres issus des *Betaproteobacteria* sont détectés sur les échantillons des biofilms secondaires dont trois sont fréquemment retrouvés : *Hydrogenophaga*, *Azoarcus* et un genre non identifié *Unclassified-Rhodocyclales*. Pour *Hydrogenophaga* et *Azoarcus*, l'identification précise jusqu'à l'espèce n'a pu aboutir. Pour le genre *Hydrogenophaga*, des espèces lui appartenant sont retrouvées dans 75% de nos échantillons à des proportions relatives comprises entre 2 et 31%. La

présence de bactéries de ce genre a déjà été remarquée sur des biofilms formés à partir de lixiviat de terreau (Thèse de Manon Oliot, 2017). Dans des biofilms anodiques de pile à combustible microbiennes (PACM) alimentées en acétate, Kimura et Okabe (Kimura and Okabe, 2013) ont observé que *G. sulfurreducens* est capable d'oxyder l'acétate et de participer à une coopération syntrophique avec une espèce isolée d'*Hydrogenophaga* (AR20). Il semble que la souche *Hydrogenophaga-AR20* soit capable d'oxyder l'hydrogène produit par *G. sulfurreducens* et d'échanger les électrons issus de cette oxydation avec l'anode en tissu de carbone. Toutefois, la souche AR20 n'est pas capable seule d'oxyder l'acétate. Avec une co-culture des deux espèces il s'avère que 80% du courant est généré par *G. sulfurreducens* (via l'oxydation de l'acétate) et 20% par *Hydrogenophaga-AR20* (via l'oxydation de l'hydrogène).

Le genre *Azoarcus* regroupe des espèces bactériennes connues pour fixer l'azote atmosphérique et sont généralement retrouvées dans les sols. Il est donc possible que ces espèces proviennent du terreau de jardin. A notre connaissance, l'électroactivité de ce genre de bactéries n'a pas encore été démontrée pourtant, une proportion non négligeable d'*Azoarcus* est détectée sur les électrodes simples ainsi que sur les zones A des 3 électrodes secondaires du réacteur R2. Cette préférence pour les zones A (haut de l'électrode) peut s'expliquer par la concentration en N_2 plus importante en surface. A ce stade, il est difficile de conclure sur la possible implication de ce genre bactérien dans l'électroactivité des bioanodes.

Une faible proportion du genre *Clostridium* (*Clostridia*) est détectée sur les électrodes primaires et secondaires avec même un léger enrichissement au niveau des électrodes secondaires. De nombreuses espèces de ce genre ont déjà démontré des capacités électroactives (Koch and Harnisch, 2016).

En conclusion, au bout de 4 jours, à l'exception du genre *Azoarcus*, les communautés microbiennes détectées sur les électrodes secondaires sont en majorité des espèces déjà clairement connues comme électroactives (*Geobacter*) ou pressenties comme potentiellement électroactives (*Pseudomonas* et *Clostridium*).

Analyse après 30 jours de polarisation

En comparaison, les populations microbiennes des biofilms de 30 jours présentent une plus faible variété de genres bactériens (Figure 13) que les biofilms de 4 jours. Seuls, 8 genres sont détectés avec une proportion supérieure à 2% contre 11 pour les échantillons de 4 jours (Figure 12). Parmi les 8 genres, uniquement la moitié a pu être identifiée : *Geobacter* (δ -proteobacteria), *Hydrogenophaga* (β -proteobacteria), *Azospirillum* (α -proteobacteria) qui sont également présents sur les échantillons de 4 jours, et un genre non détecté à plus de 2 % sur les bioanodes de 4 jours, le genre *Synergistes* de la classe bactérienne *Synergistia*.

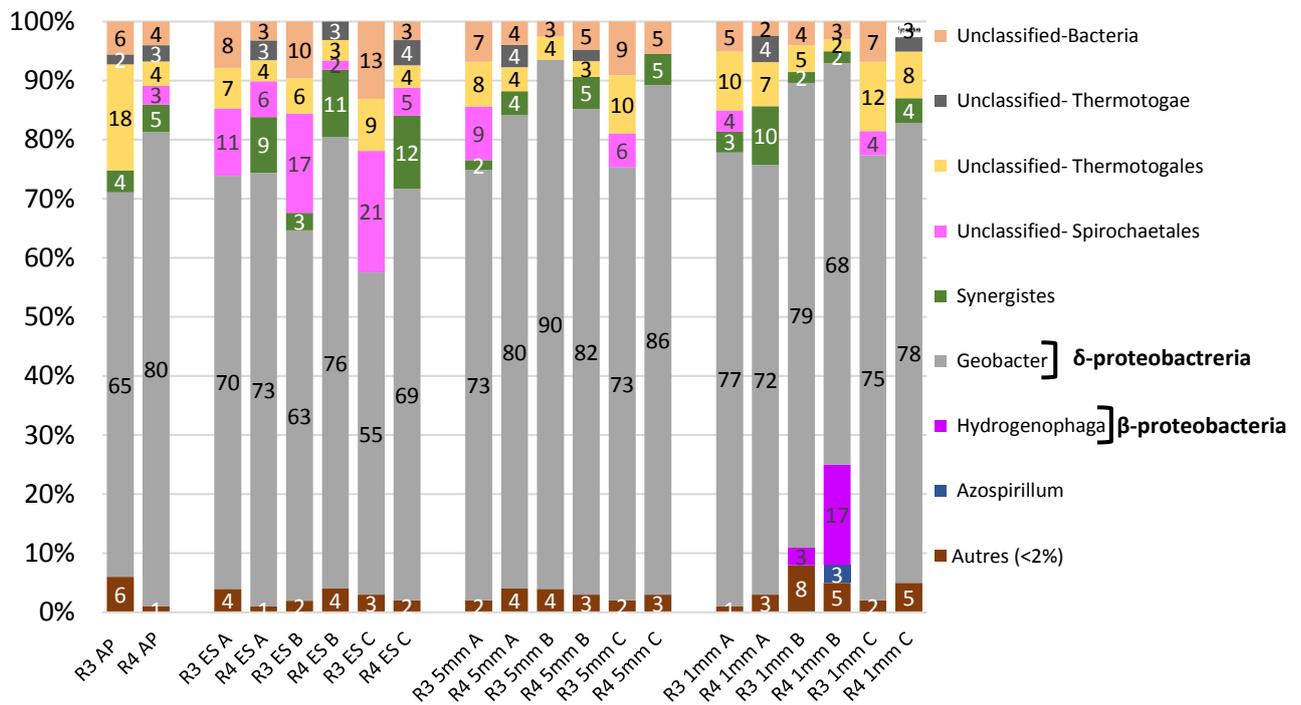


Figure 13 : Abondances relatives des populations bactériennes au niveau taxonomique du genre dans les biofilms de 30 jours prélevés sur les électrodes simples, les électrodes situées dans les canaux de 1 mm et 5 mm. Les électrodes secondaires sont divisées en 3 zones A, B et C. Les classes détectées à un seuil inférieur à 2% sont classifiées dans « Autres ».

Plus de 80% des populations microbiennes des bioanodes primaires utilisées pour les expériences de 30 jours présentent les mêmes caractéristiques que celles des bioanodes primaires de 4 jours :

- le genre *Geobacter* domine les échantillons avec en moyenne 65.5 % sur les bioanodes primaires de 4 jours et 72.5 % sur les bioanodes primaires de 30 jours.
- au deuxième rang se trouve un ensemble de genres non classifiés à ce jour dans la base de données NCBI qui représente 14 à 26 % de la population totale identifiée.
- en moyenne moins de 10 % des populations microbiennes sont détectées à une quantité inférieure à 2% sur les quatre bioanodes primaires.

A la différence des échantillons de 4 jours, aucune différence majeure n'est constatée entre les populations microbiennes des bioanodes primaires et celles des bioanodes secondaires de 30 jours. Globalement, les genres identifiés, non identifiés et classifiés dans « autres » présents sur les bioanodes primaires sont retrouvés sur les bioanodes secondaires à des proportions moyennes qui restent du même ordre de grandeur comme décrit dans le Tableau 5.

Tableau 5 : Identification des enrichissements au rang taxonomique des genres entre deux générations successives de biofilm EA de 30 jours (*n* est le nombre d'échantillons utilisés pour le calcul des moyennes et des écarts-types).

Genres	Abondances relatives moyennes sur les bioanodes primaires (n=2)	Abondances relatives moyennes sur les bioanodes secondaires (n=6)		
		ES	5 mm	1 mm
Identifiés	77 ± 11	73 ± 12	83 ± 8	78 ± 5
<i>Geobacter</i>	74 ± 12	68 ± 8	81 ± 7	75 ± 4
<i>Synergistes</i>	5 ± 0	6 ± 5	3 ± 2	4 ± 3
<i>Hydrogenophaga</i>	< 2	< 2	< 2	10 ± 10
<i>Azospirillum</i>	< 2	< 2	< 2	2 ± 1
Non identifiés	19 ± 10	24 ± 13	12 ± 8	14 ± 7
Classifiés dans « Autres »	4 ± 4	3 ± 1	3 ± 1	4 ± 3

Parmi les genres identifiés, seuls *Hydrogenophaga* et *Azospirillum* voient leur proportion légèrement augmentée lors du passage des bioanodes primaires aux bioanodes secondaires, mais ils ne sont retrouvés que sur 2 échantillons, ceux prélevés au centre des canaux de 1 mm (R3 1mm B et R4 1mm) B. *Azospirillum* couvre 3% de la population de l'échantillon R4 1mm B, tandis que *Hydrogenophaga* représente 3 et 17 % de la population de R3 1mm B et R4 1 mm B, respectivement. *Geobacter* et *Synergistes* sont détectés à des quantités équivalentes sur les bioanodes primaires et secondaires. A eux seuls, *Geobacter* et *Synergistes* couvrent plus de la moitié de la population des bioanodes primaires et secondaires de 30 jours.

Comme pour les biofilms de 4 jours, *Geobacter* est retrouvé sur la totalité des échantillons (primaires et secondaires) de 30 jours et de façon encore plus systématique : alors qu'il n'était dominant que dans 65 % des échantillons de biofilms de 4 jours, il est dominant dans 100 % des échantillons de biofilms de 30 jours. *Geobacter* représente en moyenne 74 ± 12% des populations des bioanodes primaires, 68 ± 8 % de celles des électrodes simples, 81 ± 7 % et 75 ± 4 % de celles des électrodes

situées dans des canaux de 5 et 1 mm, respectivement. Au sein de ce genre, l'espèce identifiée est encore une fois *Geobacter sulfurreducens*.

Le genre *Synergistes* qui n'était pas détecté à plus de 2 % sur les échantillons de 4 jours apparaît sur 75% des échantillons de 30 jours à des proportions comprises entre 2 à 12%. Les espèces de ce genre incluent des bactéries anaérobies non saccharolytiques (incapables d'hydrolyser un sucre) qui dégradent les acides aminés en acétate (Jumas-Bilak et al., 2009). Des bactéries de ce genre ont déjà été retrouvées parmi les populations de bioanodes de PACM (Sun et al., 2011; Yamashita et al., 2016) mais leur électroactivité n'a pas encore été démontrée à ce jour. Une identification jusqu'à l'espèce n'a pas abouti.

En conclusion, les communautés microbiennes détectées sur les électrodes secondaires de 30 jours sont moins nombreuses que celles des électrodes secondaires de 4 jours. Pour les biofilms secondaires de 4 jours, des espèces des genres *Geobacter*, *Pseudomonas*, *Clostridium* et *Azoarcus* ont été identifiées sur plusieurs échantillons (supérieur à 2 échantillons). Tandis que pour les biofilms secondaires de 30 jours, seules des espèces appartenant aux genres *Geobacter* et *Synergistes* ont été retrouvées sur une majorité des échantillons. Parmi ces espèces, celles issues de *Geobacter* (*Geobacter sulfurreducens*) sont connues pour leur électroactivité et celles issues de *Pseudomonas* et *Clostridium* ont de fortes chances d'être électroactives. Par contre, rien n'est connu sur l'éventuelle participation des espèces de *Synergistes* et *Azoarcus* au processus d'électroactivité.

3.2.3 Analyse de la viabilité

En complément de l'identification des populations microbiennes, des analyses de la viabilité cellulaire des microorganismes qui composent les biofilms ont été réalisées sur les électrodes secondaires avec l'aide très précieuse de Simon Guette-marquet. L'objectif est encore une fois d'apporter des éléments de réflexion pour avancer sur les hypothèses émises à propos du découplage courant/colonisation.

Initialement, il était prévu d'évaluer la viabilité des cellules microbiennes sur des lots d'électrodes polarisées pendant 4 et 30 jours. Cependant, les analyses réalisées sur les électrodes de 30 jours ont toutes échoué, en raison de l'utilisation d'un filtre non adapté pour l'observation du fluorochrome SYTO9. Contraint par le temps, seule l'analyse de la viabilité cellulaire sur les électrodes de 4 jours a pu être effectuée avec le bon filtre. Des duplicatas d'électrodes simples, d'électrodes situées dans les dispositifs « canal » de 1 mm et de 5mm ont été analysés.

Des images ont été acquises au microscope à épifluorescence pour 6 zones différentes le long des électrodes (Figure 14).

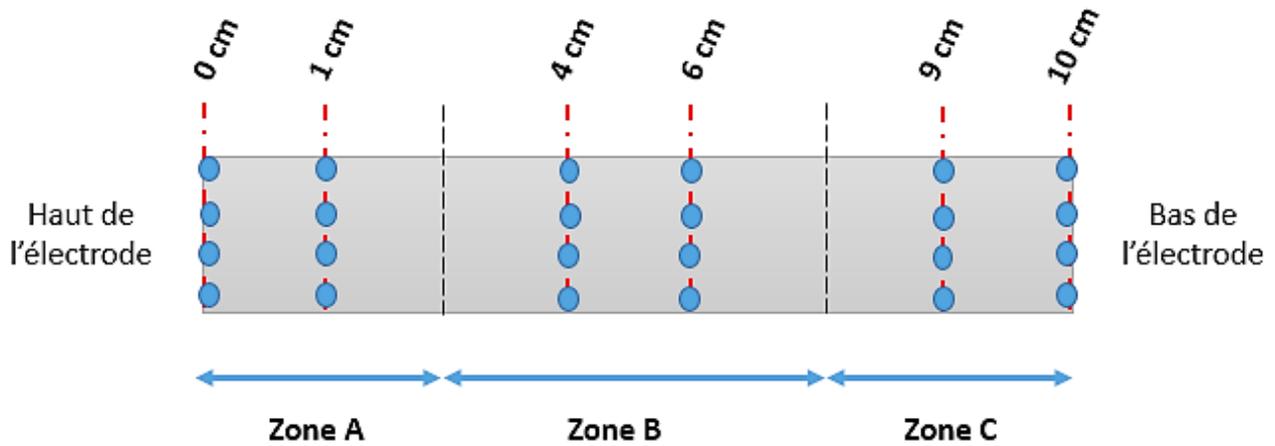
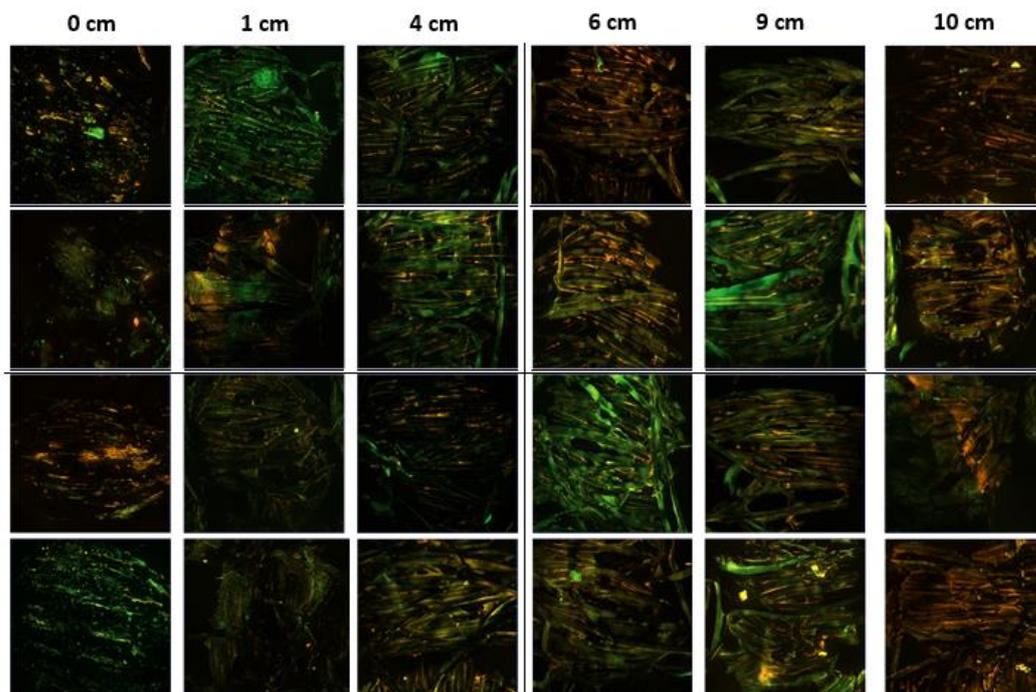


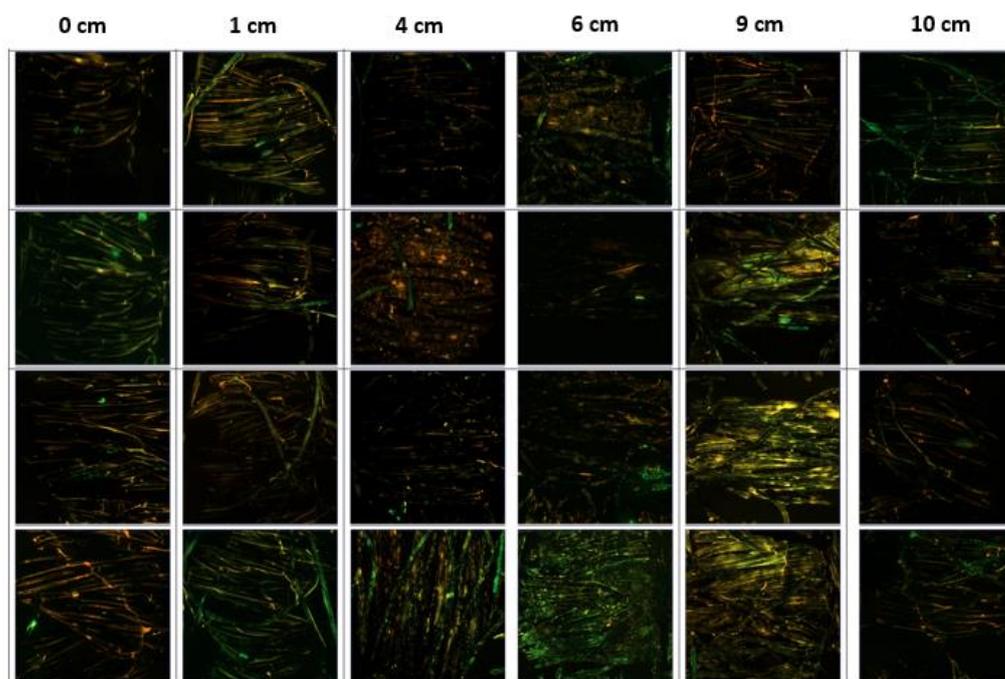
Figure 14 : Schéma représentant la localisation des zones d'acquisition lors de l'analyse de viabilité cellulaire.

Pour chaque zone 4 spots différents sont caractérisés par microscopie à épifluorescence, ce qui représente alors un total de 24 stacks d'images par électrode. Un exemple de ces ensembles de 24 images est illustré dans la Figure 18 pour un lot complet d'électrodes secondaires composé d'une électrode simple (A), d'une électrode située dans un canal de 5 mm (B) et d'une électrode dans un canal de 1 mm (C).

A



B



C

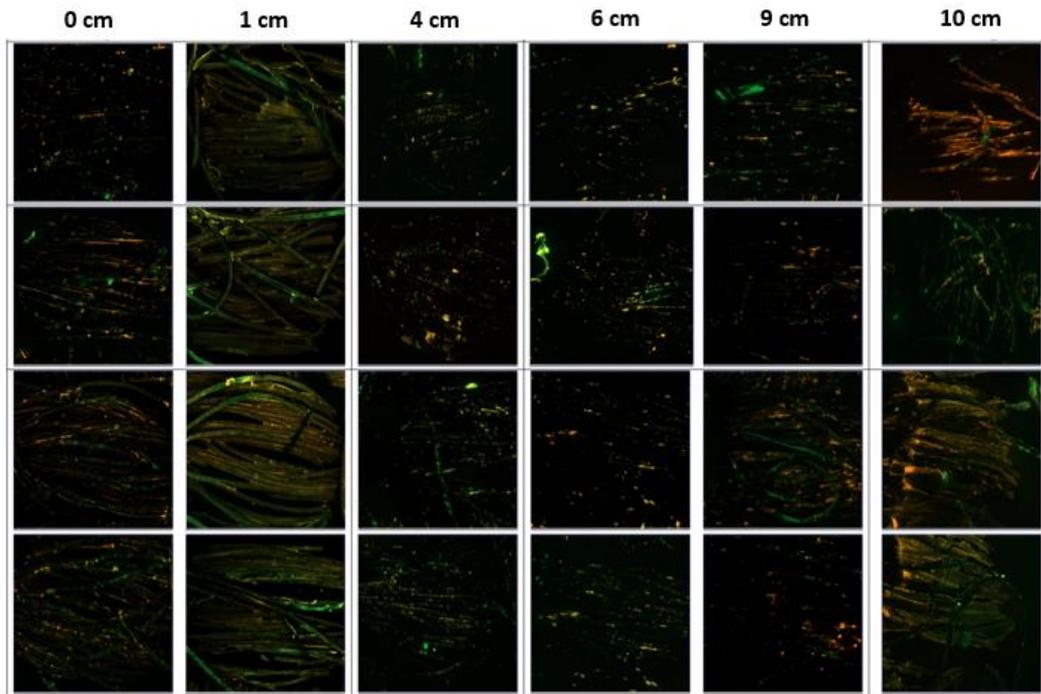


Figure 15 : Images prises au microscope à épifluorescence (Kit Live/dead BacLight) de 3 électrodes secondaires en tissu de carbone polarisées à $-0.2V/ECS$ pendant 4 jours : A) Electrode simple B) Electrode située dans un canal de 5 mm de hauteur et C) Electrode située dans un canal de 1 mm de hauteur. Les électrodes ont été marquées au Syto9 (vert) et à l'Iodure de propidium (orange).

Le traitement post-acquisition des stacks d'images (section 3.3 du chapitre 2) permet d'extraire deux paramètres quantitatifs :

- Θ_{SYTO9} : le taux de recouvrement de la totalité des cellules vivantes et mortes ou altérées
- Θ_{IP} : le taux de recouvrement des cellules mortes ou dont la membrane est altérée

Le taux de viabilité cellulaire est alors défini comme :

$$\frac{\theta_{SYTO9} - \theta_{IP}}{\theta_{SYTO9}} * 100$$

Pour chaque zone le long de l'électrode, le taux moyen de viabilité des cellules a été déterminé sur une base de 8 spots différents (4 spots par duplicata d'électrodes). Les résultats sont présentés sous forme d'histogrammes sur la Figure 16.

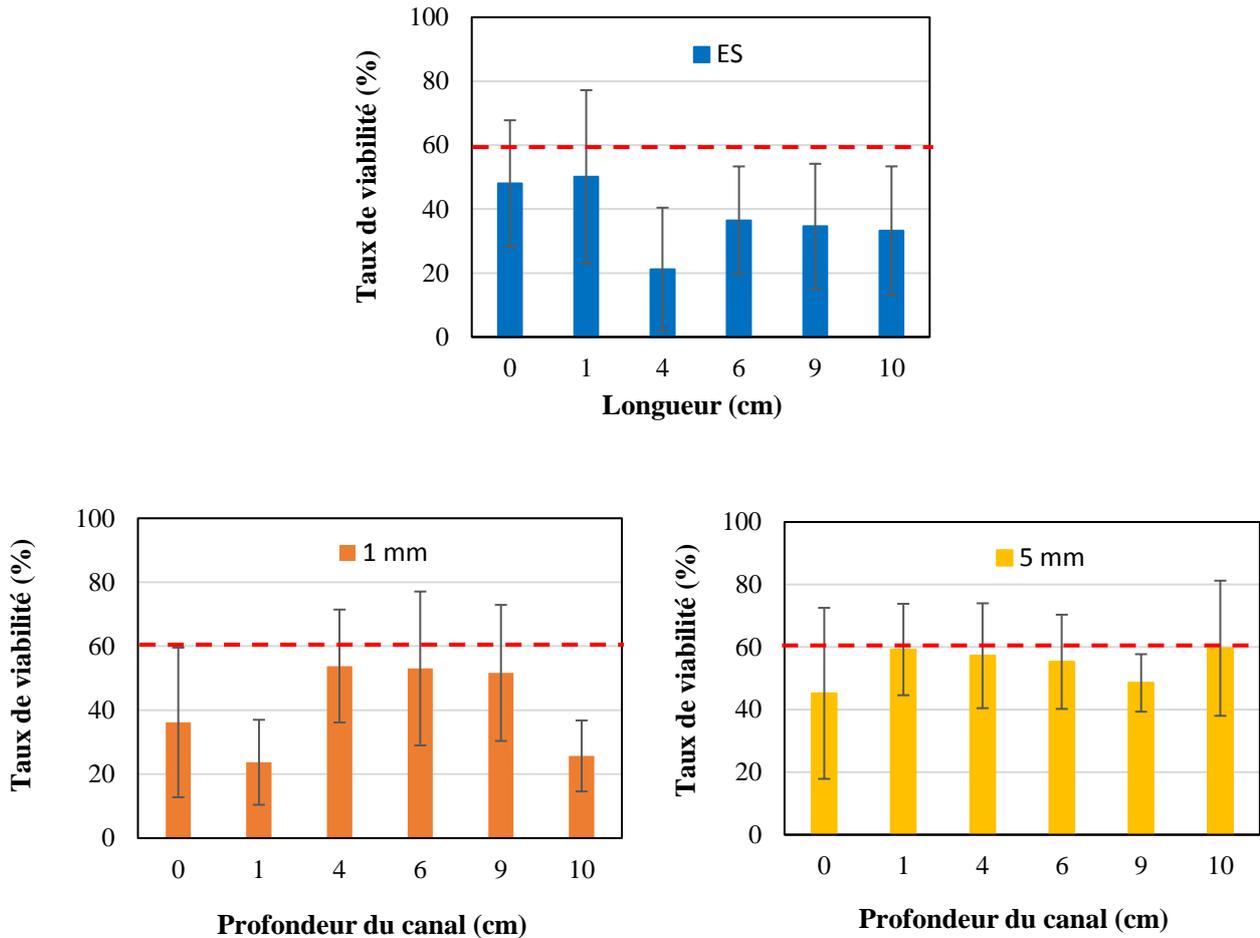


Figure 16 : Taux de viabilité des cellules microbiennes le long de différents types d'électrodes secondaires (électrodes simples et électrodes situées dans des canaux de 1 et 5 mm de hauteur). Pour chaque zone le long des électrodes le taux de viabilité est estimé sur la base de 8 spots différents.

Dans l'ensemble, la viabilité des bactéries au bout de 4 jours reste inférieure à 60 %. Afin d'avoir une base de comparaison, des exemples d'études portant sur la viabilité d'un biofilm électroactif ont été recherchés dans la bibliographie et deux études ont retenu notre attention. Chae et al., ont estimé la viabilité d'une bioanode utilisée dans une PACM inoculée avec une culture mixte (boues activées) et alimentée avec de l'acétate à 69 % après 100 jours d'expérience (Chae et al., 2009). Read et al. ont trouvé que la viabilité d'une bioanode utilisée dans une PACM inoculée avec une culture pure de *P.aeruginosa* et alimentée avec de l'acétate variait entre 44 et 76 % en fonction de l'épaisseur du biofilm après seulement 3 jours (Read et al., 2010). Bien que les conditions opératoires soient différentes dans chacune des études, il semble néanmoins qu'une viabilité de 60 % après 4 jours d'expérience soit cohérente avec les résultats de la bibliographie.

Pour affiner la comparaison des résultats, les taux moyens de viabilité et les écart-types ont été estimés chacun sur une base de 12 mesures (6 mesures par répliqua d'électrodes). A partir de ces deux paramètres, les taux inférieurs (taux moyen – écart-type) et supérieurs (taux moyen + écart-type) ont ensuite été déterminés (**Tableau 6**).

Tableau 6 : Taux moyens de viabilité, écart-types, taux inférieurs et supérieurs déterminés pour les différents types d'électrodes secondaires : électrodes simples et électrodes canaux de 1 et 5 mm.

Electrodes secondaires	Taux moyen de viabilité (n=12)	Ecart-type (n=12)	Taux inférieur	Taux supérieur
Electrodes simples	37.2	10.6	26.6	47.8
Canaux 1 mm	40.8	13.9	26.9	54.7
Canaux 5 mm	54.2	5.9	48.3	60.1

L'analyse des populations microbiennes indique qu'en majorité l'espèce *G. sulfurreducens* colonise les électrodes secondaires. Cette espèce est classifiée comme étant anaérobie stricte (Caccavo et al., 1994). Or, nos expérimentations ne sont pas réalisées en condition stricte d'anaérobiose. Seul un bullage d'azote d'une durée de 30 minutes est effectué en début d'expérience pour chasser l'oxygène initialement présent dans le milieu de culture synthétique. De plus, lors du retrait des électrodes (simples et canaux) du réacteur en fin d'expérience, celles-ci sont transitoirement exposées à l'oxygène de l'air ambiant avant d'être transféré dans une boîte à gant gonflable anaérobie. Lors de cette manœuvre, les électrodes placées dans les dispositifs « canaux » sont en quelques sortes protégées de l'oxygène tandis que les électrodes simples y sont directement exposées. Ceci pourrait alors expliquer pourquoi la viabilité des électrodes simples semble être légèrement plus faible par rapport à celle des électrodes « canaux » d'une part, et pourquoi le profil de viabilité des électrodes simples est assez disparate d'autre part. En effet, le haut de l'électrode (0 à 1 cm) présente des taux de viabilité supérieur à 40 % contrairement au reste de l'électrode (4 à 10 cm) qui est positionnée plus en profondeur dans le réacteur.

Par la suite il ne serait donc pas légitime de comparer la viabilité des électrodes simples avec celle des électrodes « canaux » car ces deux types d'électrodes n'ont pas été exposés de la même manière à l'oxygène lors de leur extraction du réacteur. Seuls les résultats des électrodes « canaux » de 1 et 5 mm ont alors été comparés entre eux. Il s'avère que la viabilité la plus élevée est obtenue au sein des canaux de 5 mm avec en moyenne 54.2 ± 5.9 % contre 40.8 ± 13.9 % pour les 1 mm. Le profil de viabilité des canaux de 1 mm est également hétérogène : les extrémités des canaux ont un taux de

mortalité plus élevée que le centre. En comparaison, les canaux de 5 mm affichent un profil de viabilité plus homogène le long des canaux. Nous savons que dans les canaux des limitations importantes de transport de matière ont lieu.

Une première hypothèse aux résultats obtenus serait alors l'existence d'une acidification au sein des canaux qui serait alors plus prononcée dans les 1 mm que dans les 5 mm et permettrait de justifier les résultats obtenus.

Une deuxième hypothèse serait qu'au cours des 4 jours d'expérience, de l'oxygène (présent dans l'air) se serait introduit dans les réacteurs car les réacteurs ne sont pas totalement étanches et aurait progressivement diffusé dans le milieu synthétique car l'anaérobiose n'est pas contrôlée. La diffusion de l'oxygène en milieu aqueux est un phénomène lent. Il est théoriquement admis que dans un tel scénario un gradient (important) d'oxygène se crée ainsi entre la partie haute et la partie basse du réacteur, surtout si des espèces microbiennes aérobies facultatives en profitent pour consommer l'oxygène soluble. Une hauteur de canal de 5 mm permettrait alors une diffusion homogène de l'oxygène dans tout le canal (si la consommation est négligeable), ce qui se traduit par l'obtention d'un profil de viabilité homogène et un écart-type faible. A l'inverse, une hauteur de 1 mm rendrait la pénétration de l'oxygène plus difficile au sein du canal, les extrémités seraient alors les premiers à être exposés à l'oxygène tandis que les bactéries anaérobies strictes seraient plus protégées au centre. Cette hypothèse permettrait d'expliquer les résultats obtenus.

Il est fort dommage (et frustrant) de ne pas pouvoir comparer ces résultats à la viabilité dans les biofilms de 31 jours.

3.3 Bilan

Il est apparu un découplage entre la production de courant et la colonisation des électrodes situées dans les canaux aux échéances de 4 et 31 jours. A 4 jours, les densités bactériennes étaient les plus faibles et pourtant les densités de courant étaient les plus élevées. A 31 jours, les densités bactériennes étaient les plus élevées alors que les densités de courant étaient plus basses.

La première hypothèse émise afin d'expliquer ce phénomène était qu'à 4 jours les biofilms étaient sans doute composés d'une majorité d'espèces électroactives, tandis qu'à 31 jours les espèces électroactives étaient minoritaires. Les analyses des populations microbiennes des biofilms ont révélé

la forte présence d'espèces électroactives à 4 jours et également à 31 jours. Par conséquent, la première hypothèse est réfutée.

La deuxième hypothèse fut que le ratio entre les bactéries vivantes et les bactéries mortes (ou dont la membrane est altérée) devait être différent sur les échantillons de 4 et 31 jours. La grande quantité de biomasse présente sur les échantillons de 31 jours était en partie constituée de bactéries mortes, alors qu'à 4 jours la viabilité des bactéries devait être plus importante. Malheureusement, l'analyse de la viabilité des bactéries n'a pu se faire uniquement sur les biofilms de 4 jours. Les résultats affichent un taux de viabilité inférieur à 60 % pour l'ensemble des bioanodes secondaires. Ce taux de viabilité reste cohérent avec d'autres études. Par conséquent, la deuxième hypothèse ne peut ni être vérifiée ni être réfutée.

4 RESULTATS OBTENUS AVEC LE DISPOSITIF « CANAL » EN ACIER INOXYDABLE 316L

D'autres séries d'expériences ont été réalisées avec les dispositifs « canal » et des électrodes en acier inoxydable 316 L (décrits au chapitre 2). Ces dispositifs ont été mis en œuvre afin d'accéder à une plus grande gamme de hauteurs de canaux : 5 mm, 1 mm, 500 μm et 200 μm . La surface des électrodes en acier inoxydable 316L ainsi que les conditions opératoires sont similaires à celles utilisées avec le dispositif « canal » et les électrodes en tissu de carbone (section 3).

Le Tableau 7 liste l'ensemble des manipulations conduites avec les dispositifs « canal » et les électrodes en acier inoxydable 316L. Chaque essai a été opéré avec au moins un duplicata de réacteur « multi-anodes ». Malheureusement, les premiers résultats n'ont pas été couronnés de succès c'est pourquoi seules les analyses des courbes de chronoampérométrie et de voltammétrie cyclique sont présentées à la section 4.1. Les résultats obtenus sont ensuite comparés avec ceux des dispositifs « canal » et les électrodes en tissu de carbone à la section 4.2. Un bilan est ensuite proposé à la section 4.3.

Tableau 7 : Liste des expériences et des analyses réalisées avec les dispositifs « canal » et les électrodes en acier inoxydable 316L.

Electrodes de travail	Nombre de réacteurs (durée des expériences)	Analyses effectuées
<p><i>1 Bioanode Primaire</i></p> <p>1 Electrode simple</p> <p>1 Dispositif canal <u>1 mm</u></p> <p>1 Dispositif canal <u>5 mm</u></p>	<p>4 Réacteurs</p> <p>R5/R6 (12 jours)</p> <p>R7/R8 (15 jours)</p>	<p>Analyses des CAs et des CVs</p>
<p><i>1 Bioanode Primaire</i></p> <p>1 Electrode simple</p> <p>1 Dispositif canal <u>200 μm</u></p> <p>1 Dispositif canal <u>500 μm</u></p>	<p>2 Réacteurs</p> <p>R9/R10 (13 jours)</p>	

4.1 Résultats expérimentaux

Les chronoampérogrammes obtenus sont présentés sur la Figure 17. Contrairement à ce qui était observé avec les électrodes en tissu de carbone, le dispositif « canal » avec les électrodes en acier inoxydable 316L a donné des résultats disparates qui sont difficilement reproductibles (Figure 17). Malgré l'utilisation du même protocole expérimental que celui développé avec le dispositif « canal » et les électrodes en tissu de carbone il n'a pas été possible de produire des résultats cohérents et fiables.

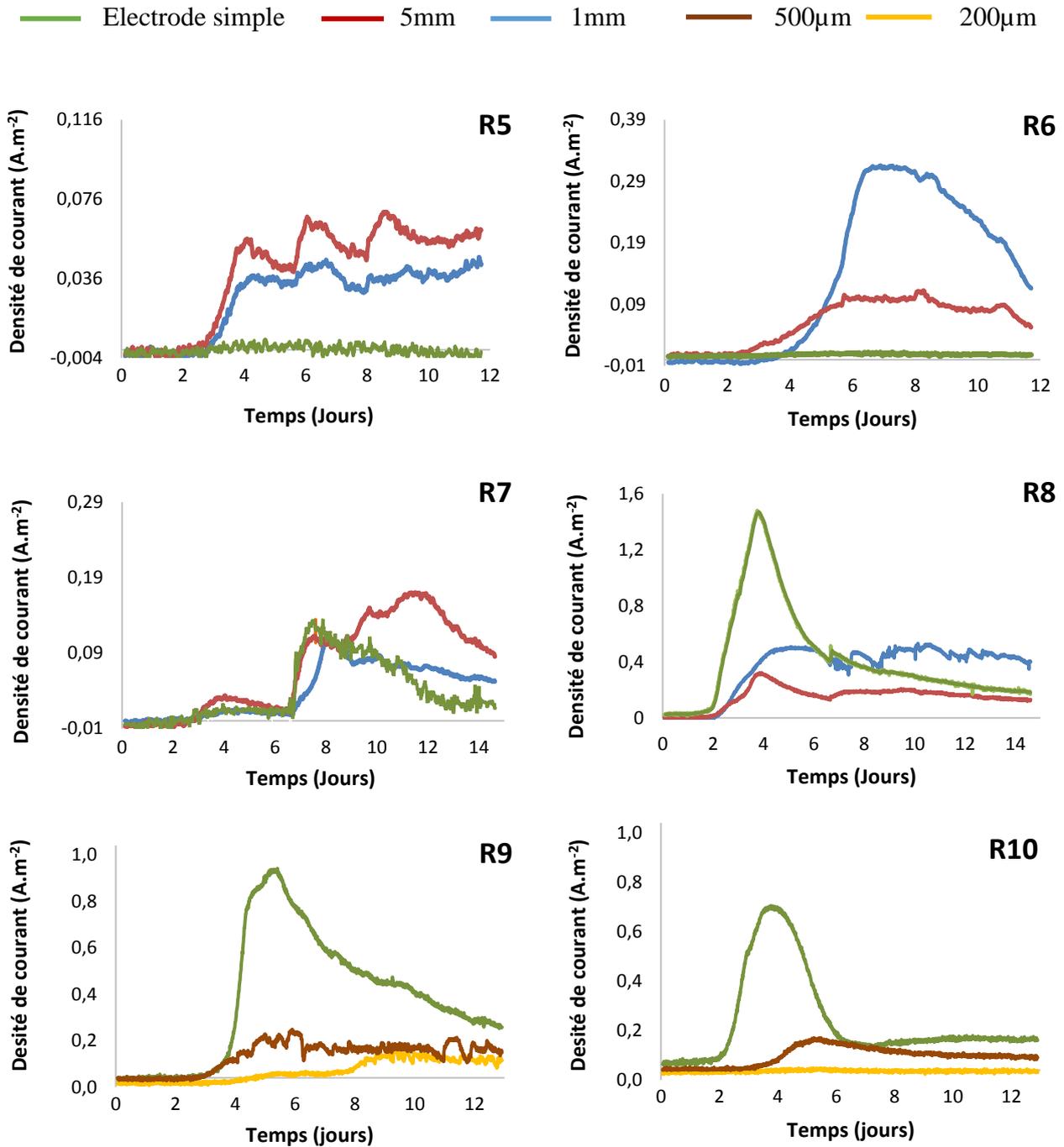


Figure 17 : Evolution de la densité de courant anodique au cours de la polarisation à -0.2 V/ECS pour les différents types d'électrodes secondaires en acier inoxydable 316L : électrodes simples et dispositifs «canal » de 5 mm, 1 mm, 500 μm et 200 μm.

Les réacteurs R5, R6, R7 et R8 ont été mis en œuvre dans des conditions opératoires identiques avec un intervalle d'environ 15 jours entre R5/R6 et R7/R8. Les résultats obtenus (Figure 17) montrent :

- Une grande variabilité au niveau de l'ordre de grandeur des densités de courant produites allant de 0,06 A.m⁻² (R5) à 1,50 A.m⁻² (R8).

- Des résultats très disparates pour les électrodes simples qui parfois ne produisent aucun courant (R5 et R6), parfois en produisent une faible quantité (R7) et parfois fournissent une densité de courant très élevée (R8).
- Des tendances variables pour les électrodes situées dans les canaux de 1 et 5 mm. Dans la moitié des cas les électrodes dans les canaux de 5 mm produisent plus de courant que celles dans les canaux de 1 mm (R5 et R7).

En comparaison, les résultats des réacteurs R9 et R10 sont plus reproductibles :

- Les densités de courant mesurées sont du même ordre de grandeur pour les deux réacteurs.
- L'évolution des densités de courant enregistrées avec le duplica d'électrodes simples et le duplica d'électrodes dans les canaux de 500 μm sont semblables.
- Seules les courbes des électrodes dans les canaux de 200 μm divergent.

Nous avons tenté de comprendre l'origine d'une telle confusion au niveau des résultats en particulier pour les réacteurs R5, R6, R7 et R8. Nous avons suspecté le montage expérimental sur plusieurs points:

- Un mauvais positionnement (non symétrique par rapport à l'électrode de référence et la bioanode primaire) des dispositifs « canaux » qui induirait des chutes ohmiques différentes d'un réacteur à l'autre.
- Un état de surface initial des électrodes en acier inoxydable 316L différent malgré le nettoyage des électrodes selon une procédure bien établie et rigoureusement respectée (cf Chapitre 3).
- Des problèmes de connexions électriques entre le collecteur de courant (tige de titane) et le dispositif « canal » en acier.

Pour examiner ces pistes nous avons superposé les voltammétries cycliques des quatre répliquas d'électrodes secondaires enregistrées à $t=0$ avant le démarrage de la chronoampérométrie (Figure 18).

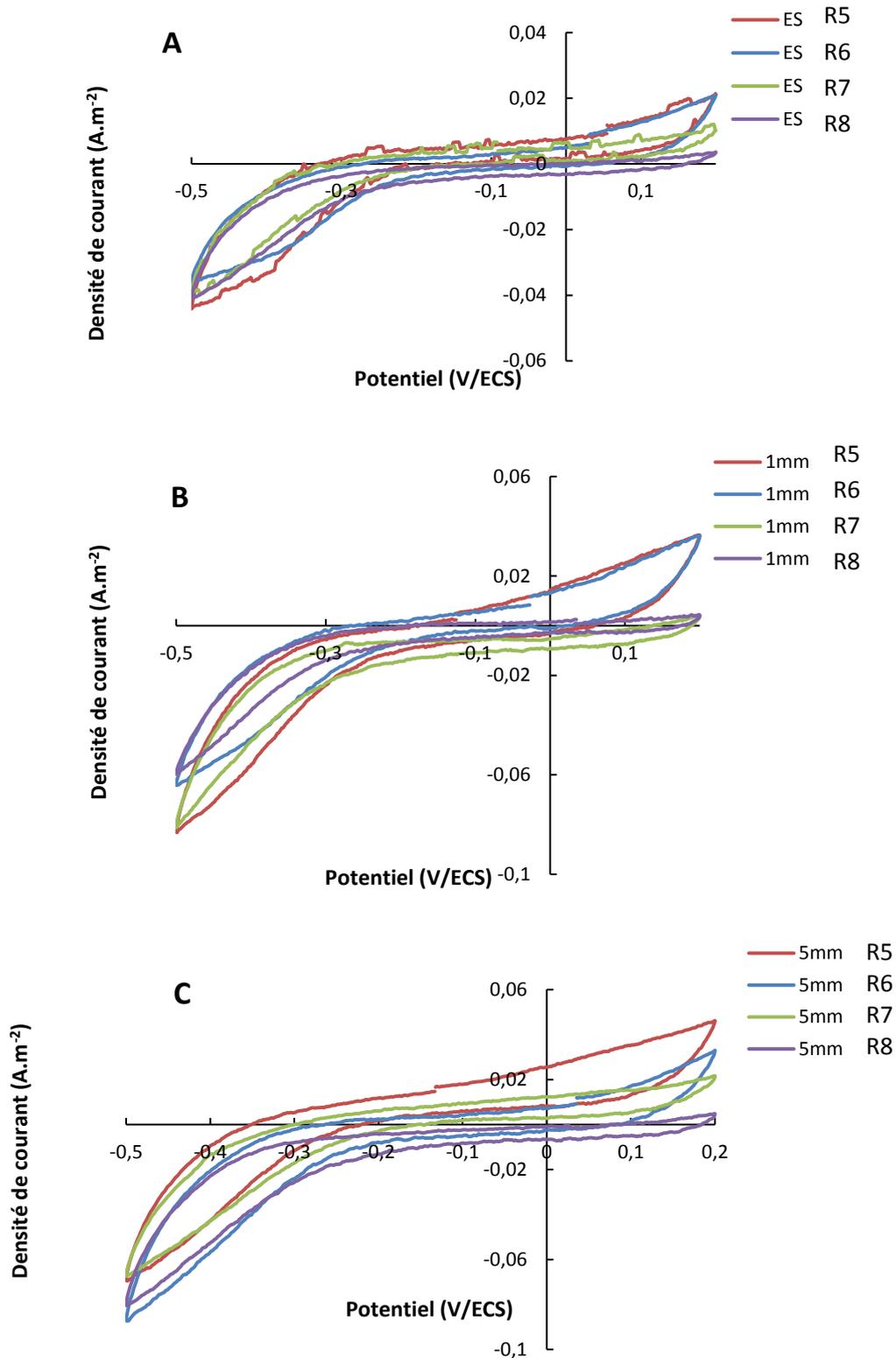


Figure 18 : Voltammétries cycliques réalisées à $t=0$ sur les électrodes secondaires avant leur polarisation dans le milieu synthétique : A) Electrodes simples, B) Canaux de 1 mm et C) Canaux de 5 mm (Vitesse de balayage $1 mV.s^{-1}$).

Les quatre courbes de voltammétrie sont relativement bien superposables, ce qui semble exclure un défaut important du montage expérimental au moins pour les deux derniers items envisagés. En effet la faiblesse des courants enregistrés ici à $t=0$ ne permet pas d'avoir une bonne évaluation de différences dans les chutes ohmiques.

Nous nous sommes ensuite focalisés sur le seul élément variable entre les quatre réacteurs : la bioanode primaire qui sert d'inoculum. Les bioanodes primaires sont formées dans du lixiviat de terreau. Après 20 jours de polarisation à -0.2 V/ECS, des voltammétries cycliques des bioanodes primaires sont enregistrées à faible vitesse de balayage (1 mV.s^{-1}) dans la solution de terreau avant de les transférer dans les réacteurs « multi-anodes » (Figure 19).

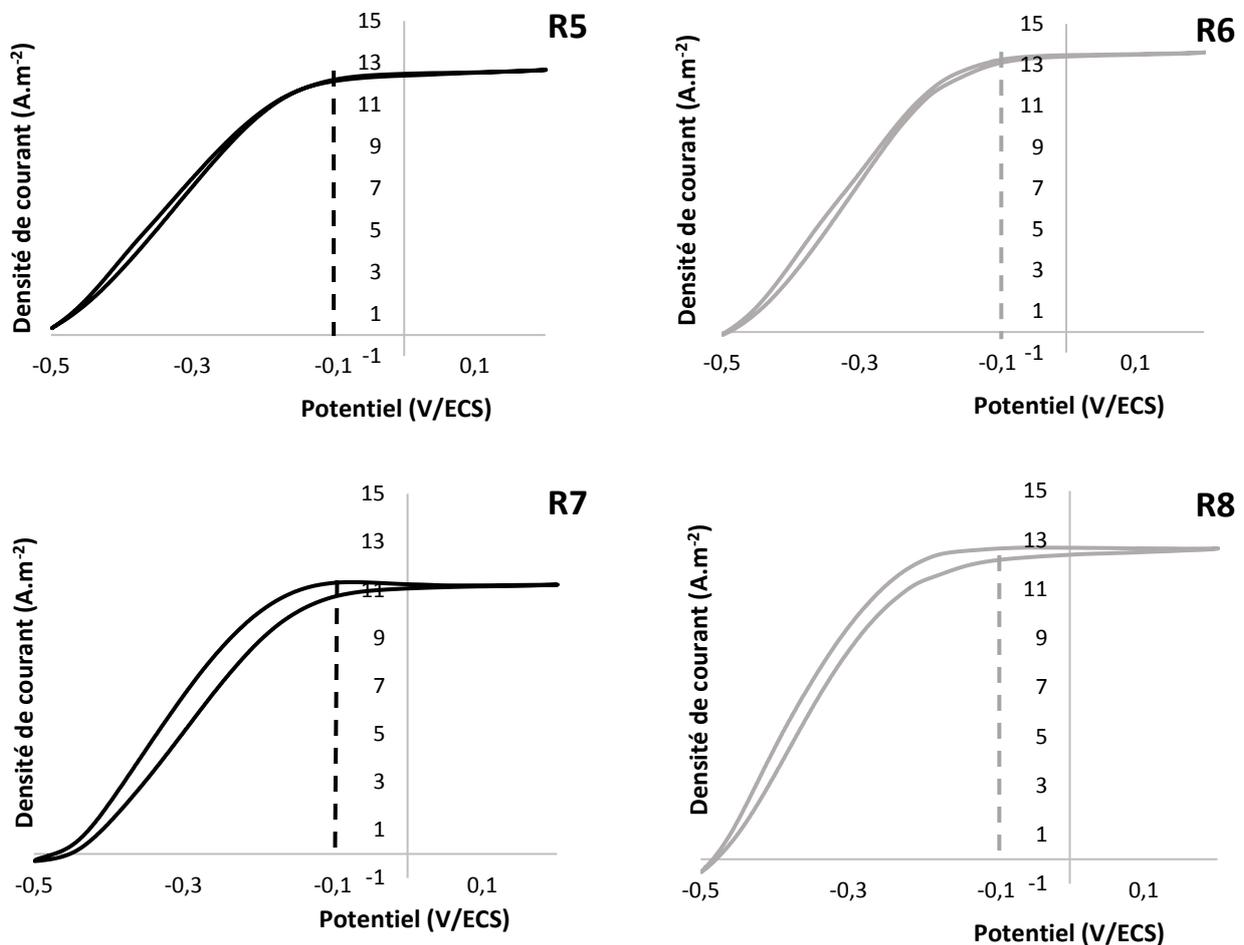


Figure 19 : Voltammétries catalytiques des bioanodes primaires avant leur transfert dans les réacteurs « Multi-anodes » (Vitesse de balayage : 1 mV.s^{-1})

Les voltammétries présentent toutes une forme sigmoïdale conventionnelle pour les bioanodes. Chaque bioanode primaire assure la catalyse de l'oxydation de l'acétate qui démarre à partir de -0.5 V/ECS et atteint un plateau de courant vers -0.1 V/ECS. La pente de chacune des courbes calculée entre -0.4 et -0.2 V/ECS est donnée dans le Tableau 8.

Tableau 8 : *Pentes des voltammétries des bioanodes primaires enregistrées avant leur transfert dans les réacteurs « Multi-anodes » R5, R6, R7 et R8.*

Pentes des CVs déterminées entre -0.4 et -0.2 V/ECS ($A.m^{-2}.V^{-1}$)			
R5	R6	R7	R8
37.2	44.1	39.3	47.2

Plus la pente est élevée plus la cinétique de transfert des électrons est rapide. Les valeurs des pentes sont comprises entre 37.2 (R5) et 47.2 (R8) $A.m^{-2}.V^{-1}$ soit un écart maximum de 21 %. Les valeurs des pentes évoluent dans l'ordre croissant suivant : R5, R7, R6 et R8, qui semble en corrélation avec les densités de courant maximales produites par chacun des réacteurs (Figure 17) : 0.076 $A.m^{-2}$ (R5), 0.19 $A.m^{-2}$ (R7), 0.39 $A.m^{-2}$ (R6) et 1.6 $A.m^{-2}$ (R8). Ainsi, plus la cinétique de transfert des électrons de la bioanode primaire est élevée, meilleures sont les performances anodiques des électrodes secondaires.

En conclusion, le manque de reproductibilité observé pour ces expériences pourrait être dû à des propriétés électrocatalytiques des bioanodes primaires différentes.

Une autre explication pourrait être trouvée en invoquant l'état de surface des électrodes en acier inoxydable. Cet état n'était pas contrôlé ici, or, Pierre Champigneux, qui réalisait sa thèse en parallèle à la nôtre, a également rencontré des problèmes de reproductibilité avec des électrodes en or dont la rugosité de surface était de l'ordre de quelques nanomètres. Sur ces électrodes dont l'état de surface était parfaitement contrôlé et identique pour toutes, la colonisation microbienne était très aléatoire et résultait en des densités de courant variant de pratiquement 0 à 6 $A.m^{-2}$ (Champigneux et al., 2018). Au contraire, les densités de courant étaient très reproductibles avec le même type d'électrodes d'or ayant une rugosité de surface de plusieurs micromètres (Champigneux, thèse 2018). Les surfaces métalliques pratiquement lisses semblent donc être une source de non-reproductibilité. Le fait de ne pas avoir contrôlé la rugosité de nos électrodes d'acier inoxydable pourrait expliquer, ou au moins contribuer à expliquer, la disparité des résultats.

Enfin, pour expliquer la faiblesse des densités de courant par rapport à celles obtenues avec les électrodes en tissu de carbone il faudrait se pencher sur le processus de sélection des espèces bactériennes lors du passage de la bioanode primaire aux bioanodes secondaires. Rappelons que Diana Pocaznoi, une ancienne doctorante de l'équipe « Ingénierie des biofilms » (2009-2012), est parvenue à former des biofilms anodiques très reproductibles sur des électrodes en acier inoxydable 316L en les inoculant directement avec du lixiviat de terreau (Pocaznoi et al., 2012). De plus, des densités de courant élevées (20.6 A.m^{-2}) ont été produites dans de telles conditions.

Ici les anodes en acier sont inoculées à partir d'une bioanode primaire qui, elle, est en tissu de carbone. On peut craindre que les bactéries sélectionnées sur les anodes en carbone peinent à coloniser la surface de l'acier inoxydable 316L. Des travaux publiés récemment par l'équipe ont démontré que le matériau d'électrode, suivant qu'il est en carbone ou en acier, induit le développement de biofilms composés de communautés microbiennes très différentes (Erable et al., 2017). Ces travaux étaient réalisés dans des sédiments marins et sont sans doute spécifiques à ce microbiote.

L'éventuelle sélection des bactéries entre anode primaire et secondaire est restée à l'état de questionnement en raison du manque de temps pour l'approfondir. Il serait nécessaire de faire de nouvelles expériences en utilisant du lixiviat de terreau comme inoculum afin d'éviter la présélection de population microbienne ayant déjà une « préférence » pour le tissu de carbone. En parallèle, il faudrait comparer les populations sélectionnées sur le tissu de carbone et sur l'acier.

4.2 Comparaison avec les électrodes en tissu de carbone dans le dispositif « canal »

En dépit des difficultés rencontrées pour obtenir des résultats reproductibles avec les électrodes en acier dans les dispositifs « canal », en se focalisant uniquement sur l'allure des chronoampérométries des électrodes secondaires qui ont produit du courant, des observations similaires à celles obtenues avec les électrodes en carbone peuvent être trouvées :

- L'instabilité de la densité de courant des électrodes simples dans le temps (R8, R9 et R10, Figure 17 pour les électrodes en carbone).
- Les chronoampérométries des électrodes en acier présentent toute la même allure déjà observée et décrite avec les électrodes en carbone suivant 4 phases successives : I) Latence, II) Augmentation sigmoïdale du courant jusqu'à J_{max} , III) Diminution progressive du courant

et IV) Stabilisation à une valeur inférieure à J_{max} . La phase IV) n'est toutefois pas bien visible ici car la durée des manipulations est trop courte (15 jours).

Les paramètres permettant de caractériser les chronoampérométries: la date de début de production de courant, la valeur du J_{max} et la durée de la phase II, ont été déterminés à partir des courbes de la Figure 17. La phase IV n'étant pas atteinte pour ces expériences, la valeur du courant à long terme n'a pas pu être évaluée. Les valeurs moyennes de ces paramètres sont indiquées dans le Tableau 9 et sont comparées à celles obtenues avec les électrodes en carbone dans les dispositifs « canal » de 1 et 5 mm de hauteur. Précisons que les résultats du réacteur R7 n'ont pas été pris en considération car le démarrage initial du courant (au jour 2,6 environ) semble avoir échoué (Figure 17).

Tableau 9 : Valeurs moyennes des paramètres caractéristiques des chronoampérométries des électrodes en acier inoxydable 316L et en tissu de carbone disposées dans les dispositifs « canal ». *n* est au nombre de valeurs exploitées pour calculer les moyennes et les écarts-types.

Electrodes en acier inoxydable 316L

	<i>Début production courant (jours)</i>	<i>J_{max} ($A.m^{-2}$)</i>	<i>Durée Phase II (jours)</i>
5 mm (n=3)	2.4 ± 0.3	0.3 ± 0.2	2.2 ± 0.9
1 mm (n=3)	3.2 ± 1.1	0.3 ± 0.2	2.1 ± 0.8
500 µm (n=2)	3.2 ± 0.2	0.2 ± 0.0	2.1 ± 0.1

Electrodes en tissu de carbone

	<i>Début production courant (jours)</i>	<i>J_{max} ($A.m^{-2}$)</i>	<i>Durée Phase II (jours)</i>
5 mm (n=10)	1.2 ± 0.1	5.4 ± 1.5	2.2 ± 0.9
1 mm (n=10)	1.8 ± 0.5	5.4 ± 1.5	2.2 ± 1.1

En comparant les données obtenues pour les électrodes en acier inoxydable 316L et en tissu de carbone, il apparaît qu'une diminution de la hauteur du canal de 5 à 1 mm impacte le démarrage du courant qui est retardé de 30% sur acier inoxydable et de 50% sur tissu de carbone. Les valeurs maximales de densités de courant semblent ne pas être affectées par la hauteur du canal. Le J_{max} est le même pour les deux tailles de canaux sur tissu de carbone et sur acier inoxydable. Comme

constaté avec les électrodes en tissu de carbone, la phase II dure seulement 2 jours avec les électrodes en acier inoxydable. Peu importe donc le matériau d'électrode utilisé, au bout de 2 jours les performances maximales sont atteintes au sein des dispositifs « canal » de 0,5, 1 et 5 mm. Globalement, les constatations faites dans la section précédente avec les dispositifs « canal » et les électrodes en carbone sont retrouvées ici avec les électrodes en acier.

Sur acier inoxydable, il a été possible d'accéder aux données d'une hauteur supplémentaire de canal, 500 μm . Le passage d'une hauteur de canal de 1 mm à 500 μm n'a montré aucun effet sur le démarrage du courant (3.2 jours pour 1 mm et 500 μm) tandis que le J_{max} a été diminué de 33 % (0.3 à 0.2 $\text{A}\cdot\text{m}^{-2}$).

Toutefois, il faut garder à l'esprit que certains écarts-types pour les électrodes en acier inoxydable sont assez élevés. Les valeurs de J_{max} , de temps de latence, de temps de production de courant sont donc parfois discutables. Un nombre plus conséquent d'expériences comme pour les dispositifs « canal » avec électrode de carbone, aurait certainement permis de conforter certaines de nos hypothèses.

4.3 Bilan

Des problèmes de reproductibilité ont été rencontrés au niveau des expériences menées avec les électrodes en acier inoxydable dans les dispositifs « canal » malgré des conditions opératoires bien cadrées et surtout identiques à celles utilisées avec les électrodes en carbone. Ces désagréments pourraient être dus à des propriétés électrocatalytiques différentes des bioanodes primaires, à la surface lisse des électrodes en acier, ou encore à la difficulté des populations microbiennes présentes sur les tissus de carbone (bioanodes primaires) à s'adapter au matériau des électrodes secondaires (acier inoxydable 316L).

Pour vérifier ces hypothèses, il aurait fallu réaliser plusieurs autres séries de manipulations en inoculant par exemple directement avec du lixiviat de terreau plutôt qu'avec une bioanode primaire formée sur tissu de carbone. Toutefois, reproduire les expériences sur acier en changeant de protocole complexifierait la comparaison avec les résultats produits par les électrodes en carbone. Par conséquent, nous avons choisi de ne pas poursuivre dans cette voie qui aurait été trop chronophage. En outre, malgré des densités de courant très aléatoires, les effets de la hauteur du canal sur les performances bio-électrochimiques des biofilms EA semblent être identiques avec les électrodes en acier et en carbone. Cela a conforté la décision de ne pas poursuivre de longues

manipulations avec les électrodes en acier qui, a priori, n'auraient que confirmé les conclusions issues des travaux avec les électrodes de carbone.

5 CONCLUSIONS DU CHAPITRE 3

L'objectif principal de ce chapitre est l'étude de l'impact de la taille de pores sur la colonisation microbienne des électrodes et la production de courant afin d'apporter une base de connaissance susceptible de guider la conception d'anodes tridimensionnelles poreuses optimales.

Pour répondre à cet objectif, l'étude a été menée à l'échelle d'un pore qui représente le constituant élémentaire d'une structure poreuse. Un dispositif expérimental a été fabriqué permettant de simuler un pore par un canal qui est facile à désassembler en fin de manipulation afin d'analyser les communautés microbiennes le long de l'électrode. Deux matériaux d'électrodes ont été testés au sein de ces dispositifs « canal » : le carbone et l'acier inoxydable 316L. Les expériences ont été conduites en utilisant comme inoculum une bioanode formée dans du lixiviat de terreau, dite primaire. La revue bibliographique présentée au Chapitre 1 a révélé que des tailles de pores de l'ordre du millimètre garantissaient les densités de courant les plus élevées pour les électrodes tridimensionnelles.

Les expériences menées avec les électrodes en tissu de carbone ont permis d'étudier deux hauteurs de canal de 1 et 5 mm. Il s'avère que la hauteur du canal a un impact sur le démarrage du courant et sur la valeur de la densité du courant à long terme : le temps de latence initial est multiplié par deux et le courant à long terme diminue de 25 %, lorsque la hauteur du canal passe de 5 à 1 mm. Un résultat non attendu fut de constater que les densités de courant maximales sont atteintes seulement 2 jours après le démarrage du courant, et ceci aussi bien pour les électrodes situées dans les dispositifs « canal » que pour celles laissées libres servant de contrôle.

Pour ce qui est de la colonisation des électrodes situées dans les dispositifs « canal », la profondeur de pénétration maximale permise par le dispositif, égale à 5 cm, était atteinte par les biofilms au bout de 4 jours quelle que soit la hauteur du canal. Un suivi du biovolume du biofilm présente à différentes profondeurs a été réalisé après 4, 10 et 31 jours de polarisation. Les plus faibles biovolumes, entre 15 et 40 % pour les deux hauteurs de canal, ont été obtenues à 4 jours et les plus fortes, dépassant 40%, à 31 jours. A 31 jours les biovolumes étaient supérieurs à 40% excepté au niveau des zones centrales des électrodes situées dans les canaux de 1 mm. Ceci démontre qu'une hauteur de canal de 1 mm impose des contraintes qui limitent la colonisation.

Par ailleurs, un découplage a été noté entre la production de courant et la colonisation des électrodes dans les canaux. En effet, à 4 jours les électrodes ont les plus faibles densités de biomasse microbienne pourtant les densités de courant sont les plus élevées. Le contraire est observé à l'échéance de 31 jours. Deux hypothèses ont été émises : *i*) la quantité de bactéries électroactives est plus importante au jour 4 qu'au jour 31 et *ii*) le taux de bactéries mortes ou altérées est plus élevée au jour 31 qu'au jour 4. Les analyses des populations microbiennes menées aux jours 4 et 31 ont révélé la présence d'une majorité d'espèces électroactives à ces deux échéances, la première hypothèse est donc réfutée. A notre grand regret, l'étude de la viabilité des bactéries n'a pu être effectuée que sur les expériences de 4 jours, la deuxième hypothèse n'a donc pas pu être rigoureusement confirmée.

Les expériences conduites avec les dispositifs « canal » et les électrodes en acier inoxydable devaient permettre d'élargir la gamme de hauteurs de canal étudiée avec des hauteurs inférieures au millimètre : 500 μm et 200 μm . Cependant, les premiers résultats n'ont pas abouti à des résultats reproductibles. Le manque de reproductibilité serait dû à la surface lisse des électrodes qui rendent l'adhésion des bactéries difficile, ou à des propriétés électrocatalytiques différentes des bioanodes primaires, ou encore à la difficulté des communautés bactériennes présentes sur bioanodes primaires en tissu de carbone à s'adapter à l'acier inoxydable 316L. Il a tout de même été possible d'analyser les données de certaines expériences et de suggérer qu'elles confirment les mêmes observations faites avec les électrodes en tissu de carbone. La hauteur du canal a un effet sur le démarrage du courant qui est retardé de 30 % en passant de 5 à 1 mm. Aucun effet n'est noté sur la valeur du J_{max} . La diminution de la hauteur du canal de 1 mm à 500 μm n'influence pas le démarrage du courant mais diminue de 33 % la valeur de J_{max} .

Sur le plan de l'ingénierie cette approche confirme que le millimètre est le bon ordre de grandeur pour concevoir des électrodes microbiennes poreuses. Cette taille permet la colonisation rapide de profondeurs significatives. Ici 5 cm sont colonisés en 4 jours, voire peut-être moins de 4 jours vu que les analyses n'ont pas été effectuées sur de plus courtes durées. Toutefois des limitations inhérentes aux transports de matière restent présentes. La modélisation numérique par une équation simplifiée de diffusion-réaction et l'utilisation du nombre de Damköhler modifié sont de bons outils pour approcher ces limitations. Ils ont notamment mis en lumière la diffusion des espèces tampon comme une cause majeure de limitation. La conception d'anodes tridimensionnelles doit donc reposer en priorité sur la modélisation des profils de pH au sein des structures. Optimiser un procédé électro-microbien exigera par conséquent de mettre en œuvre des milieux les plus stables possibles en

termes de pH, c'est-à-dire avec de fortes concentrations d'espèces tampon. La géométrie optimale des anodes sera donc fortement contrainte par la capacité des micro-organismes à supporter de fortes concentrations d'espèces tampon. C'est une voie de recherche issue de nos travaux qu'il conviendra de poursuivre.

Certains des résultats présentés dans ce chapitre sont assez inattendus, notamment pour ce qui concerne le démarrage de la production de courant. La présence d'un canal et sa hauteur impactent le temps de latence initial, alors qu'ils n'ont pratiquement pas d'effet sur le temps d'établissement du courant, c'est-à-dire la durée entre le démarrage de la production de courant et l'arrivée au courant maximal, qui est toujours de 2 jours environ. Ceci met l'accent sur le manque de connaissances relatives aux toutes premières étapes de formation du biofilm. C'est certainement un sujet de recherche extrêmement vaste mais qu'il faut absolument aborder car c'est certainement en maîtrisant, ou a minima en orientant, ces premières étapes que l'on trouvera des leviers pour optimiser les biofilms électroactifs. La suite des travaux de thèse tentent d'initier quelques réflexions dans ce sens.

Le découplage entre colonisation microbienne de la surface des électrodes et production de courant est un autre phénomène inattendu sur lequel nous ne reviendrons pas, et pour lequel nous avons proposé une piste de recherche (pour un futur que nous espérons très proche).

Enfin, rappelons que la présence d'un canal diminue les densités de courant produites à long terme mais favorise la reproductibilité de ces valeurs. Nous avons émis l'hypothèse que le biofilm qui se développe sans contrainte sur les électrodes de contrôle atteint une maturité qui induit des mécanismes de détachement de type quorum sensing. Le détachement incontrôlé du biofilm serait la cause des chutes de courant, qui sont parfois drastiques. Au contraire, au sein des canaux le biofilm n'atteindrait pas la maturité nécessaire pour provoquer les mécanismes de détachement. La limitation de la croissance des biofilms serait alors favorable au maintien de leurs propriétés électrocatalytiques. Voici une nouvelle hypothèse qu'il conviendra de confirmer (ou non) et, le cas échéant, donnerait un nouveau levier pour l'optimisation des anodes microbiennes tridimensionnelles.

Chapitre 4 : Comportement des biofilms électroactifs à l'échelle de plusieurs pores

1	OBJECTIF ET STRATEGIE DE L'ETUDE	197
1.1	Contexte général et stratégie	197
1.2	Conception d'un dispositif multi-pores à longueur de pores variable	198
1.3	Mise en œuvre des dispositifs « multi-pores »	199
2	EFFET DE LA LONGUEUR DES PORES SUR LES Densités de courant.....	202
2.1	Chronoampérométrie (CA)	202
2.1.1	Phase de latence (Phase I).....	204
2.1.2	Démarrage et augmentation sigmoïdale du courant (Phase II).....	206
2.1.3	Charge électrique produite.....	210
2.1.4	Eléments de réflexion : le transport du substrat.....	211
2.1.5	Eléments de réflexion : pression sélective exercée par le pore?.....	214
2.2	Voltammétrie cyclique (CV).....	215
3	EFFET DE LA LONGUEUR DU PORE SUR LA COLONISATION MICROBIENNE	218
3.1	Cartographie de la colonisation des électrodes	218
3.2	Analyse des populations bactériennes.....	223
3.3	Comparaison des populations bactériennes obtenues dans les dispositifs « canal » et les dispositifs multi-pores (DMP).....	236
4.	CONCLUSIONS DU CHAPITRE 4	236

1 OBJECTIF ET STRATEGIE DE L'ETUDE

1.1 Contexte général et stratégie

Dans la bibliographie, la majorité des études qui utilisent des anodes poreuses au sein de procédés électro-microbiennes s'intéresse uniquement au paramètre taille ou diamètre d'ouverture des pores (Figure 1). Le chapitre 3 de ce manuscrit de thèse est d'ailleurs destiné à apporter des éléments de réflexion sur l'impact de tailles de pores de l'ordre de quelques millimètres sur les performances anodiques et la colonisation microbienne d'une bioanode. Par contre, à notre connaissance, aucun travail ne s'est encore penché sur l'évaluation de la pénétration des microorganismes électroactifs dans des pores en fonction de leur longueur (ou profondeur) (Figure 1) et la compréhension des mécanismes associés.

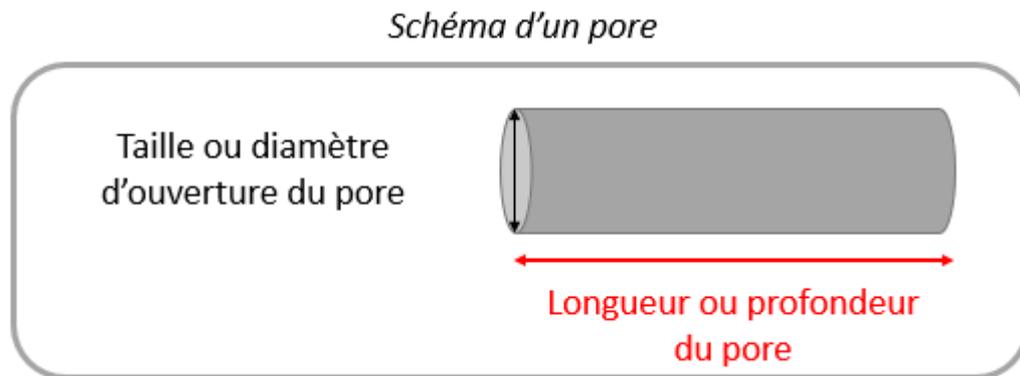


Figure 1 : Représentation schématique de l'ouverture et de la profondeur d'un pore.

Dans ce contexte, la deuxième partie des travaux menés dans le cadre de cette thèse s'est focalisée cette fois sur l'impact de la longueur des pores sur les performances anodiques et la formation du biofilm microbien à la surface de l'électrode. Pour cette nouvelle étude, la stratégie adoptée a été de travailler avec une ouverture de pore fixe et des longueurs de pore variables. Nous avons constaté dans le chapitre précédent que les bactéries électroactives peuvent pénétrer en quelques jours à l'intérieur de pores millimétriques jusqu'à plusieurs centimètres de profondeur. Nous avons donc choisi pour cette étude une taille de pore fixe de l'ordre du millimètre et des longueurs de pore variables de l'ordre du centimètre.

Le dispositif est différent de celui du chapitre précédent car nous avons choisi de disposer l'électrode uniquement au fond des pores alors que la paroi des pores est non conductrice (Figure 3, chapitre 2). Les microorganismes doivent donc se déplacer le long des pores sans y trouver de surface conductrice, pour accéder au fond du pore qui est la seule partie conductrice. En proposant aux microorganismes une configuration différente nous espérons collecter d'autres informations sur les toutes premières étapes de formation des biofilms et en particulier sur la phase d'approche des microorganismes vers l'électrode.

1.2 Conception d'un dispositif multi-pores à longueur de pores variable

Le dispositif « multi-pores » (décrit au chapitre 2) a été élaboré, en cohérence avec les résultats du chapitre 3, avec un diamètre de pore de 2 mm et des longueurs de pore de 5, 10 et 24 mm. Tout comme le dispositif « canal », le dispositif « multi-pores » (DMP) se devait d'être facilement démontable pour accéder à la colonisation des électrodes positionnées au fond des pores. Cet aspect du cahier des charges n'aurait pas été réalisable en travaillant avec des électrodes poreuses classiques, comme les mousses de carbone ou d'acier par exemple, ou en usinant des pores à partir d'électrodes monolithiques. En effet, il aurait été impossible d'observer la colonisation interne des électrodes sans altérer le biofilm en découpant les électrodes en fin d'expérience. De plus, nous n'étions pas assurés de trouver des anodes poreuses offrant des pores calibrés avec différentes longueurs de pores.

L'électrode en tissu de carbone est disposée à l'arrière d'une plaque de téflon de 5, 10 ou 24 mm d'épaisseur percée de 90 canaux de 2 mm de diamètre. Le téflon, est électriquement inerte. La production de courant signifie donc que les bactéries EA ont réussi à accéder à l'électrode en tissu de carbone située au fond des pores. Le nombre de pores élevé permet de mesurer des courants significatifs puis d'avoir une analyse de la colonisation microbienne en fin d'expérience qui s'appuie sur un grand nombre de pores exposés exactement aux mêmes conditions. La surface potentiellement colonisable par les bactéries EA est constituée du fond des 90 pores, c'est-à-dire de 90 disques de 2 mm de diamètre soit au total $90 \times 0.031 = 2.8 \text{ cm}^2$.

1.3 Mise en œuvre des dispositifs « multi-pores »

La procédure expérimentale adoptée pour cette nouvelle étude est différente de celle du chapitre précédent (section 3.2 chapitre 3). L'inoculum utilisé est directement du lixiviat de terreau et non plus une bioanode primaire formée dans du lixiviat de terreau. La procédure se déroule alors en une étape seulement. Cette procédure permet de s'affranchir des possibles sources d'irreproductibilité liées aux propriétés électrocatalytiques de l'électrode primaire, comme constaté au chapitre précédent. Il ne faut toutefois pas cacher que ce choix a également permis de gagner du temps dans la réalisation des expériences et de diminuer drastiquement les temps d'utilisation des voies de potentiostat. Profitant de l'expérience acquise dans les travaux du chapitre 3, nous avons mis en œuvre plusieurs dispositifs « multi-pores » dans le même réacteur. Le même réacteur « multi-anodes » que précédemment a donc été utilisé en y introduisant l'électrode de référence, la contre-électrode et 3 électrodes de travail :

- Un dispositif « multi-pores » de longueur de pore x
- Un dispositif « multi-pores » de longueur de pore y
- Une électrode « simple » correspondant à une électrode libre ayant une surface projetée de $1 \times 2.8 \text{ cm}^2$ égale à la surface disponible pour la colonisation pour les électrodes placées au fond des pores.

Pour des raisons de symétrie au niveau des lignes de courant, il n'a pas été possible d'introduire les trois dispositifs « multi-pores » de 5, 10 et 24 mm dans un seul réacteur. Deux réacteurs « multi-anodes », notés R5-10 et R10-24, l'un équipé d'un DMP de 5 et d'un DMP de 10 mm, l'autre équipé d'un DMP de 10 mm et d'un DMP de 24 mm, sont donc systématiquement mis en œuvre en parallèle lors d'une expérience effectuée avec le même inoculum. Chaque expérience groupant ces deux réacteurs est appelée « run » par la suite. Les résultats présentés dans ce chapitre reposent sur 7 runs successifs. Les électrodes mises en œuvre dans chacun des réacteurs sont rappelées dans le Tableau 2, ainsi que les conditions opératoires. Le positionnement de ces différentes électrodes au sein du réacteur « multi-anodes » est décrit sur la Figure 7 section 2.3 du chapitre 2. Grâce au dispositif N-stat chaque anode a été soumise à un potentiel constant de -0.2 V/ECS pendant une quinzaine de jours à 40°C . Lorsque la densité de courant de l'électrode simple commence à diminuer, un échantillon de solution est prélevé afin de doser l'acétate et sa concentration est ensuite ajustée à 20 mM par ajout d'une solution mère d'acétate de sodium à 2 M.

Tableau 1 : Conditions expérimentales utilisées pour la mise en œuvre des deux réacteurs multi-anodes pour étudier l'effet de la longueur des pores.

Montage à 3 électrodes avec N-stat			
Réacteur : « Multi-anodes » R5-10	3 électrodes de travail : Electrode simple sans DMP (contrôle) DMP 5 mm DMP 10 mm Contre électrode : Grille platine circulaire Référence : ECS		
Réacteur : « Multi-anodes » R10-24	3 électrodes de travail : Electrode simple sans DMP (contrôle) DMP 10 mm DMP 24 mm Contre électrode : Grille platine circulaire Référence : ECS		
Conditions opératoires			
Inoculum : Lixiviat de terreau Milieu de culture : Lixiviat de terreau	40°C	Substrat : Acétate maintenu à 20 mM par ajouts successifs	Bullage de N ₂ 30 min au démarrage
Techniques électrochimiques			
CA : E = -0.2 V/ECS pendant 15 jours		CV : 3 cycles à 1 mV.s ⁻¹ de -0.5 V à 0.2 V/ECS	

La liste de l'ensemble des expérimentations menées lors de cette étude ainsi que les analyses effectuées est dressée dans le Tableau 2. Toutefois, pour des raisons qui seront explicitées par la suite, il n'a pas été possible de réaliser la totalité des expériences avec un lixiviat de terreau provenant d'un même sac de terreau, ce qui aurait été la procédure idéale. Même si le terreau est toujours de la même marque et de la même sorte, deux sacs différents ont dû être employés. Dans la suite, les résultats obtenus avec chacun des deux sacs sont présentés séparément et notés SAC-1 et SAC-2. Certaines expériences avec le sac 2 ont été réalisées avec l'aide très précieuse de Simon GUETTE-MARQUET.

Tableau 2 : Liste des expériences et des analyses réalisées dans le cadre de l'étude de l'effet de la longueur des pores.

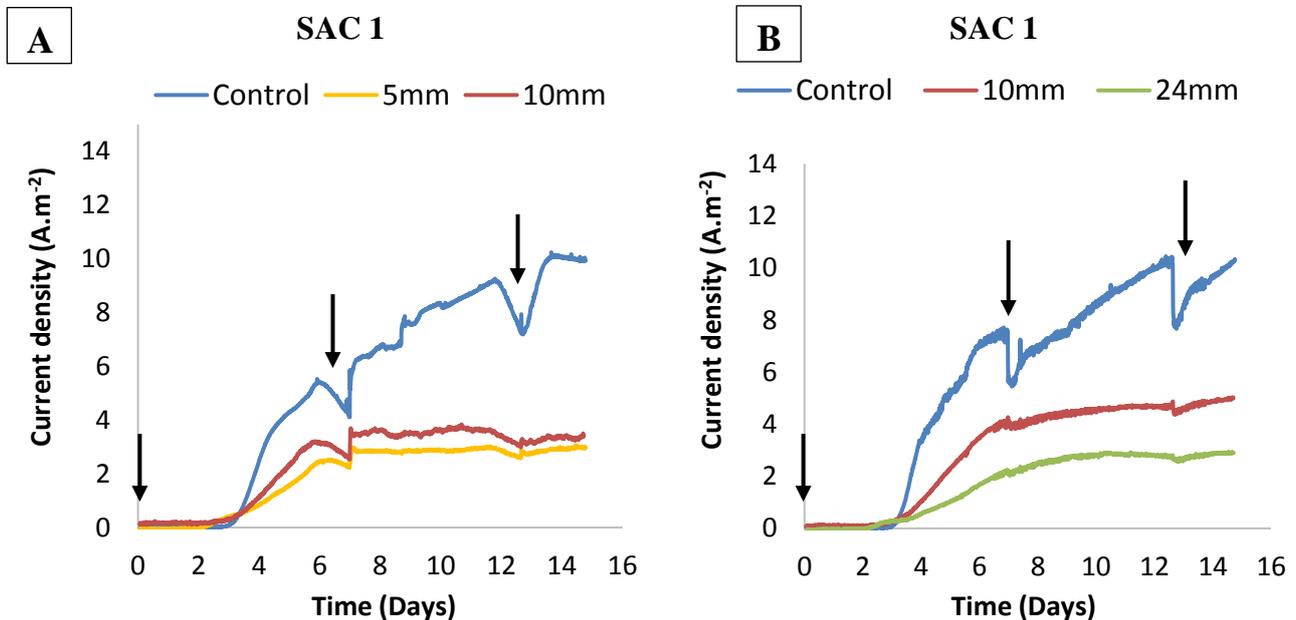
SAC-X / RX-X (Nombre de réacteurs)	Analyse réalisée (Nombre de répliquas et référence dans le manuscrit)
SAC-1 / R5-10 (4 runs)	<ul style="list-style-type: none"> • CAs et CVs (quadrupla cf section 2)
	<ul style="list-style-type: none"> • Visualisation de la colonisation par microscopie à épifluorescence (dupliqua cf section 3.1)
	<ul style="list-style-type: none"> • Analyse de la population microbienne par métabarcoding (dupliqua cf section 3.2) : Incomplète
SAC-2 / R5-10 (2 runs)	<ul style="list-style-type: none"> • CAs et CVs (dupliqua cf section 2)
	<ul style="list-style-type: none"> • Analyse de la population microbienne par métabarcoding (dupliqua cf section 3.2) : Complète
SAC-1 / R10-24 (4 runs)	<ul style="list-style-type: none"> • CAs et CVs (quadrupla cf section 2)
	<ul style="list-style-type: none"> • Visualisation de la colonisation par microscopie à épifluorescence (dupliqua cf section 3.1)
	<ul style="list-style-type: none"> • Analyse de la population microbienne par métabarcoding (dupliqua cf section 3.2) : Incomplète
SAC-2 / R10-24 (2 runs)	<ul style="list-style-type: none"> • CAs et CVs (dupliqua cf section 2)
	<ul style="list-style-type: none"> • Analyse de la population microbienne par métabarcoding (dupliqua cf section 3.2) : Complète

2 EFFET DE LA LONGUEUR DES PORES SUR LES DENSITES DE COURANT

2.1 Chronoampérométrie (CA)

Les courbes de chronoampérométrie sont présentées sur la Figure 2. Les densités de courant sont ramenées à la surface potentiellement colonisable par les microorganismes qui est de 2.8 cm^2 pour les dispositifs « multi-pores » et de 5.6 cm^2 (2 faces de 2.8 cm^2) pour les électrodes « simples » qui servent de contrôle. Toutes les expériences menées avec un même sac de terreau affichent des CAs reproductibles. Par souci de clarté, il a été choisi de ne présenter ici qu'un exemple de courbes de CA enregistrées avec les réacteurs R5-10 et R10-24 et ce, pour chacun des sacs de terreau utilisés.

Les bioanodes (électrodes simples et électrodes placées dans les DMP de 5, 10 et 24 mm) formées à partir d'un lixiviat de terreau provenant du Sac 1 présentent des chronoampérogrammes similaires (Figure 2 A et B). Des exemples de chronoampérogramme des bioanodes inoculées avec du lixiviat issu du Sac 2 sont présentés sur la Figure 2 (C et D).



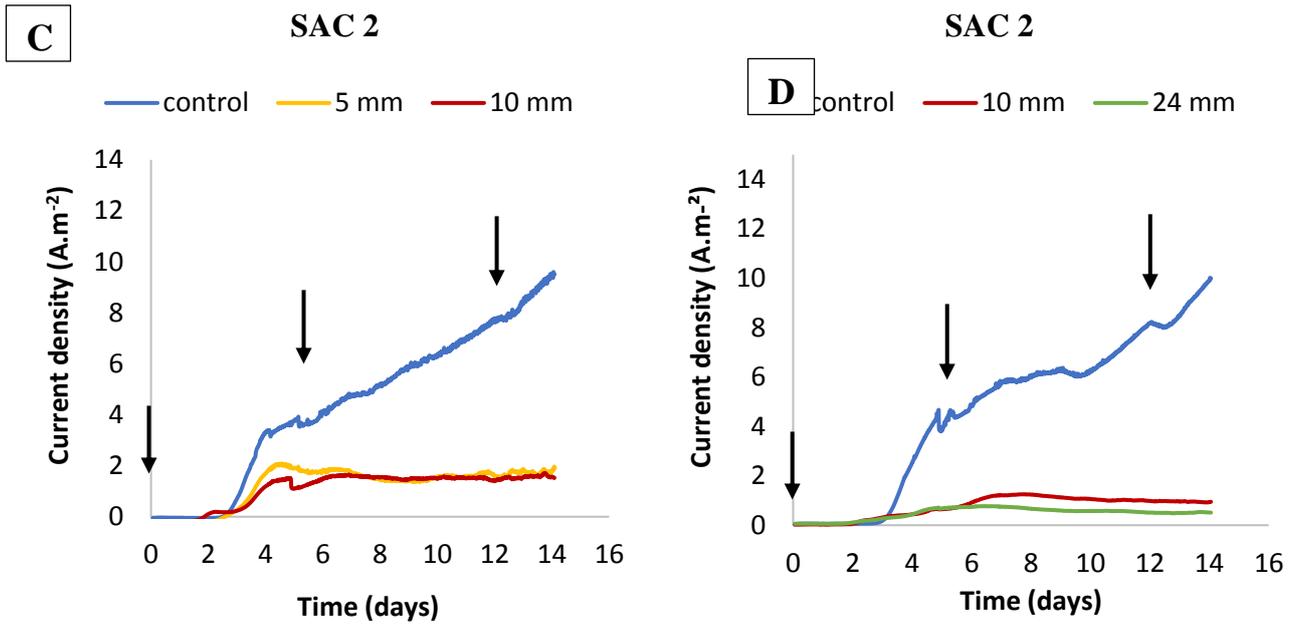


Figure 2 : Chronoampérogrammes des électrodes simples et des électrodes situées dans les dispositifs multi-pores de 5, 10 et 24 mm de longueur en fonction du sac de terreau utilisé pour préparer le lixiviat. Les ajouts d'acétate sont signalés par les flèches noires.

Les électrodes simples produisent dans tous les cas des densités de courant plus élevées que les électrodes DMP (Figure 2). Comme explicité dans le chapitre 3 (Article « Microbial anodes: what actually occurs inside pores? »), cette différence énorme de densité de courant s'explique par le fait que les électrodes simples bénéficient d'un environnement non contraint dans lequel l'acétate et les espèces tampon présents en solution diffusent librement (pour rappel, il n'y a pas agitation). A l'inverse, les électrodes des dispositifs multi-pores positionnées au fond des pores consomment dans un premier temps l'acétate initialement présent dans les pores proche de l'électrode puis doivent « attendre » que l'acétate arrive par diffusion jusqu'au fond des pores.

Les CAs obtenues avec les électrodes positionnées au fond des pores présentent les phases d'évolution de la densité de courant suivantes : une phase de latence suivie d'une phase d'augmentation jusqu'à une valeur maximale (J_{max}). Selon le sac de terreau utilisé pour préparer l'inoculum, la phase qui suit l'augmentation du courant est différente. Les électrodes DMP inoculées à partir du Sac 1 fournissent des densités de courant stables jusqu'à la fin des expériences (Figure 2, A et B), tandis que les électrodes DMP inoculées avec le Sac 2 voient leur performance diminuer lentement au cours du temps (Figure 2, C et D). En outre, les densités de courant des électrodes DMP

inoculées à partir du Sac 2 dépassent difficilement 2 A.m^{-2} , tandis que certaines électrodes DMP inoculées à partir du Sac 1 atteignent 4 A.m^{-2} (Figure 2). On aurait pu penser que ces différences sont dues à des communautés bactériennes différentes dans les Sacs 1 et 2. En effet, les manipulations à partir du Sac 1 ont été réalisées en été-automne, tandis que celles avec le Sac 2 en hiver. En fonction des saisons, la flore microbienne présente dans le terreau pourrait être différente. Toutefois, cette explication peut être remise en cause car le comportement des électrodes simples est identique quel que soit le sac. Seules les performances des électrodes DMP sont impactées par le sac de terreau utilisé. La nécessité de se déplacer le long de pores pour atteindre la surface de l'électrode révélerait-elle des différences dans les communautés microbiennes que les électrodes de contrôle ne discernent pas ? La raison de ces différences reste floue. Des tests de caractérisation de la densité bactérienne, de la viabilité cellulaire et des communautés des populations dans les lixiviats initiaux auraient pu amener quelques pistes de réflexion supplémentaires.

2.1.1 Phase de latence (Phase I)

La phase de latence correspond à la durée nécessaire aux premières bactéries EA pour atteindre la surface de l'électrode, y adhérer et mettre en place leur métabolisme de transfert d'électrons extracellulaire. Nous avons remarqué que la durée de la phase de latence varie énormément en fonction de l'âge du terreau utilisé pour la préparation du lixiviat qui sert d'inoculum. L'âge du terreau considéré ici correspond au temps écoulé depuis l'ouverture du sac de terreau jusqu'à la préparation du lixiviat. Par exemple, un terreau de 10 jours correspond au terreau utilisé 10 jours après que le sac ait été ouvert. La Figure 3 dresse une vue chronologique de l'ensemble des expériences réalisées en fonction de l'âge des échantillons de terreau issus des deux sacs.

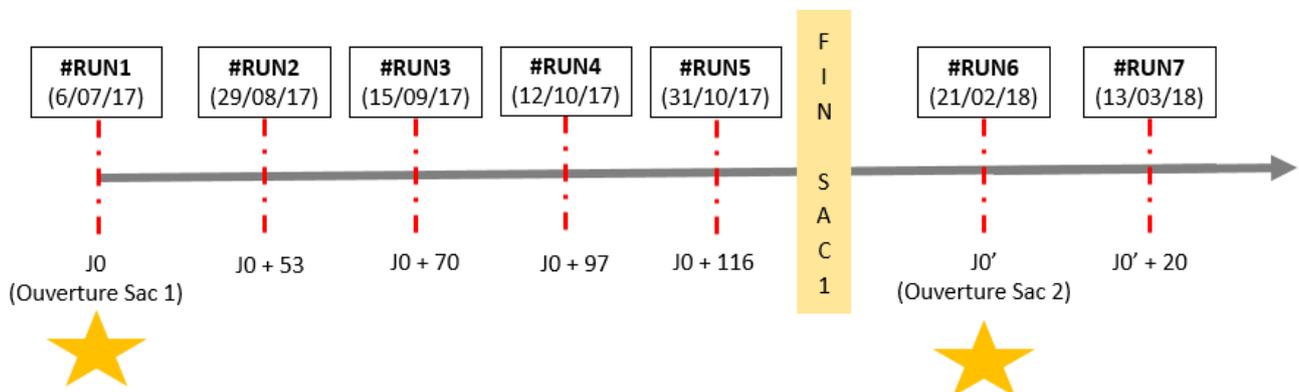


Figure 3 : Planning des manipulations effectuées pour l'étude de l'effet de la longueur de pore.

La Figure 4 montre l'évolution de la durée de la phase de latence (Phase I) en fonction de l'âge du terreau pour l'ensemble des expériences réalisées dans ce chapitre.

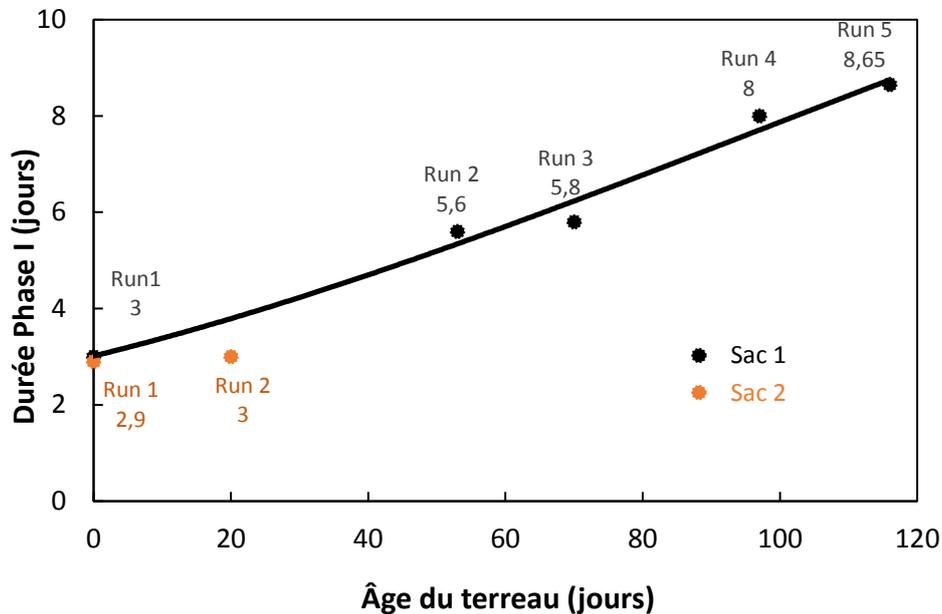


Figure 4 : Evolution de la durée de la Phase I (temps de latence) en fonction de l'âge du terreau (temps écoulé depuis l'ouverture du sac) provenant des Sac 1 et 2.

La tendance générale de la courbe correspondant au Sac 1 (Figure 4, points et courbe noirs) indique que plus le terreau est vieux plus le courant met du temps à s'établir à la fois sur les électrodes du DMP et les électrodes simples servant de contrôles. Lorsque le terreau est frais (à l'ouverture du sac), il faut environ 3 jours au biofilm EA pour produire du courant (Runs 1, Figure 4). Pour des terreaux âgés de 50 et 100 jours, le temps de latence est allongé à 5.6 (Sac 1, Run 2) et 8 (Sac 1, Run 4) jours respectivement. Toutefois, lorsque deux expériences sont effectuées à partir d'un terreau jeune à 20 jours d'intervalle, la durée de la Phase I semble peu impactée : 2.9 (Run 1) et 3 (Run 2) jours. Toutefois, dans ce cas l'âge du terreau reste relativement jeune (20 jours maximum) pour que l'on puisse déterminer si le Sac 2 aurait conduit à des valeurs du temps de latence stables ou aurait suivi la même tendance que le Sac 1.

L'augmentation du temps de latence avec l'âge du terreau pourrait être liée aux conditions de stockage. Aucune précaution particulière n'a été mise en place pour stocker et stabiliser le terreau. Une fois le sac ouvert, celui-ci était entreposé à température ambiante dans le laboratoire jusqu'à utilisation complète du terreau. Après l'ouverture du sac, le terreau est exposé à l'oxygène de l'air.

En conséquence, la composition des communautés bactériennes doit certainement être impactée à la défaveur des populations anaérobies, or les populations anaérobies renferment la plupart des espèces électroactives. Par exemple, on sait que des sols anaérobies favorisent la croissance d'espèces bactériennes électroactives comparé à des sols aérobies (Miceli et al. 2012; Commault et al. 2015). De ce fait, après ouverture du sac, il est légitime de suspecter que la densité des espèces bactériennes EA ait été affectée par l'exposition à l'air, ce qui expliquerait l'allongement de la phase I des CAs au fur et à mesure que le terreau vieillit. Il faut de plus en plus de temps pour que les bactéries EA ayant survécu dans le sac atteignent un seuil minimal de prolifération impactée à la surface de l'électrode pour produire du courant.

Néanmoins, seule la durée de la phase I a été impactée par l'âge du terreau car même après 116 jours d'ouverture du sac de terreau 1 (#Run5) les densités de courant délivrées par les électrodes sont similaires à celles des électrodes du #Run1 (terreau frais) (Figure 5).

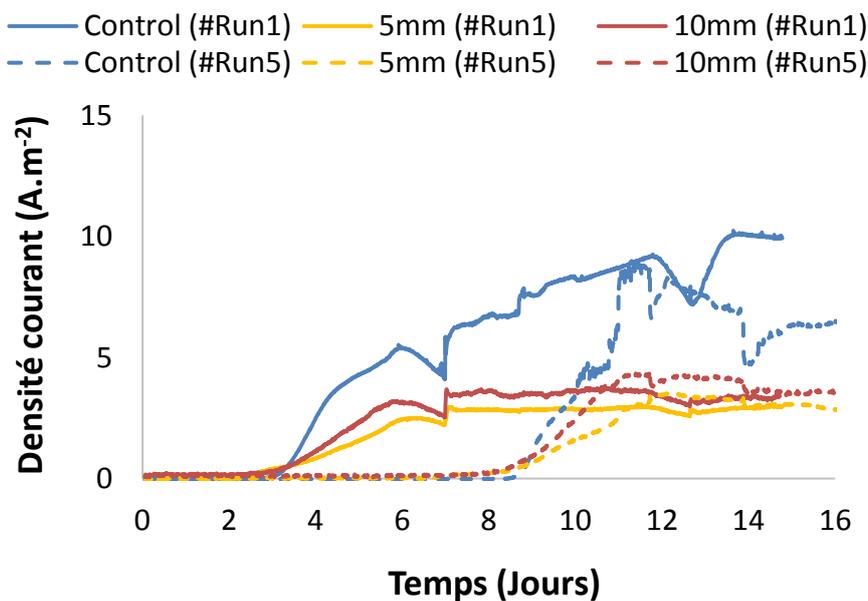


Figure 5 : Comparaison des chronoampérogrammes obtenus lors des #Run1 et #Run5 réalisés après 0 et 116 jours d'ouverture du sac de terreau.

2.1.2 Démarrage et augmentation sigmoïdale du courant (Phase II)

Les électrodes dans les DMP génèrent du courant en même temps ou avant les électrodes simples qui servent de contrôle. La plupart du temps, c'est-à-dire dans 9 cas sur 12 si l'on considère la totalité des expériences menées avec les deux sacs de terreau, la production de courant par les électrodes

dans les DMP démarre avec celle des électrodes simples, et ce jusqu'à environ 1 jour d'avance (Figure 6, B). Pour les 3 autres cas, les électrodes des DMP et les électrodes simples entament la production de courant au même moment comme illustré à la Figure 6, A. Ce résultat est assez contre-intuitif car nous aurions plutôt anticipé que les électrodes masquées par les DMP démarrent la production de courant plus tardivement que les électrodes de contrôle.

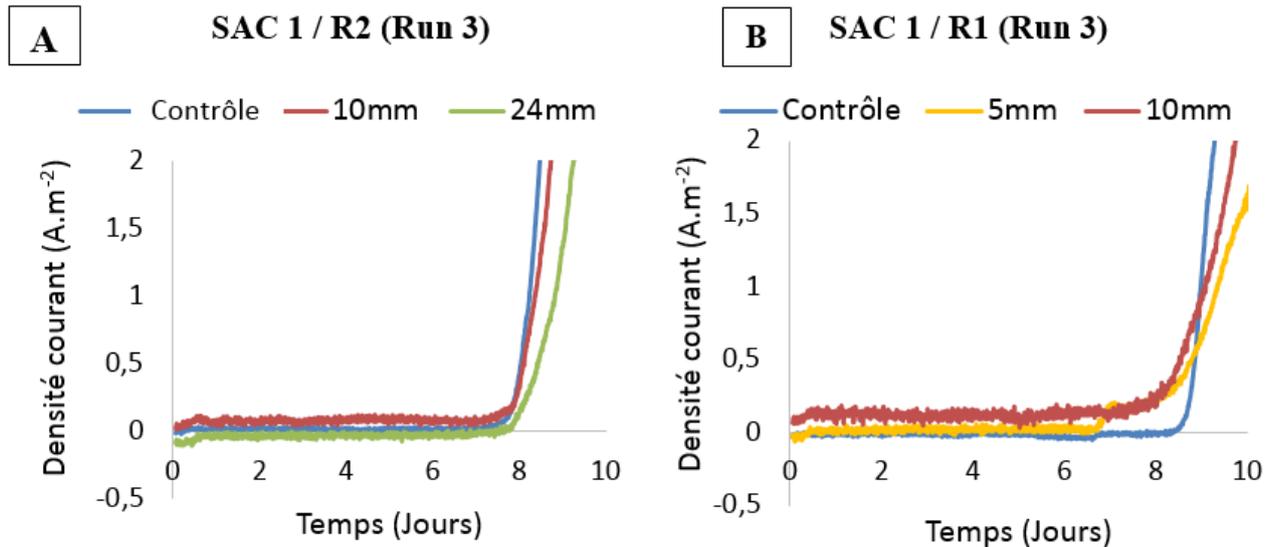


Figure 6 : Démarrage de la production du courant (phase II) pour les électrodes simples et les électrodes situées dans les dispositifs multi-pores de 5, 10 et 24 mm.

Parmi les résultats surprenants, notons encore que la longueur des pores, de 5 à 24 mm, n'a aucun effet sur le temps de démarrage du courant. Ce résultat suggère que la phase initiale de formation du biofilm ne fait pas intervenir les bactéries provenant de la solution externe, mais uniquement les bactéries de la solution contenue dans les pores. En effet, en considérant une taille de cellule de 1 μm , pour atteindre la surface de l'électrode depuis la solution externe, une bactérie doit parcourir une distance représentant 5000 à 24 000 fois sa taille dans les pores de 5 et 24 mm respectivement. Il est difficilement concevable qu'un tel écart n'ait aucune répercussion sur le temps de démarrage de la production du courant. Il faut donc en conclure que la phase initiale du biofilm utilise essentiellement les bactéries contenues dans les pores.

En considérant qu'une électrode en fond de pore n'a comme source de microorganismes que ceux contenus dans le pore, on conçoit que beaucoup moins de bactéries, à la fois EA et non-EA, arrivent à leur surface en comparaison des électrodes de contrôle qui sont facilement accessibles par la multitude de bactéries présentes dans la solution. Les processus de compétition pour coloniser la

surface doivent donc être beaucoup moins intenses que pour les électrodes de contrôle. Pour illustrer ce raisonnement de façon simple, considérons un élément de surface qui soit capable d'accueillir 100 cellules bactériennes adhérentes. Exposé à la solution, supposons qu'il reçoive dès les premiers instants 80 cellules non-EA et 20 cellules EA. Les cellules EA pour développer leur métabolisme de transfert d'électrons extracellulaire ont besoin d'un accès à la surface de l'électrode, dans cette configuration elles auront du mal à se développer car la totalité des 100 sites d'adhésion sont occupés. Au contraire, supposons que le même élément de surface placé au fond d'un pore ne reçoive que 16 cellules non-EA et 4 cellules EA. Les cellules EA pourront alors bénéficier de 80 sites d'adhésion libres et se développer ainsi beaucoup plus facilement à la surface de l'électrode. L'hypothèse que seules les bactéries présentes au sein du pore participent à la constitution initiale du biofilm EA expliquerait donc le démarrage légèrement plus rapide de la production de courant par les électrodes dans les DMP.

Si ces hypothèses étaient vérifiées il faudrait voir dans le taux d'inoculation et les conditions d'inoculation des paramètres très importants pour l'établissement des biofilms. Rappelons que l'activité électrocatalytique, quel que soit le mécanisme de transfert électronique, nécessite que les cellules bactériennes aient un accès à la surface de l'électrode. La constitution des premières couches cellulaires du biofilm est donc un aspect essentiel de l'efficacité des biofilms EA (Dumas et al., 2008). Les expérimentations en DMP suggèrent que les conditions d'inoculation puissent offrir un moyen d'intervenir sur cette phase initiale de formation des biofilms EA.

Suite au démarrage du courant, celui-ci augmente jusqu'à atteindre une valeur maximale de densité de courant J_{\max} (Figure 2). Pour caractériser cette phase de montée du courant, deux paramètres sont relevés sur chaque courbe de CA : la pente maximale $(\Delta J)_{\max}$ déterminée sur une durée d'un jour et la valeur de J_{\max} . Le Tableau 3 donne les valeurs moyennes de ces paramètres.

Tableau 3 : Valeurs moyennes de la pente maximale (estimée sur 1 jour) et du J_{max} déterminées pour les électrodes simples et les électrodes dans les DMP de 5, 10 et 24 mm de longueur. n correspond au nombre de valeurs exploitées pour calculer les moyennes et les écarts-types. Les valeurs signalées en rouge sont les plus élevées de la colonne pour les électrodes dans les DMP.

Sac de Terreau SAC 1

R5-10	$(\Delta J)_{max}$ ($A.m^{-2}.j^{-1}$)	J_{max} ($A.m^{-2}$)	R10-24	$(\Delta J)_{max}$ ($A.m^{-2}.j^{-1}$)	J_{max} ($A.m^{-2}$)
Contrôle (n=4)	3.10 ± 1.46	10.77 ± 1.52	Contrôle (n=4)	5.17 ± 1.29	10.25 ± 1.46
5 mm (n=4)	1.24 ± 0.55	3.80 ± 0.78	24 mm (n=4)	1.44 ± 0.74	3.84 ± 0.70
10 mm (n=4)	1.82 ± 0.77	5.09 ± 1.59	10 mm (n=4)	2.72 ± 1.42	6.74 ± 1.28

Sac de Terreau SAC 2

R5-10	$(\Delta J)_{max}$ ($A.m^{-2}.j^{-1}$)	J_{max} ($A.m^{-2}$)	R10-24	$(\Delta J)_{max}$ ($A.m^{-2}.j^{-1}$)	J_{max} ($A.m^{-2}$)
Contrôle (n=2)	2.23 ± 0.62	10.62 ± 1.32	Contrôle (n=2)	3.13 ± 0.42	12.29 ± 3.14
5 mm (n=2)	0.45 ± 0.06	1.88 ± 0.42	24 mm (n=2)	0.32 ± 0.19	0.81 ± 0.05
10 mm (n=2)	0.56 ± 0.12	1.58 ± 0.21	10 mm (n=2)	0.33 ± 0.12	1.62 ± 0.52

Le $(\Delta J)_{max}$ et le J_{max} sont toujours plus élevés pour les électrodes simples que pour les électrodes dans les DMP pour les raisons exposées précédemment au tout début de la section 2.1 de ce chapitre. Les résultats obtenus avec les deux sacs de terreau sont pratiquement similaires pour les électrodes simples : 3.10 (Sac 1) et 2.23 (Sac 2) $A.m^{-2}.j^{-1}$ pour $(\Delta J)_{max}$ et 10.77 (Sac 1) et 10.62 (Sac 2) $A.m^{-2}$, pour le J_{max} .

La suite de l'analyse porte uniquement sur les performances des électrodes DMP de 5, 10 et 24 mm. Le R5-10 qui mettait en œuvre un DMP 5mm et DMP 10mm montre qu'en passant d'une longueur de pore de 5 mm à 10 mm, $(\Delta J)_{max}$ augmente en moyenne de 47 % (1.24 à 1.82 $A.m^{-2}.j^{-1}$) avec le Sac 1 et de 24 % (0.45 à 0.56 $A.m^{-2}.j^{-1}$) avec le Sac 2, tandis que J_{max} augmente de 34 % avec le Sac 1 (3.80 à 5.09 $A.m^{-2}$) et diminue de 19 % (1.88 à 1.58 $A.m^{-2}$) avec le Sac 2. Au cours de la phase II, la

montée du courant est plus rapide avec le DMP de 10 mm. Par contre il n'est pas possible de conclure en termes de J_{\max} .

Concernant le réacteur R10-24, qui comparait un DMP 10mm et un DMP 24mm, avec le Sac 1 des écarts significatifs apparaissent entre les DMP de 10 et 24 mm que ce soit au niveau de $(\Delta J)_{\max}$ ou de J_{\max} . En effet, avec le DMP de 10 mm $(\Delta J)_{\max}$ augmente en moyenne de 89% et J_{\max} est presque deux fois supérieur à celui atteint avec le DMP de 24 mm (3.84 vs. 6.74 A.m⁻²). Avec le Sac 2, $(\Delta J)_{\max}$ obtenu avec les deux DMP est similaire : 0.32 (24 mm) et 0.33 (10 mm) A.m⁻².j⁻¹. Toutefois, J_{\max} avec le DMP 10 mm reste deux fois supérieur à celui du DMP 24 mm (0.81 vs. 1.62 A.m⁻²). Au cours de la phase II, une différence claire s'établit entre les DMP de 10 mm et 24 mm : l'activité bio-électrocatalytique est plus performante avec le DMP 10 mm.

Enfin, la comparaison des DMP de 5 mm et de 24 mm montre qu'en augmentant la longueur de pore de 5 à 24 mm $(\Delta J)_{\max}$ augmente de 16 % avec le Sac 1 et diminue de 41 % avec le Sac 2, tandis que J_{\max} est 1 % plus élevé avec le Sac 1 et 32 % plus faible avec le Sac 2. Il est donc difficile de dégager une tendance entre les DMP de 5 et 24 mm car les résultats dépendent en fonction du sac de terreau employé.

En conclusion, l'ensemble des expérimentations effectuées avec des DMP (5, 10 et 24 mm) indique que la longueur de pore de 10 mm conduit toujours au $(\Delta J)_{\max}$ le plus élevé et ceci indépendamment du sac de terreau utilisé. En outre, c'est également avec ce dispositif que les valeurs de J_{\max} sont maximales, à l'exception d'un cas (Sac 2, R5-10) pour lequel la valeur de J_{\max} délivrée par le DMP de 5 mm est légèrement supérieure à celle du DMP de 10 mm. Finalement, au cours de la phase II, le DMP de 10 mm est dans l'ensemble celui qui permet une activité bio-électrocatalytique la plus performante. Concernant les autres DMP (5 et 24 mm), une analyse globale des résultats semble indiquer que l'activité catalytique des bioanodes présente des performances très proches.

2.1.3 Charge électrique produite

Pour avoir une analyse globale des performances des bioanodes, la charge électrique (ou quantité d'électricité) produite a été déterminée pour chaque électrode (simple et en DMP) en intégrant les courbes de CA de 0 à 15 jours. Les valeurs moyennes sont présentées dans le Tableau 4.

Tableau 4 : Valeurs moyennes de la charge électrique (quantité d'électricité) délivrée pendant 15 jours de CA. *n* correspond au nombre de valeurs exploitées pour calculer les moyennes et les écarts-types.

<i>R5-10</i> Charge (C)	SAC 1	SAC 2	<i>R10-24</i> Charge (C)	SAC 1	SAC 2
Contrôle (n=4)	2340 ± 812	2473 ± 646	Contrôle (n=4)	2544 ± 862	2666 ± 616
5 mm (n=4)	492 ± 162	440 ± 33	24 mm (n=4)	517 ± 140	168 ± 6
10 mm (n=4)	647 ± 219	400 ± 39	10 mm (n=4)	889 ± 176	224 ± 42

Les électrodes dans les DMP produisent des quantités d'électricité comprises entre 168 à 889 C sur 15 jours. Ces charges électriques sont beaucoup plus faibles que celles produites par les électrodes simples qui sont entre 2340 et 2666 C. Les DMP de 10 mm fournissent systématiquement des charges plus importantes que les DMP de 24 mm, et ceci indépendamment du sac de terreau employé. De façon plus aléatoire, les DMP de 10 mm produisent des charges relativement proches de celles des DMP de 5 mm (Sac 2) ou alors des charges plus élevées (Sac 1). Cela dépend du sac de terreau utilisé. Enfin, en faisant la moyenne des charges électriques obtenues avec les DMP de 5 et 24 mm sans distinction des sacs de terreau, il s'avère que les DMP de 5 mm (466 C) sont globalement plus performants que les DMP de 24 mm (343 C).

Cette analyse basée sur la production globale de courant pendant 15 jours a confirmé les conclusions suggérées par la comparaison des valeurs de J_{\max} et $(\Delta J)_{\max}$ de la phase II.

2.1.4 Eléments de réflexion : le transport du substrat

En théorie, le substrat (acétate) met un temps proportionnel à la longueur des pores pour être transporté de la solution jusqu'à l'électrode située au fond des pores. Le temps de transport vers l'électrode est donc croissant des pores de 5 à 24 mm de long. Dans nos conditions opératoires, le milieu réactionnel n'est pas agité. Les modes de transport prépondérants sont donc la diffusion, et la migration lorsque du courant est produit.

Pour chaque ion présent dans la solution, le flux moléculaire arrivant à l'électrode par migration peut être calculé grâce au nombre de transport (Oliot et al. 2016). Le nombre de transport t_i correspond à la fraction du courant électrique transportée par l'espèce ionique i et est déterminé selon l'équation :

$$t_i = \frac{\lambda_i C_i}{\sum_k \lambda_k C_k} \quad (1)$$

avec : λ_i la conductivité molaire ionique de l'espèce i ($\text{m}^2 \cdot \text{S} \cdot \text{mol}^{-1}$) et C_i la concentration molaire de l'espèce i dans le milieu ($\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}$).

Il serait complexe, long et coûteux de faire une analyse exhaustive des ions présents dans le lixiviat de terreau. Nous avons donc réalisé une évaluation rapide des flux de migration en ne considérant que les ions qui ont été ajoutés au lixiviat (Tableau 5). En solution le courant est majoritairement transporté par le déplacement des ions K^+ vers la contre électrode et des ions Cl^- vers la bioanode. A peine 8 % du courant est transporté par les ions acétate.

Tableau 5 : Conductivité molaire ionique limite, concentration et nombre de transport des ions ajoutés au lixiviat de terreau à t_0 . Les valeurs des conductivités molaires ioniques sont tirées de (Haynes 2014).

Ions	Conductivité molaire ionique limite ($10^{-4} \text{ m}^2 \cdot \text{S} \cdot \text{mol}^{-1}$)	Concentration molaire (mM)	t_i (%)
K^+	73.5	60	41
Cl^-	76.3	60	42
Na^+	50.1	20	9
CH_3COO^-	40.9	20	8

A partir des nombres de transport, les flux moléculaires peuvent être déterminés. Pour une base de 100 électrons extraits à la bioanode par exemple, le flux moléculaire Φ_i de l'espèce ionique i est donné par :

$$\Phi_i = \frac{t_i \cdot 100}{z_i} \quad (2)$$

où z_i est la charge de l'ion i . Les résultats sont reportés sur la Figure 7.

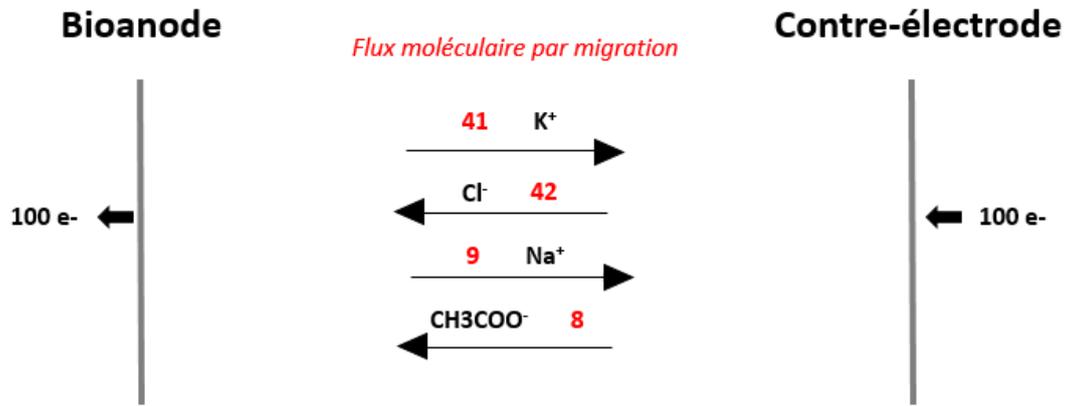
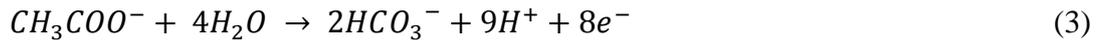


Figure 7 : Représentation schématique des flux moléculaires de migration au sein de l'électrolyte. Les nombres sont donnés en molécules pour un bilan de 100 électrons passant dans le circuit électrique.

L'oxydation de l'acétate à la surface de la bioanode se fait selon la réaction :



Lorsque 100 électrons sont extraits, 12.5 molécules d'acétate ont été consommées à la bioanode. Nous venons de démontrer que 8 molécules d'acétate sont transportées à la bioanode par migration ce qui signifie que 4.5 molécules doivent arriver par diffusion afin de maintenir le courant. La majorité de l'acétate est donc transporté à la bioanode par migration.

En considérant qu'au fond des pores, à la surface de l'électrode, tout l'acétate est consommé et que la concentration en acétate est de 20 mM en solution à l'extérieur du DMP, il est possible d'estimer le temps nécessaire pour que les ions acétate CH_3COO^- parcourent la longueur du pore (L) par diffusion :

$$t_{diff} = \frac{L^2}{2D} \quad (4)$$

où D est le coefficient de diffusion de l'acétate à 40°C ($1.64 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$),

et par migration :

$$t_{mig} = \frac{L}{v_{\text{CH}_3\text{COO}^-}} \quad (5)$$

où $v_{\text{CH}_3\text{COO}^-}$ est la vitesse de migration de l'ion acétate à 40°C dans un champ électrique de $1 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$ ($55.12 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ (Haynes, 2014)). Les résultats reportés dans le Tableau 6 montrent que pour arriver au fond des pores de 24 mm, l'acétate met 2,4 (migration) à 5 fois (diffusion) plus de temps que pour

arriver au fond des pores de 10 mm, et entre 4 (migration) à 10 fois (diffusion) plus que pour parvenir au fond des pores de 5 mm.

Tableau 6 : Temps de transport de l'acétate dans les pores de 5, 10 ou 24 mm des DMP calculés en tenant compte d'un transport assuré purement par diffusion ou purement par migration. Hypothèses considérées : réacteur non agité, température 40°C, concentration en acétate 0 mM au fond des pores et 20 mM à l'entrée des pores.

	5 mm	10 mm	24 mm
t_{diff}	2h12	8h30	2 jours
t_{mig}	15 min	30 min	1h13 min

Le transport du substrat par migration ou par diffusion au sein des DMP est certainement une étape limitante importante dont il faut tenir compte dans l'interprétation des résultats. Les écarts entre les pores de longueur 5, 10 et 24 mm sont considérables et, au titre des transports de matière, les pores sont clairement (et logiquement) classés dans l'ordre 5 > 10 > 24 mm. Au contraire, les pores de 10 mm induisent des performances électrocatalytiques supérieures à ceux de 5 et 24 mm. En conséquence, même si les transports de matière sont des éléments importants à prendre en compte ils ne peuvent expliquer à eux-seuls les résultats obtenus en CA. D'autres processus majeurs interviennent nécessairement pour placer les pores de 10 mm sur la plus haute marche du podium.

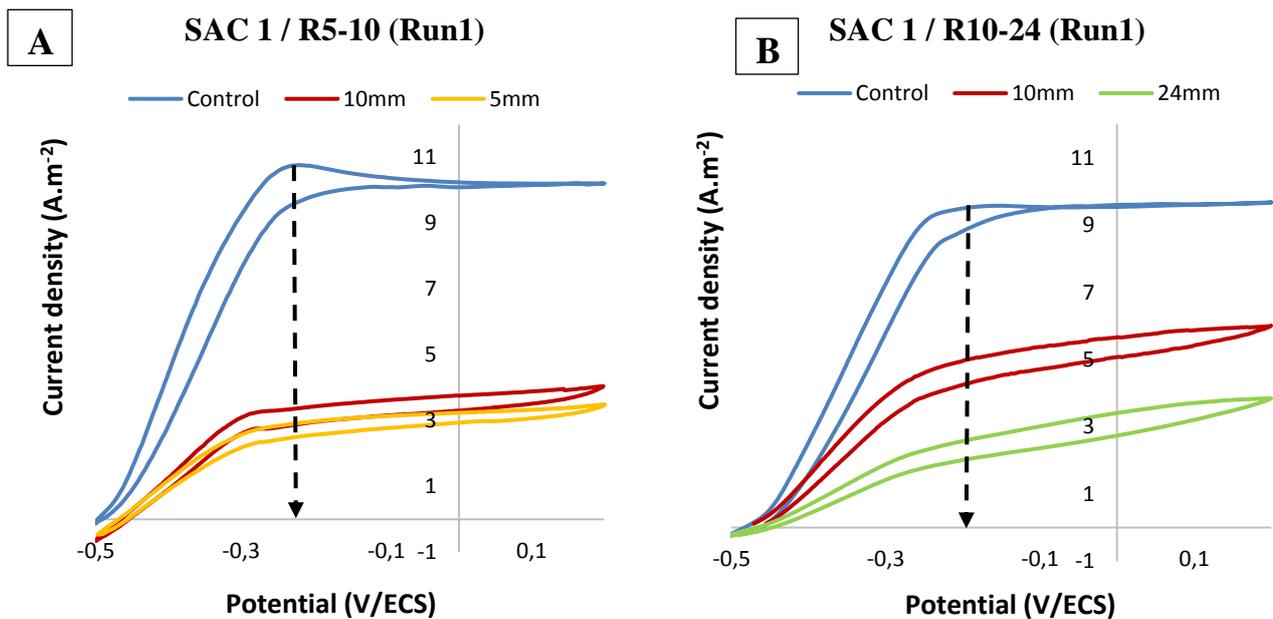
2.1.5 Eléments de réflexion : pression sélective exercée par le pore?

Il pourrait exister un phénomène de sélection des bactéries électroactives réalisé par les pores des DMP. En effet, nous avons suggéré que la phase initiale de formation des biofilms ne faisait appel qu'aux bactéries présentes dans les pores (section 2.1.2) mais, par la suite, le biofilm pourrait utiliser les bactéries provenant de la solution pour continuer à se construire. Dans ce contexte, seules les bactéries EA ont un intérêt (vital) à s'aventurer au fond des pores et il faudrait alors supposer que les bactéries EA ont un système de détection des électrodes ou, a minima, de détection des surfaces chargées. Il serait alors probable que la sélection des bactéries EA soit intensifiée par l'allongement des pores. Plus le pore est long, plus l'électrode est hors d'atteinte pour les bactéries non-EA et plus le pourcentage de bactéries EA qui atteignent l'électrode serait ainsi important. Cette hypothèse expliquerait pourquoi le DMP de 10 mm est plus efficace que le DMP de 5 mm : une longueur de pore de 5 mm ne serait pas suffisante pour mettre l'électrode hors de portée de nombreuses bactéries

non-EA. Les pores de 10 et 24 mm induiraient une sélection plus drastique de bactéries EA. Toutefois, pour les pores les plus longs, la limitation par le transport de matière viendrait atténuer l'effet vertueux de la sélection microbienne. La prédominance des pores de 10 mm serait ainsi expliquée par deux processus antagonistes : la longueur des pores qui serait favorable à la sélection de bactéries EA mais défavorable au transport du substrat.

2.2 Voltammétrie cyclique (CV)

Des voltammétries cycliques (CVs) de l'ensemble des bioanodes (simples et en DMP) sont enregistrées en fin de manipulation (Jour 15) à faible vitesse de balayage ($1\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$) en condition de turnover (présence d'acétate). L'ensemble des courbes présente une forme sigmoïdale (Figure 8) avec une allure classique de bioanodes formées dans du lixiviat de terreau et alimentées en acétate (Pocaznoi et al. 2012; Ketep et al. 2014; Oliot et al. 2017).



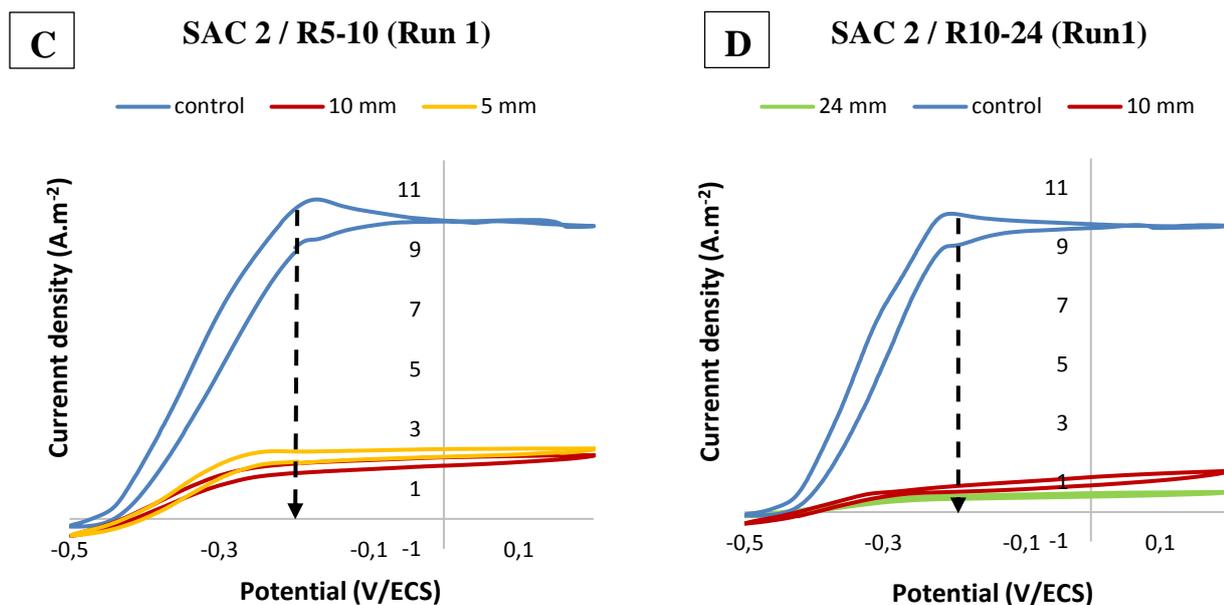


Figure 8 : Voltammétries cycliques des bioanodes (électrodes simples et en DMP de 5, 10 et 24 mm) formées dans du lixiviat de terreau après 15 jours de polarisation à -0.2 V/ECS en présence d'acétate 20 mM. Vitesse de balayage $1\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

Les densités de courant mesurées à -0.2 V/ECS sur les CVs (Figure 8) sont similaires aux densités de courant obtenues lors des chronoampérométries (Figure 2). Ce qui signifie que la vitesse de balayage choisie est assez lente pour rendre compte des caractéristiques stationnaires des biofilms EA. L'oxydation de l'acétate commence entre -0.5 à -0.45 V/ECS pour les biofilms formés à partir du Sac 1 de terreau (Figure 8, A et B) et à partir de -0.43 V/ECS pour les biofilms obtenus avec le Sac 2 (Figure 8, C et D). Les décalages observés avec les deux sacs doivent être dus à des valeurs de pH légèrement différentes en fin d'expérience.

Un pic apparaît sur les CVs des électrodes simples vers -0.2V/ECS qui ne figure pas sur les CVs des électrodes en DMP. Ce pic a déjà été observé dans la bibliographie dans le cas de biofilms formés à partir d'une culture pure (Strycharz et al. 2011) ou d'un consortium bactérien multi-espèces (Pocaznoi et al. 2012; Oliot et al. 2017). D'après une étude menée par Strycharz *et al*, ce pic traduirait une limitation par le transfert d'électrons de la cellule microbienne vers le réseau de transfert d'électrons du biofilm (Strycharz et al. 2011).

L'analyse des CVs est poursuivie en calculant leurs dérivées premières. Chaque point d'inflexion relevé sur la CV (Figure 8) qui se manifeste par un maximum sur la dérivée première (Figure 9) peut être attribué à un système redox (Rimboud et al. 2014).

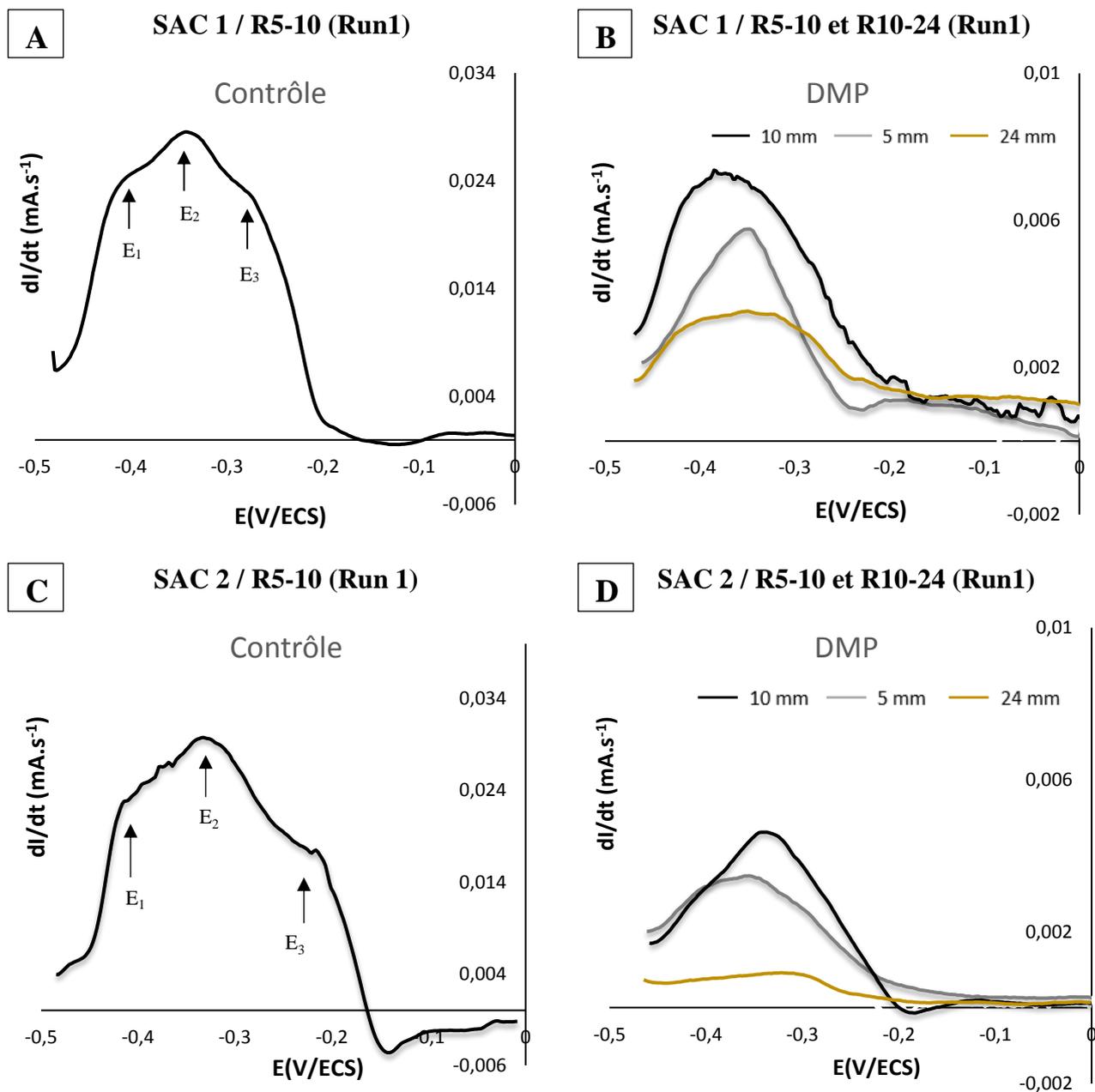


Figure 9 : Dérivées premières des CVs de la Figure 8. Les flèches indiquent les maximums correspondants à des points d'inflexions sur les CVs.

Les dérivées premières donnent 3 maximums pour les électrodes simples, quel que soit le sac (1 ou 2) de terreau (Figure 9, A et C). Trois systèmes redox sont donc détectés sur les électrodes simples. Les dérivées premières des CVs des électrodes en DMP affichent une allure différente de celle des électrodes simples avec la présence d'un seul maximum (Figure 9, B et D). Un seul système redox serait donc présent.

Le Tableau 7 reporte les potentiels de chacun des maximums. L'ensemble de ces résultats démontre clairement une différence au niveau de la composition redox des biofilms formés sur une électrode simple et une électrode en DMP. On passe de 3 systèmes redox sur une électrode simple à seulement 1 sur une électrode DMP. Ce constat pourrait conforter l'hypothèse d'une sélection de bactéries EA au niveau des DMP ou indiquer que les bactéries soumises à une carence en substrat n'expriment pas les mêmes systèmes redox.

Tableau 7 : Potentiels des points d'inflexion des voltammétries cycliques catalytiques des différentes bioanodes (électrodes simples et en DMP de 5, 10 et 24 mm) formées à partir d'un lixiviat de terreau provenant du Sac 1 (n=2) et du Sac 2 (n=2). Le signe « / » signifie qu'aucun point d'inflexion n'est détecté au potentiel indiqué.

	E ₁	E ₂	E ₃
	Electrode contrôle (n= 4)		
	-0.43 ± 0.01	-0.35 ± 0.02	-0.26 ± 0.04
	Electrode DMP (n= 4)		
DMP 5 mm	/	-0.37 ± 0.02	/
DMP 10 mm	/	-0.35 ± 0.01	/
DMP 24 mm	/	-0.34 ± 0.03	/

3 EFFET DE LA LONGUEUR DU PORE SUR LA COLONISATION MICROBIENNE

3.1 Cartographie de la colonisation des électrodes

La colonisation des bioanodes (électrodes simples et électrodes en DMP de 5, 10 et 24 mm) a été observée en fin d'expérience, c'est-à-dire après 15 jours de polarisation à -0.20 V/ECS par microscopie à épifluorescence avec un duplicata de chaque type d'électrode.

Pour les électrodes simples, des images ont été acquises sur trois « spots » différents choisis de façon aléatoire. Des exemples de ces images sur une électrode simple sont donnés sur la Figure 10. Les images montrent toutes un biofilm dense et uniforme formé entre les fibres du tissu de carbone. Ces observations sont cohérentes avec les fortes densités de courant de l'ordre de 10 A.m⁻² atteintes avec les électrodes simples durant les chronoampérométries (Figure 2).

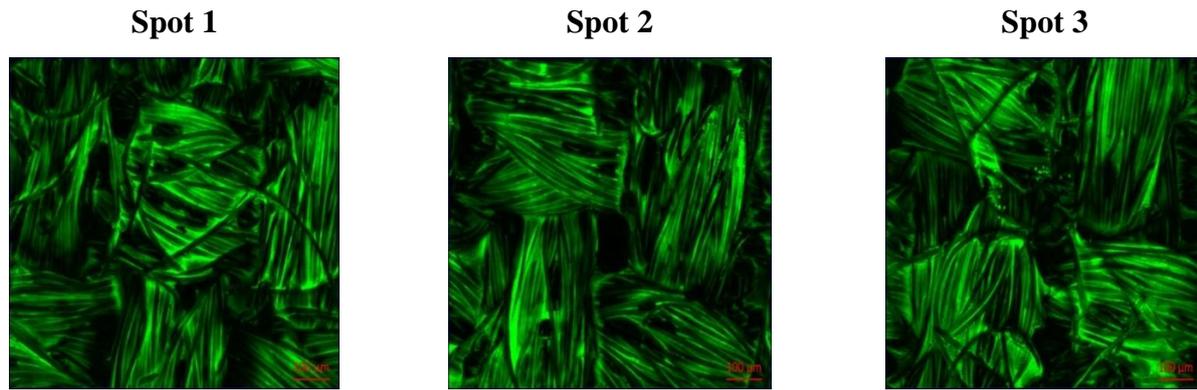
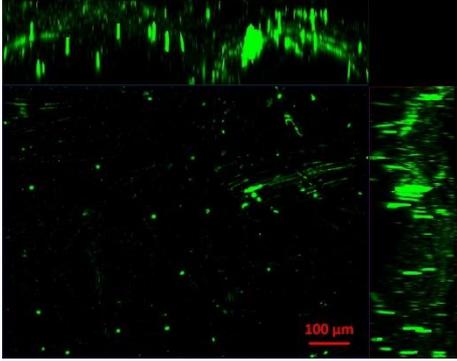
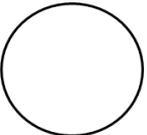
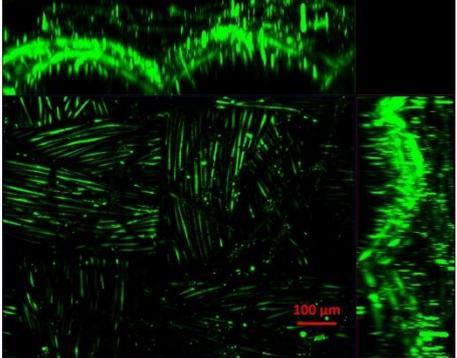
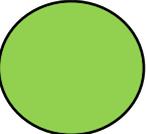


Figure 10 : Observation en microscopie à épifluorescence de la colonisation d'une électrode simple polarisée à $-0.2V/ECS$ pendant 15 jours dans du lixiviat de terreau alimenté avec de l'acétate (20mM).

Pour les électrodes en DMP, les observations microscopiques réalisées après le démontage des DMP ont bien confirmé la présence de biofilm sur le tissu de carbone uniquement au niveau des pores. Afin d'évaluer l'homogénéité de la colonisation microbienne des différents pores, la densité de biofilm a été quantifiée pour chacun des 90 pores sur toutes les électrodes DMP. Un barème de quatre niveaux, avec une charte de couleurs, a été établi pour représenter qualitativement et renseigner sur le niveau de colonisation observée (Figure 11).

Observation au microscope à épifluorescence	Description de la colonisation	Barème de couleur
	<p>Niveau 1 : Très peu de biofilm visible, présence de petits clusters individuels répartis aléatoirement sur les fibres du tissu de carbone.</p> <p>Biovolume : 1 - 6 %</p>	
	<p>Niveau 2 : Du biofilm recouvre de façon partielle quelques fibres du tissu de carbone.</p> <p>Biovolume : 6 – 17 %</p>	

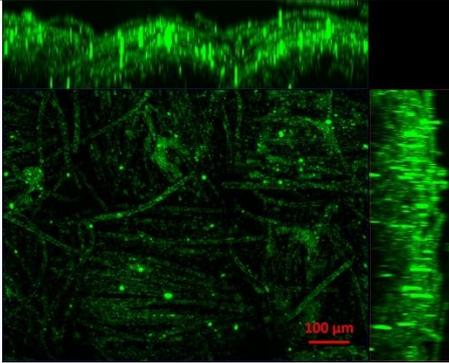
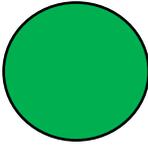
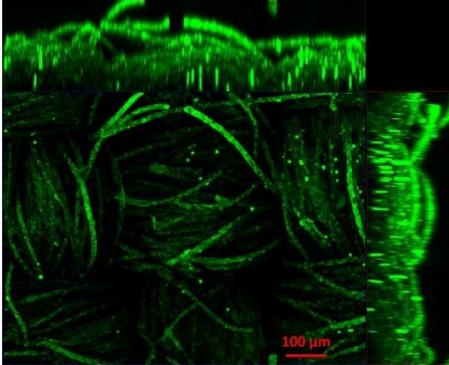
	<p>Niveau 3 :</p> <p>Du biofilm est présent sur l'ensemble des fibres du tissu mais la colonisation des fibres n'est pas encore totale.</p> <p>Biovolume : 17 – 25 %</p>	
	<p>Niveau 4 :</p> <p>Du biofilm enrobe toutes les fibres de façon homogène (bien que le biofilm n'assure pas encore de continuité entre les fibres).</p> <p>Biovolume : > 25%</p>	

Figure 11 : Caractéristiques des quatre niveaux de colonisation microbienne recensés au niveau des pores des électrodes en DMP.

Pour réaliser la cartographie de la colonisation microbienne d'une électrode en DMP, chacun des 90 « spots » est d'abord observé minutieusement au microscope à épifluorescence. Une couleur est attribuée à chaque spot correspondant à son niveau de colonisation (Figure 11) et la distribution de la colonisation est illustrée sous la forme d'un schéma où les 90 pores sont représentés et colorés en fonction de leur densité en biofilm. L'ensemble des cartographies réalisées à partir des électrodes en DMP 5, 10 et 24 mm est présenté sur la Figure 12.

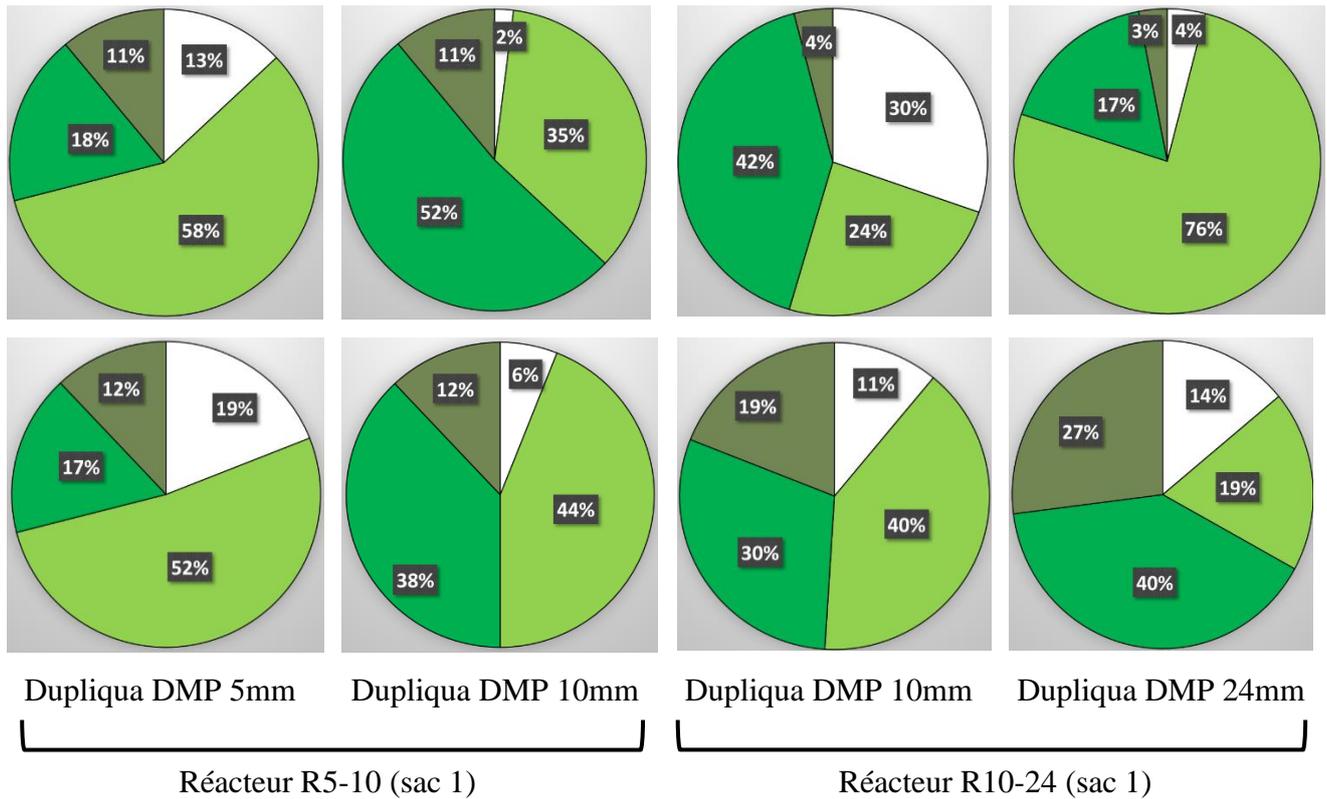


Figure 13 : Niveaux de colonisation des 90 électrodes établis à partir des données des cartographies présentées sur la Figure 12.

La colonisation plus significative des électrodes des DMP de 10 mm par rapport aux DMP de 5 mm corrobore les densités de courant enregistrées en CA : 647 ± 219 C (DMP 10 mm) et 492 ± 162 C (DMP de 5 mm) (Tableau 4, sac 1, runs 1 à 4). Cela tendrait également à renforcer l'hypothèse d'une sélection des bactéries EA par les pores les plus longs (section 2.1.5). Les électrodes au fond des pores de 5 mm resteraient accessibles pour de nombreuses bactéries non-EA qui génèrent la prolifération des bactéries EA. Au contraire, ce seraient surtout les bactéries susceptibles de développer des capacités d'électroactivité qui détecteraient les électrodes au fond des pores longs de 10 mm, voire 24 mm, et se mouvraient vers leur surface où elles se développeraieent sans l'entrave des bactéries non-EA.

3.2 Analyse des populations bactériennes

Les communautés bactériennes du lixiviat de terreau fraîchement préparé (jour 0 – début des expériences) et du lixiviat prélevé dans les réacteurs en fin de CA (jour 15 – fin des expériences) ont été comparées à celles identifiées dans les biofilms des différentes bioanodes (électrodes simples et en DMP) formées par 15 jours de polarisation. Le Tableau 8 reprend la liste et la dénomination donnée aux échantillons (milieux et électrodes) dont les principales espèces bactériennes ont été identifiées.

Tableau 8 : Liste des échantillons (milieux et électrodes) dont la population microbienne a été analysée par pyroséquençage du gène codant pour l'ARNr 16S.

Nature de l'échantillon	Nom des échantillons	
	Jour 0	Jour 15
Milieu (lixiviat de terreau)	MI (pour milieu initial)	MF (pour milieu final)
Electrode simple	X	ES
Electrode DMP 5 mm	X	DMP 5 mm
Electrode DMP 10 mm	X	DMP 10 mm
Electrode DMP 24 mm	X	DMP 24 mm

La première campagne d'analyse des populations bactériennes a été tentée à partir du lixiviat de terreau provenant du sac 1. Toutefois, l'extraction du pool d'ADN de la majorité des électrodes en DMP n'a pas permis d'obtenir la concentration minimale d'ADN ($\geq 20 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) requise pour réaliser l'analyse par pyroséquençage. Seuls les milieux initiaux et finaux, les électrodes simples et deux électrodes en DMP de 10 mm ont fourni assez d'ADN (Tableau 9). Pour les campagnes suivantes, le protocole préalable de décrochage du biofilm de la surface de l'électrode a été optimisé pour récupérer une quantité totale de biomasse bactérienne plus importante.

Tableau 9 : Historique des échantillons originaires du Sac1 (milieux et électrodes) dont les populations bactériennes ont été analysées.

Sac 1 de terreau				Total des échantillons
MI (x1) / âge du terreau après ouverture du sac : 116 jours				
Run 1		Run 2 (dupliqua Run 1)		
Réacteur 5-10	Réacteur 10-24	Réacteur 5-10	Réacteur 10-24	MI (x1)
MF (x1)	MF (x1)	MF (x1)	MF (x1)	MF (x4)
ES (x1)	ES (x1)	ES (x1)	ES (x1)	ES (x4)
	DMP 10 mm (x1)	DMP 10 mm (x1)		DMP 10 mm (x2)

Ce problème explique pourquoi les runs 6 et 7 ont été réalisés à posteriori avec un sac de terreau différent (Sac 2). Avec le protocole optimisé de récupération et d'extraction de l'ADN, nous avons pu récupérer une quantité suffisante d'ADN pour l'ensemble des échantillons excepté pour une électrode en DMP de 10 mm. Le Tableau 10 récapitule l'historique des échantillons originaires du Sac 2 dont les populations bactériennes ont pu être analysées.

Tableau 10 : Historique des échantillons originaires du Sac2 (milieux et électrodes) dont les populations bactériennes ont été analysées.

Sac 2 de terreau				Total des échantillons
MI (x1) / âge du terreau après ouverture du sac : 0 jours				
Run 6		Run 7 (dupliqua Run 6)		
Réacteur 5-10	Réacteur 10-24	Réacteur 5-10	Réacteur 10-24	MI (x1)
MF (x1)	MF (x1)	MF (x1) bis	MF (x1) bis	MF (x4)
ES (x1)	ES (x1)	ES (x1) bis	ES (x1) bis	ES (x4)
DMP 5 mm (x1)	DMP 10 mm (x1)	DMP 5 mm (x1)	DMP 10 mm (x1)	DMP 5 mm (x2)
	DMP 24 mm (x1)	DMP 10 mm (x1)	DMP 24 mm (x1)	DMP 10 mm (x3)
				DMP 24 mm (x2)

Pour hiérarchiser les différences majeures relevées au niveau de la diversité des espèces bactériennes, la comparaison des abondances relatives des communautés bactériennes a été réalisée à différents rangs de la taxonomie des bactéries : le phylum (Figure 14), la classe (Figure 15) et le genre (Figure 16).

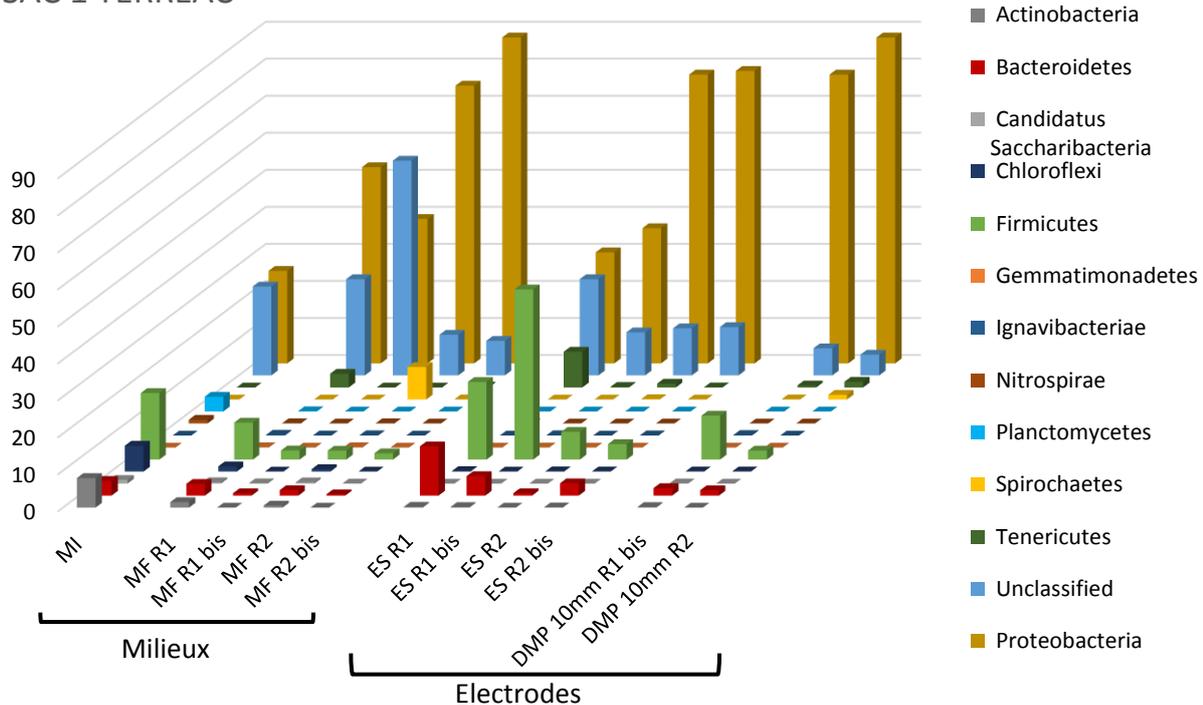
Au rang taxonomique du phylum, les populations bactériennes présentes dans les deux inocula initiaux (lixiviats de terreau du Sac 1 et du Sac 2) montrent de nombreuses similitudes. Les phyla majoritairement représentés sont les *Proteobacteria* et les *Firmicutes* avec des abondances relatives respectivement de 25% et 18% pour le Sac 1 et de 33% et 23% pour le Sac 2. Les phyla plus minoritaires sont les *Actinobacteria*, les *Bacteroides* et les *Chloroflexi* avec respectivement : 8, 4 et 7% pour le Sac 1 et 12, 2 et 5% pour le Sac 2. Notons ici que 24% (Sac 1) et 17% (Sac 2) des populations bactériennes n'ont pu être identifiées, même au stade du phylum.

Les échantillons récupérés en fin de manipulation au jour 15, qu'ils soient originaires des milieux liquides ou des biofilms, affichent tous un fort enrichissement en *Proteobacteria* avec des pourcentages d'abondance relative compris entre 30 à 88% pour les échantillons inoculés avec le Sac 1 et entre 54 à 97% pour ceux inoculés avec le Sac 2. Le phylum des *Proteobacteria* est donc le phylum majeur (Sacs 1 et 2 au jour 15) à l'exception de deux échantillons du sac 1 : un des milieux finaux est dominé par un ensemble de phyla non classifié (58%) et une des électrodes simples est dominée par les *Firmicutes* (46%). Le phylum des *Proteobacteria* est très souvent cité dans la bibliographie comme un phylum dominant parmi les communautés bactériennes constituant les biofilms EA (Lee et al. 2010; Yates et al. 2012). Il n'est pas surprenant non plus que le phylum des *Firmicutes* apparaisse comme le phylum le plus abondant (Wrighton et al. 2008, J. Zhang et al. 2013; Xiao et al. 2015). Il est donc logique de retrouver des *Firmicutes* à la fois dans les milieux et sur les électrodes en fin de CA, avec cependant des pourcentages moyens plus faibles par rapport aux inocula initiaux : 4,0% (Sac 1) et 9,8% (Sac 2) pour les milieux finaux, 8,9% (Sac 1) pour les électrodes simples, 7,1% (Sac 1) et 4,0% (Sac 2) pour les électrodes en DMP 10 mm, 2,0% (Sac 2) pour les DMP 5 mm et 1,7% (Sac 2) pour les DMP 24 mm. Seules les électrodes simples du Sac 1 présentent un pourcentage moyen en *Firmicutes* plus élevé (20%) que celui fourni dans l'inoculum initial (18%).

Parmi les phyla minoritaires observés dans les inocula initiaux, seul le phylum des *Bacteroidetes* est toujours présent à hauteur des mêmes pourcentages d'abondance relative dans les milieux finaux ou bien dans les biofilms : 1,4% (Sac 1) et 0,5% (Sac 2) pour les milieux finaux, 5,5% (Sac 1) et 6,0% (Sac 2) pour les électrodes simples, 3,5% (Sac 1) et 1,3% (Sac 2) pour les électrodes en DMP 10 mm, 0,7% (Sac 2) pour un DMP 5 mm et 1,9% (Sac 2) pour un DMP 24 mm. Ce phylum est largement représenté parmi les bactéries du sol (Janssen 2006). Il se compose de bactéries anaérobies, aérobies, ou aérobies facultatives dont la représentativité dépend fortement de la présence d'oxygène dans le sol. Des membres de ce phylum ont déjà été retrouvés dans des biofilms EA (G. Zhang et al. 2012; J. Zhang et al. 2013).

Le phylum des *Chlorobi* semble se développer uniquement dans les DMP de 24 mm avec des abondances relatives de 4,0 et 6,4% pour les deux DMP de 24 mm. Pourtant, ce phylum n'est présent ni dans les inocula initiaux ni dans aucun autre des échantillons (milieux finaux, électrodes simples, DMP 5 et 10 mm). Ce phylum regroupe en grande partie des bactéries sulfureuses vertes, anaérobies, non mobiles, photosynthétiques (photoautotrophe) et capables d'oxyder des composés soufrés et de fixer le CO₂ et le N₂ (Wahlund et Madigan 1993; Wahlund et Tabita 1997). Quelques études ont observé la présence de ce phylum dans des biofilms EA (J. Zhang et al. 2013; Gao et al. 2014).

SAC 1 TERREAU



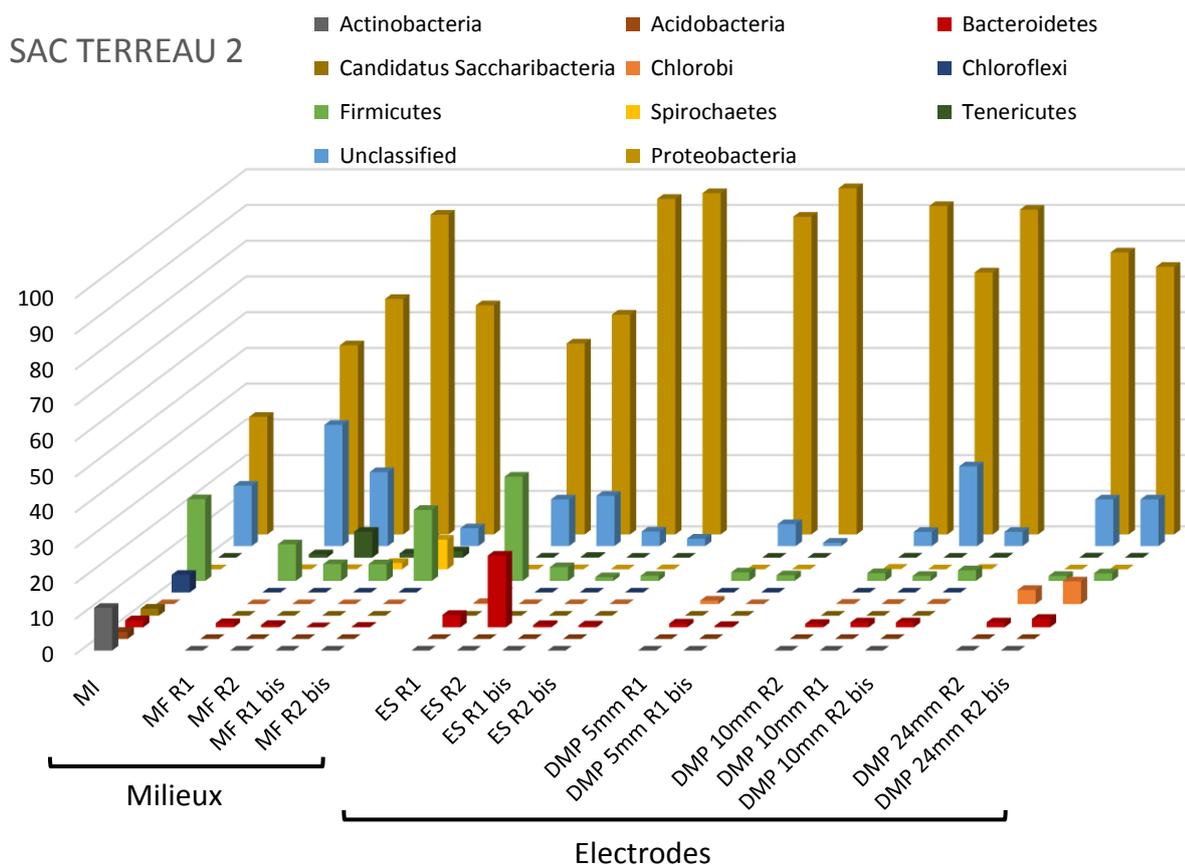


Figure 14 : Abondances relatives au niveau taxonomique du phylum dans l'inoculum initial (MI), le milieu liquide final (MF) et les biofilms prélevés sur les électrodes simples (ES) et les électrodes placées au fond des pores (DMP) de 5, 10 et 24 mm de longueur.

Au niveau taxonomique de la classe (Figure 15), le phylum des *Proteobacteria* regroupe des α -, β -, γ - et δ -*proteobacteria* dont les abondances relatives diffèrent en fonction de la nature (milieu, électrode) et de l'âge (0, 15 jours) des échantillons.

Dans les inocula initiaux, les quatre classes bactériennes α - / β - / γ - / δ -*proteobacteria* représentent respectivement :

- 12% / 3% / 2% / 4% de la population bactérienne du Sac 1
- 21% / 3% / 1% / 3% de la population bactérienne du Sac 2

La classe des *α -proteobacteria* est relativement plus développée parmi les communautés planctoniques des milieux finaux (Sac 1 : 7 à 78% et Sac 2 : 17 à 87%) que dans les biofilms collectés sur les électrodes (Sac 1 : \leq 5% et Sac 2 : \leq 3%). Ce constat laisse présager que cette classe ne renferme pas (ou peu) de bactéries capables d'utiliser l'électrode comme accepteur final d'électrons.

La classe des *β -proteobacteria* est globalement plus abondante dans les échantillons du Sac 1 avec des abondances relatives comprises entre 9 et 44% pour les milieux finaux, 2 et 6% sur les électrodes simples et 5 et 47% pour les biofilms des DMP 10 mm. Les échantillons du Sac 2 comptent vraiment très peu de *β -proteobacteria*, seuls 4.5% (milieux finaux), moins de 1% (électrodes simples), moins de 2% (DMP 5 mm), moins de 3% (DMP 10 mm) et 0% (DMP 24 mm) ont été respectivement recensés. A ce stade, il peut être envisagé que les différences en termes de densité de courant notées entre les électrodes en DMP inoculées avec le Sac 1 et le Sac 2 de terreau, soient liées à la présence de cette classe de bactéries. En effet, des performances anodiques supérieures ont été fournies par les DMP 10 mm inoculé à partir du Sac 1 et la proportion relative en *β -proteobacteria* sur ces électrodes surpasse légèrement celle des biofilms du DMP 10 mm inoculé avec le Sac 2.

La classe des *γ -proteobacteria* ne représente pas plus de 4% (Sac 1) et 3% (Sac 2) de la population totale identifiée parmi les bactéries planctoniques des milieux initiaux. Par contre, elle est retrouvée à des abondances relatives moyennes plus importantes dans les milieux finaux 13% (Sac 1) et 21% (Sac 2). Leur enrichissement au niveau des électrodes n'est pas systématique, il varie en fonction du type d'électrode (simple ou DMP). En effet, cette classe bactérienne est très peu détectée parmi les biofilms des électrodes simples et des DMP de 5 mm (abondance relative inférieure à 1,5%). Au contraire elle devient plus abondante dans les DMP de 10 et 24 mm avec en moyenne :

- 5% (Sac 1) et 12% (Sac 2) pour le DMP 10 mm
- 34% (Sac 2) pour le DMP 24 mm

Il est clair qu'un enrichissement en *γ -proteobacteria* a lieu au fond des pores les plus longs. Parmi cette classe de bactéries, la majorité des espèces est mobile grâce à un flagelle. Cette propriété leur permettrait donc d'accéder au fond des pores par natation.

La classe des *δ -proteobacteria*, qui n'est détectée qu'à moins de 2% dans les inocula initiaux, prolifère de façon très significative uniquement sur les électrodes avec des abondances relatives moyennes de :

- 49% (ES) et 46% (DMP 10 mm) pour le Sac 1
- 75% (ES), 89% (DMP 5 mm), 69% (DMP 10 mm) et 40% (DMP 24 mm) pour le Sac 2

Cet enrichissement très spécifique exclusivement sur les électrodes indique certainement que cette classe bactérienne doit renfermer une ou plusieurs espèces EA. Par ailleurs, les proportions relatives en *δ -proteobacteria* relevées au fond des DMP du Sac 2 diminuent au fur et à mesure que les pores

deviennent de plus en plus longs. Or, nous avons constaté que les charges électriques produites durant les 15 jours de CA (section 2.1.3) mesurées avec les DMP du Sac 2 diminuent également avec l'augmentation de la longueur des pores : 440 C (DMP 5 mm), 312 C (DMP 10 mm) et 168 C (DMP 24 mm). Ceci suggère fortement que cette classe de bactéries est effectivement impliquée dans la production de courant. En outre, on remarque systématiquement un pourcentage plus élevé en *δ-proteobacteria* au niveau des électrodes simples qui, en règle générale, génèrent des densités de courant supérieures à celles des électrodes dans les DMP. Toutefois, nous venons de voir qu'un enrichissement progressif en *γ-proteobacteria* s'effectue lorsque la profondeur des pores augmente. Il est donc légitime de se demander si la diminution en *δ-proteobacteria* constatée ne se ferait pas au détriment du développement des *γ-proteobacteria*. Il existerait alors une compétition entre ces deux classes de bactéries, peut être liée à leur capacité de déplacement dans la solution électrolytique. Pour apporter plus d'éléments de réponse à ces questions, une analyse bibliographique très ciblée sur les propriétés de déplacement des espèces majeures de ces deux classes serait bienvenue.

Parmi le phylum des *Firmicutes*, deux classes bactériennes sont détectées, celle des *Clostridia* et celle des *Bacilli*.

Dans les inocula initiaux elles représentent respectivement :

- 2% et 12% de la population totale identifiée avec le Sac 1
- 4% et 15% de la population totale identifiée avec le Sac 2

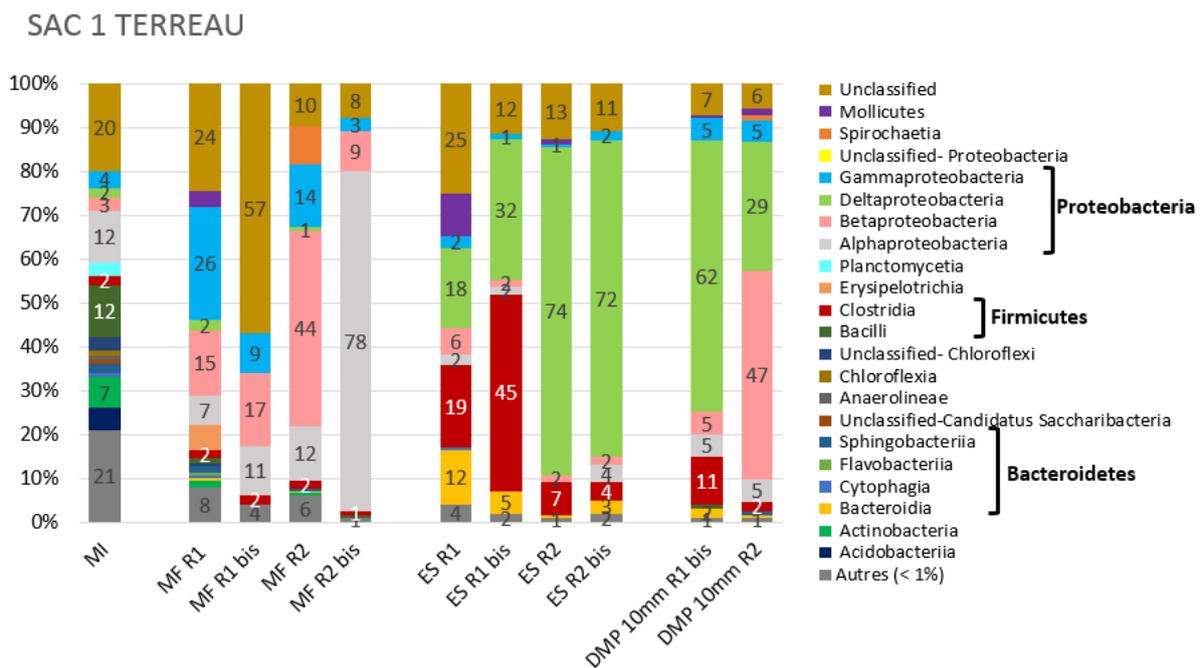
La prolifération des *Clostridia* dans les milieux finaux et sur les électrodes est différente en fonction du sac de terreau utilisé. Pour les échantillons inoculés avec un lixiviat de terreau provenant du Sac 1, les *Clostridia* sont davantage présents sur les électrodes à des pourcentages moyens de 19% (ES) et 7% (DMP 10 mm). Ils sont très faiblement représentés dans les milieux finaux (< 2%). Avec les échantillons inoculés à partir du Sac 2, des proportions moyennes similaires sont détectées dans les milieux finaux (8%) et sur les bioanodes simples (7.5%). Les *Clostridia* ne sont presque pas présents (< 2%) sur toutes les électrodes en DMP. Au vu de ces observations il est encore difficile de conclure quant à l'implication de cette classe bactérienne dans la génération de courant.

Les *Bacilli*, bien qu'occupant environ 10% de la population totale identifiée dans les inocula initiaux, ne sont ensuite retrouvés dans aucun des échantillons de solution récupérés en fin d'expérience (t0+15jours). Cette classe bactérienne n'est donc assurément pas impliquée dans l'électroactivité des biofilms.

Parmi les *Bacteroidetes*, plusieurs classes de bactéries sont détectées mais seule celle des *Bacteroidia* apparaît sur un nombre important d'échantillons. Cette classe microbienne qui n'a pourtant pas été détectée dans les milieux initiaux se retrouve en majorité sur les électrodes simples avec des proportions comprises entre :

- 3-12% (ES) pour le Sac 1
- 4-20 % (ES) pour le Sac 2

Cette classe bactérienne a déjà été observée dans des biofilms anodiques de piles à combustible microbiennes utilisées pour le traitement des eaux usées (Wang et al. 2013) ou alimentées avec des substrats complexes telles que des boues de station d'épuration (Jung et Regan 2007) ou des bio-déchets (Jia et al. 2013). En effet, les *Bacteroidia* sont majoritairement composés de bactéries fermentaires capables d'hydrolyser des composés organiques complexes (Rismani-Yazdi et al. 2013). Cette classe bactérienne pourrait participer dans les biofilms anodiques multi-espèces à l'hydrolyse de molécules organiques complexes contenues dans le lixiviat de terreau.



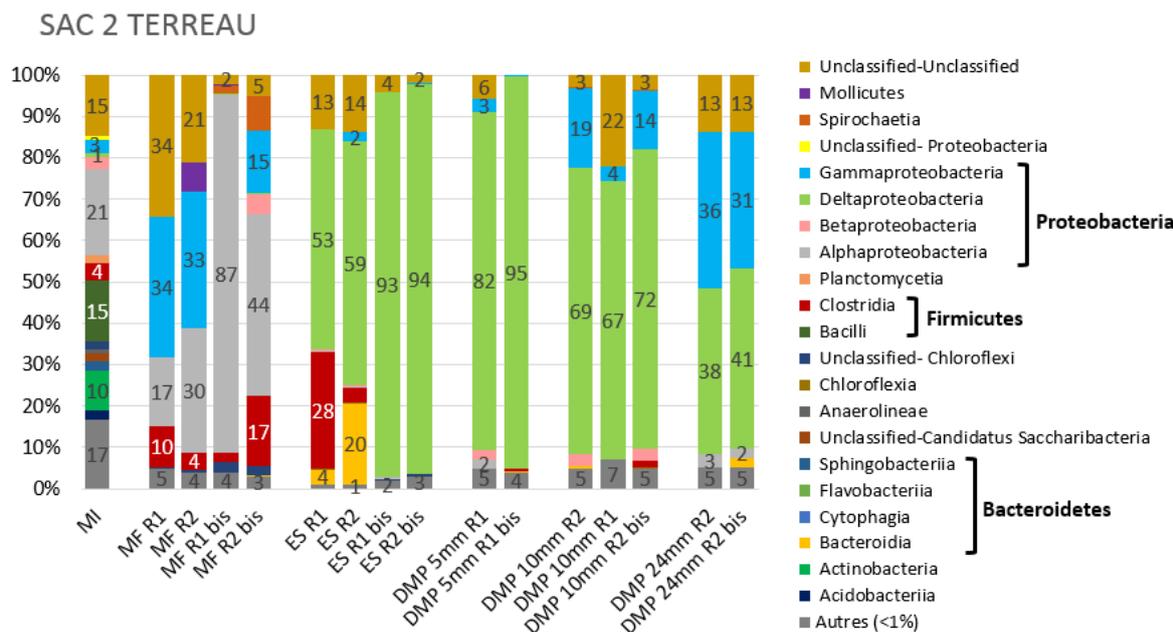


Figure 15 : Abondances relatives au niveau taxonomique de la classe dans l'inoculum initial (MI), le milieu liquide final (MF) et les biofilms prélevés sur les électrodes simples (ES) et les électrodes placées au fond des pores (DMP) de 5, 10 et 24 mm de longueur.

Au rang taxonomique du genre (Figure 16), une différence nette apparaît entre les populations bactériennes des inocula initiaux et des bioanodes. Le lixiviat de terreau utilisé comme inoculum initial présente une large diversité de genres bactériens. Au moins 44% des communautés bactériennes qui les composent sont détectées à une proportion inférieure à 2% alors que sur les électrodes ce chiffre diminue à 12%. Ceci montre l'existence d'une forte sélection au niveau des électrodes. En outre, sur l'ensemble des échantillons une part non négligeable (~20%) de la flore bactérienne totale n'a pu être classifiée au rang taxonomique du genre.

Dans les lixiviats de terreau initiaux, les genres présents à une abondance relative supérieure à 2% sont :

- *Acidobacterium* (5%), *Bacillus* (3%) et *Planifilum* (5%) pour le Sac 1 (âge du terreau : 116 jours)
- *Thermobifida* (5%), *Bacillus* (3%), *Thermobacillus* (2%), *Planifillum* (7%), *Clostridium* (3%), *Rhodobium* (5%) pour le Sac 2 (âge du terreau : 0 jours)

Le microbiome du lixiviat de terreau servant d'inoculum présente une diversité moindre lorsque le terreau vieillit : on détecte en effet deux fois moins de genres bactériens dans le terreau de 116 jours

comparé au terreau frais (0 jour = ouverture du sac). Ceci conforte notre hypothèse selon laquelle certaines espèces microbiennes sont inhibées ou disparaissent lorsque le terreau devient vieux en raison d'une exposition prolongée à l'oxygène de l'air, ou bien à une déshydratation du terreau.

Concernant les échantillons prélevés en fin d'expérience, des différences significatives au niveau de la diversité des genres bactériens apparaissent en fonction de l'utilisation du sac 1 ou du sac 2 comme inoculum de départ. Pour illustrer ces différences, le Tableau 11 dresse la liste des genres bactériens détectés à une proportion relative moyenne supérieure à 10% pour chaque type d'échantillon (milieu final, électrode simple, DMP).

Tableau 11 : Liste des genres bactériens présents à une abondance relative moyenne supérieure à 10% dans les milieux et sur les électrodes prélevés en fin de manipulation en fonction du sac de terreau utilisé (Sac 1 vs. Sac 2).

	Sac 1 (âge du terreau : 116 jours)	Sac 2 (âge du terreau : 0 jours)
MF	<i>Azospirillum</i> : 22% <i>Hydrogenophaga</i> : 18% <i>Pseudomonas</i> : 12%	<i>Magnetospirillum</i> : 43% <i>Pseudomonas</i> : 21%
ES	<i>Unclassified-δproteobacteria</i> : 25% <i>Clostridia</i> : 18% <i>Pelobacter</i> : 15%	<i>Geobacter</i> : 67%
DMP	<u>10mm</u> <i>Unclassified-δproteobacteria</i> : 36% <i>Hydrogenophaga</i> : 26%	<u>5mm</u> <i>Geobacter</i> : 81% <i>Unclassified-δproteobacteria</i> : 11% <u>10mm</u> <i>Geobacter</i> : 56% <i>Unclassified-δproteobacteria</i> : 17% <i>Pseudomonas</i> : 12% <u>24mm</u> <i>Unclassified-δproteobacteria</i> : 39% <i>Pseudomonas</i> : 35%

D'après le Tableau 11, le genre bactérien dominant dans les milieux finaux est *Azospirillum* (22%) pour le Sac 1 et *Magnetospirillum* (43%) pour le Sac 2. Sur les électrodes (simples et en DMP), deux genres bactériens prédominent. Un genre non classifié intitulé *Unclassified_δ-proteobacteria* est majoritaire sur les électrodes du sac 1 et également sur les électrodes en DMP de 24 mm du sac 2. Le genre *Geobacter* domine exclusivement les électrodes simples, les DMP de 5 mm et les DMP de 10 mm du sac 2. Il est difficile d'expliquer ces différences qui peuvent être dues soit à la différence des terreaux contenus dans les deux sacs, soit à l'âge des terreaux différents, ou à un effet combiné des deux.

Pour la suite de l'analyse, nous avons choisi de focaliser uniquement les échantillons issus de l'inoculation avec le sac 2 de terreau car nous avons réussi à obtenir une série complète d'échantillons (milieu, électrodes simples, DMP 5 mm, DMP 10 mm et DMP 24 mm) avec ce sac de terreau.

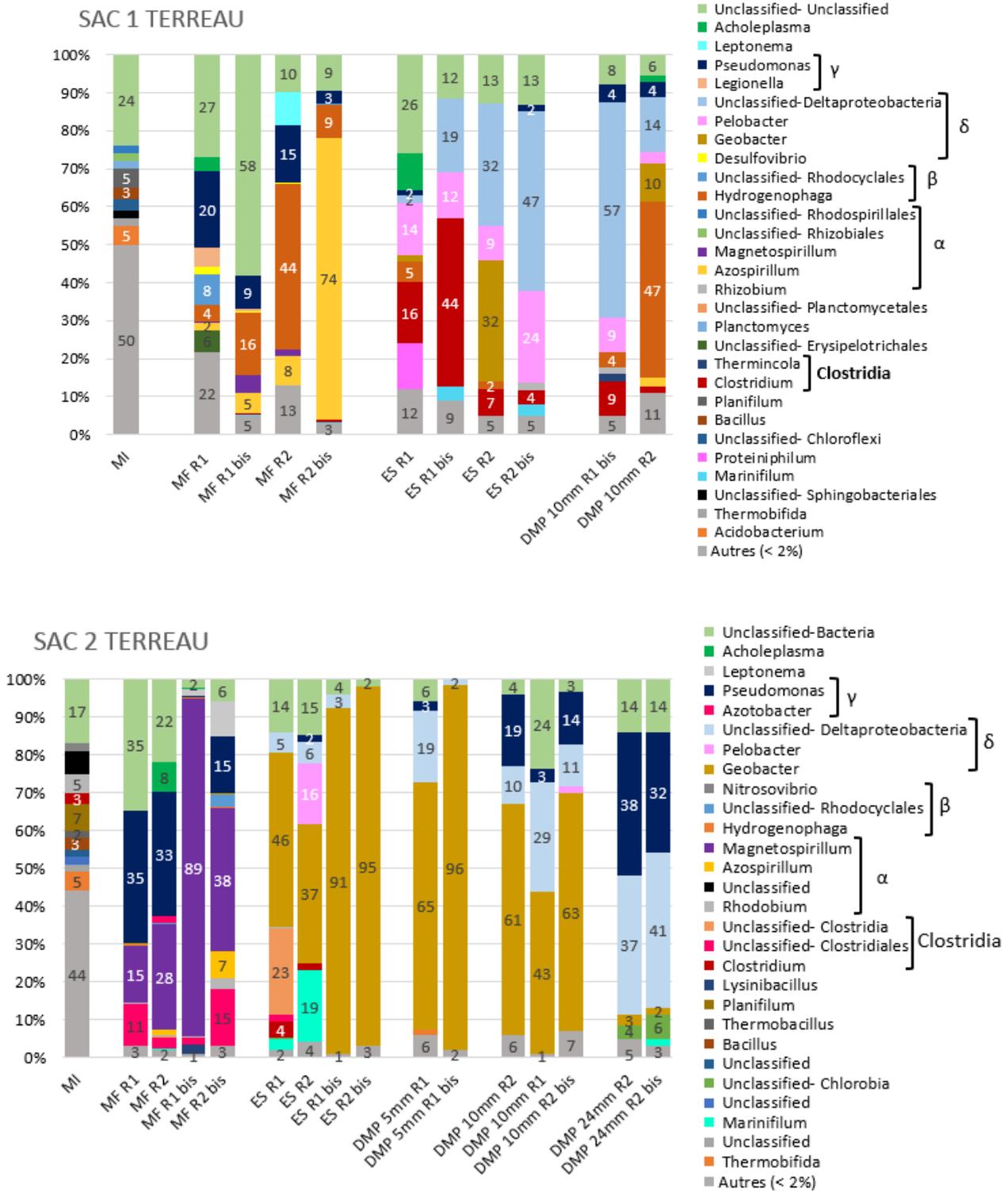
La composition des genres bactériens mis en évidence sur les électrodes est différente de celle des milieux (initiaux et finaux). Sur les électrodes simples, seul le genre *Geobacter* (67%) est détecté à une proportion moyenne supérieure à 10%. Sur les électrodes DMP, trois genres bactériens se distinguent :

- *Geobacter* (anaérobie) domine les électrodes des DMP de 5 mm (81%) et des DMP de 10 mm (56%). Par contre, il devient moins présent sur les électrodes des DMP de 24 mm (2,5%). On assiste alors à une décroissance de l'abondance relative en *Geobacter* au fur et à mesure que les pores deviennent longs. L'identification jusqu'à l'espèce de ce genre a révélée qu'il s'agit exclusivement de l'espèce *Geobacter sulfurreducens*.
- Le deuxième genre dominant sur les électrodes des DMP 5 mm (11%) et 10 mm (17%) et sur pour les DMP 24 mm (39%) est un genre non répertorié de *δ-proteobacteria*. Un enrichissement spécifique de ce genre bactérien apparaît lorsque les pores sont longs. En rentrant la séquence nucléotidique assimilée à ce genre bactérien dans la base de données de BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), l'espèce présentant le plus de similarité (97%) est *Desulfuromonas sp.* La prolifération importante des *Desulfuromonas* sur les électrodes des DMP de 24 mm s'accompagne d'un développement d'un *Unclassified_Chlorobia* du phylum *Chlorobi* qui regroupe des bactéries sulfureuses vertes. Il a déjà été observé que l'espèce *Desulfuromonas acetoxidans* croît en syntrophie avec des bactéries sulfureuses vertes dans certains environnements (Biebl et Pfennig 1978; Lovley 2002).

- *Pseudomonas* qui n'est présent qu'à 1,5% en moyenne sur les électrodes des DMP de 5 mm, augmente progressivement quand la longueur des pores s'allongent : 12% (DMP 10 mm) et 35% (DMP 24 mm). Une identification plus précise jusqu'au rang de l'espèce n'a pas aboutie.

L'analyse des populations microbiennes confirme donc l'hypothèse d'une sélection des bactéries en fonction de la longueur des pores. Il est également important de noter que ces trois genres bactériens (*Geobacter*, *Desulfuromonas* et *Pseudomonas*) renferment des espèces de bactéries mobiles dotées d'un flagelle qui leur permettrait de nager jusqu'au fond des pores.

Les genres *Geobacter* et *Desulfuromonas* appartiennent au même ordre *Desulfuromonadales*. Les espèces *Desulfuromonas* sont des bactéries marines anaérobies qui réduisent le soufre (Pfennig et Biebl 1976) et les oxydes de Fer (III) (Roden et Lovley 1993) couplé à l'oxydation de l'acétate. Le genre *Desulfuromonas* est fréquemment trouvé dans des biofilms formés dans des milieux salins tels que les sédiments marins. Les espèces bactériennes du genre *Desulfuromonas* sont des bactéries halophiles, c'est-à-dire qu'elles s'accommodent ou ont besoin d'une teneur élevée en sel dans leur milieu pour vivre (Bond et al. 2002; Holmes et al. 2004; Reimers et al. 2007; Pierra et al. 2015; Tender et al. 2002). *Geobacter* est un genre bactérien qui possède de nombreuses souches EA telles que *G. sulfurreducens*, *G. metallireducens*, *G. lovleyi*... (Koch et Harnisch 2016), présentes aussi bien au sein de biofilms formés dans des milieux salins que des milieux peu salins (Bond et Lovley 2003). Le lixiviat de terreau est lui-même un milieu peu salin, il n'est donc pas illogique de voir que *Geobacter* domine presque toutes les électrodes. Par contre, il est plus intrigant d'observer que le genre *Desulfuromonas*, plus commun dans les milieux salins, se soit également développé sur les électrodes, et que son abondance relative soit même supérieure à celle de *Geobacter* sur certains échantillons (DMP 24 mm). D'autres études ont également rapporté des traces de *Desulfuromonas* dans des biofilms EA formés dans des milieux peu salins comme par exemple des effluents de papeteries (Ketep et al. 2013) ou du lisier de porc (Martin 2011). Plus précisément, les espèces *Desulfuromonas acetoxidans* et *Desulfuromonas soudanensis* sont deux espèces capables de produire du courant électrique en catalysant la réaction d'électro-oxydation bactérienne de l'acétate (Bond et al. 2002; Badalamenti et al. 2016). De même, de nombreuses espèces de *Pseudomonas* ont démontré des propriétés d'électroactivité (Koch et Harnisch 2016). On peut donc raisonnablement penser que ces trois genres bactériens sont responsables en majorité de l'électroactivité des biofilms développés ici.



3.3 Comparaison des populations bactériennes obtenues dans les dispositifs « canal » et les dispositifs multi-pores (DMP)

La comparaison au niveau taxonomique du genre bactérien des populations microbiennes récoltées sur les électrodes placées dans les dispositifs « canal » avec celles des électrodes mises dans les dispositifs multi-pores fait ressortir que les genres *Geobacter* et/ou *Pseudomonas* sont majoritairement détectés à la fois sur les échantillons « canal » de 1 et 5 mm (4 et 30 jours) et les échantillons « DMP » de 5, 10 et 24 mm (15 jours). Une certaine cohérence entre les populations des deux dispositifs (« canal » et « DMM ») est alors observée.

4. CONCLUSIONS DU CHAPITRE 4

Les travaux présentés dans ce chapitre ont été conduits avec un dispositif expérimental permettant de créer des pores d'une taille d'ouverture fixe et de longueur variable. Pour rester cohérent avec l'analyse bibliographique et l'étude du chapitre 3, une taille d'ouverture de pore millimétrique (2 mm) a été choisie. Trois longueurs de pore ont été étudiées : 5, 10 et 24 mm. Les expériences ont été réalisées en utilisant comme inoculum du lixiviat de terreau.

Nous avons tout d'abord constaté que les pores d'un diamètre de 2 mm et de longueur allant de 5 à 24 mm ne gênent pas l'établissement d'un biofilm EA. Dans 25 % des cas les électrodes situées au fond des pores entament la production de courant au même moment que les électrodes de contrôle laissées libres, sans pores. Dans 75 % des cas, le courant démarre même plus tôt, jusqu'à un jour avant, sur les électrodes dans les DMP (section 2.1.2). L'hypothèse émise est que la surface des électrodes libres est soumise à une très grande quantité de bactéries, à la fois EA et non-EA, qui colonisent rapidement la totalité de la surface. Au contraire, les électrodes situées au fond des pores ne sont accessibles dans les premiers temps qu'à la petite quantité des bactéries présentes dans les pores, si bien que les bactéries EA trouvent des sites libres pour se développer en la surface. La mise en place du biofilm se ferait alors de manière plus lente, laissant aux bactéries EA le temps de déployer leur métabolisme de transfert d'électrons extracellulaire et d'en profiter pour coloniser préférentiellement la surface. Cette hypothèse est confortée par le fait que la longueur de pore, comprise entre 5 et 24 mm, n'impacte pas le démarrage initial du courant.

Après le démarrage de la production de courant, celui-ci augmente jusqu'à atteindre une densité maximale J_{\max} . Au cours de cette phase de montée, les valeurs de J_{\max} et de la pente de la courbe de CA sont les plus élevées pour les DMP de 10 mm, tandis que celles des DMP de 5 mm sont similaires à celles des DMP de 24 mm.

Les quantités d'électricité échangées durant les 15 jours de chronoampérométrie donnent une idée des performances globales des électrodes (section 2.1.3 et Tableau 4). Cette approche confirme que la longueur de pores de 10 mm permet d'atteindre des performances plus élevées et que les plus faibles sont délivrées par les pores de 24 mm.

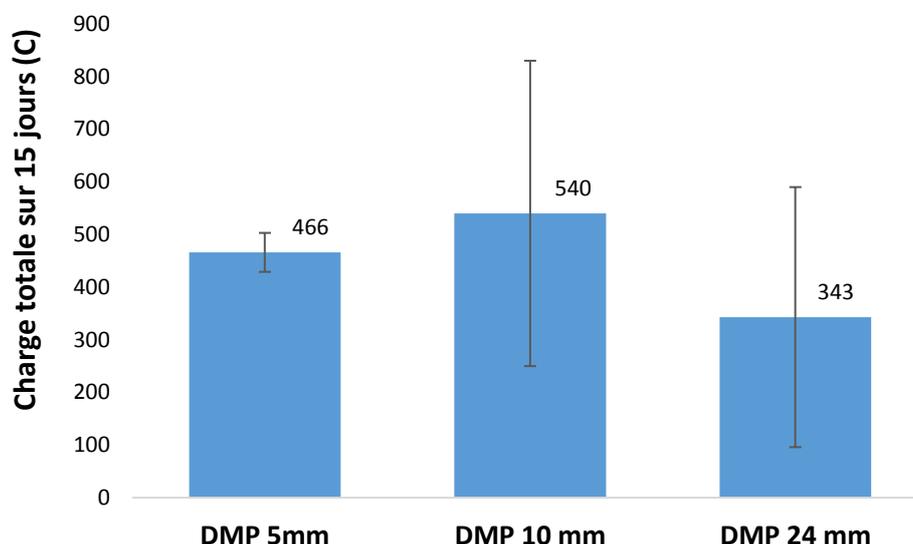


Figure 17 : Impact de la longueur de pore sur la charge électrique (quantité d'électricité) produite durant les 15 jours de CA à -0.20 V/ECS. Les valeurs sont calculées sur une base de 6 valeurs pour les DMP de 5 et 24 mm et de 12 valeurs pour les DMP de 10 mm.

L'hypothèse a alors été émise que ce comportement serait le résultat de deux effets antagonistes : la limitation par les transports de matière qui croît fortement des pores de 5 à 24 mm (section 2.1.4) et une sélection des bactéries électroactives les plus efficaces par les pores les plus longs (section 2.1.5). Si la première proposition est sûre, la seconde n'était qu'une spéculation à ce stade des travaux. Nous supposons que les bactéries EA ayant un intérêt (vital) à trouver une surface conductrice sont munis d'un système de détection de ses surfaces et capables de se mouvoir vers elles. L'allongement des pores induirait donc la sélection de bactéries EA ayant un tel système de détection/transport de plus en plus efficace. Plus le pore est long, plus l'électrode est hors d'atteinte

pour les bactéries non-EA d'une part et plus elle devient difficile à détecter par les bactéries EA d'autre part.

Cette hypothèse permettrait d'expliquer pourquoi le DMP de 10 mm est plus efficace que le DMP de 5 mm : une longueur de pore de 5 mm ne doit pas être suffisante pour mettre l'électrode hors de portée des bactéries non-EA qui gênent l'établissement du biofilm EA. Grâce à une compétition moindre au fond des pores de 10 mm, le biofilm EA à tout loisir de se développer ce qui explique les taux de colonisation plus élevés (section 3.1).

La faible efficacité des pores de 24 mm pourrait être due à un accès vraiment trop difficile même pour les bactéries EA les mieux équipées. Toutefois, il est très probable que les transports de matière deviennent alors bien trop limitant (section 2.1.4) et gênent l'alimentation en substrat et/ou le maintien d'un pH proche de la neutralité. En conclusion, une longueur de pore de 10 mm semble être le meilleur compromis qui permet une sélection des bactéries EA sans que les transports de matière ne deviennent trop limitant.

L'analyse des populations microbienne a montré que :

- De façon générale toutes les électrodes sélectionnent la classe des *δ-proteobacteria*
- Les électrodes de contrôle non masquées par un DMP sélectionnent majoritairement le genre *Geobacter*.
- La majorité des populations présentes sur les électrodes au fond des pores, quelle que soit leur longueur de 5 à 24 mm, est électroactive (*Geobacter sulfurreducens*), ou pressentie comme électroactive (*Pseudomonas sp.* et *Desulfuromonas sp.*) car l'identification jusqu'à l'espèce n'a pas aboutie.
- Une sélection des bactéries EA a effectivement lieu en fonction de la longueur du pore entre les trois genres bactériens *Geobacter* / *Pseudomonas* / *Desulfuromonas*. Ces genres représentent en moyenne :
 - 67 ± 30 / 1 ± 1 / 4 ± 2 % des populations des électrodes simples
 - 81 ± 22 / 2 ± 1.4 / 11 ± 12 % des populations des électrodes des DMP de 5 mm
 - 56 ± 29 / 12 ± 8 / 17 ± 11 % des populations des électrodes des DMP de 10 mm
 - 2.5 ± 0.7 / 35 ± 4 / 39 ± 3 % des populations des électrodes des DMP de 24 mm.

De façon générale on peut noter une certaine progression de la composition des biofilms depuis les électrodes de contrôle vers celles situées au fond des pores les plus longs avec l'apparition et l'importance croissante des genres *Pseudomonas* et *Desulfuromonas*. Cette progression ne corrobore pas l'analyse des voltammétries cycliques (section 2.2) qui indiquent une différence nette entre les électrodes de contrôle d'une part (présence de 3 systèmes redox) et les électrodes masquées par un DMP d'autre part (1 seul système redox).

Les biofilms dans les DMP de 5 mm sont donc largement dominés par *Geobacter* (81 %) tandis que les DMP de 24 mm le sont par *Pseudomonas* et *Desulfuromonas* alors que *Geobacter* n'est plus présent qu'à 2.5 %. Cette analyse confirme donc l'hypothèse que nous avons émise à l'analyse des chronoampérogrammes : l'occurrence d'une sélection des genres bactériens en fonction de la longueur des pores.

Le dispositif multi-pore développé dans ce chapitre se révèle être un outil de recherche très fructueux. Il a permis de souligner l'importance des compétitions pour la colonisation de la surface dans l'établissement des biofilms EA et a mis en évidence une sélection des populations bactériennes qui dépend de l'accessibilité des électrodes.

Il a en outre fait naître un grand nombre de questionnements sur les mécanismes des biofilms EA. Faudrait-il attribuer les performances plus importantes obtenues avec les DMP de 10 mm que les DMP de 5 mm:

- au ratio équilibré des 3 genres microbiens *Geobacter*, *Pseudomonas* et *Desulfuromonas* ?
- Ou au pourcentage de *Geobacter* encore conséquent (56 %) associé à une colonisation plus importante dans les pores de 10 mm ?
- Ou à *Pseudomonas* et *Desulfuromonas* qui seraient plus efficace que *Geobacter* ?

Le développement de *Pseudomonas* et *Desulfuromonas*, qui semble respecter un ratio constant (12-17% pour les DMP 10 mm et 35-39% pour les DMP 24 mm), correspondrait-il à une coopération, une syntrophie ? La sélection de *Pseudomonas* et *Desulfuromonas* qui croît avec la longueur des pores est-elle due à la capacité de ces cellules à détecter l'électrode, comme nous l'avons suggéré, ou au contraire à une résistance supérieure aux conditions spécifiques qui doivent régner au fond des pores les plus longs, en termes de pH par exemple ? Pourquoi les systèmes redox déployées par les biofilms sont-ils drastiquement impactés par la présence d'un DMP mais pas ensuite par la longueur

des pores du DMP ? Ces questions posées par la mise en œuvre des dispositifs multi-pores sont autant de passionnants sujets de recherche qu'il faudra aborder pour progresser vers la maîtrise de biofilms EA optimaux.

Chapitre 5 : Comportement des bactéries électroactives dans un champ électrique

1	OBJECTIF ET STRATEGIE DE L'ETUDE	245
1.1	Contexte général et objectif.....	245
1.2	Stratégie d'étude et conception d'un réacteur « triple compartiments ».....	246
1.3	Première réflexion sur les conditions opératoires	247
2	TESTS PRELIMINAIRES	248
2.1	En condition abiotique	248
2.2	En condition biotique	252
2.2.1	Première série d'expériences	253
2.2.2	Deuxième série d'expériences	255
2.2.3	Troisième série d'expériences.....	259
3	RESULTATS OBTENUS AVEC LE SAC DE TERREAU SAC 3	261
3.1	Article « Is microbial electrotaxis an osmotaxis? »	261
3.2	Résultats complémentaires non présentés dans l'article	292
4	RESULTATS OBTENUS AVEC LE SAC DE TERREAU SAC 4	293
4.1	Chronoampérométrie.....	294
4.2	Analyse des populations microbiennes	296
4.3	Comparaison avec les résultats obtenus avec le sac de terreau SAC 3	300
5	CONCLUSIONS DU CHAPITRE 5	302

1 OBJECTIF ET STRATEGIE DE L'ETUDE

1.1 Contexte général et objectif

Certains des résultats décrits dans les précédents chapitres ont orienté notre questionnement scientifique sur les premiers instants de formation des biofilms EA, et plus particulièrement vers la compréhension des mécanismes impliqués dans les mécanismes d'approche des bactéries EA vers l'électrode.

En effet, il a été mis en évidence au chapitre 3 que la phase de croissance du courant électrique, c'est-à-dire la période de temps entre le démarrage de la production du courant et le pic de courant, dure toujours environ 2 jours. Cette observation a été faite à la fois sur les électrodes placées dans les dispositifs « canal » de 1 mm et 5 mm de hauteur, et sur les électrodes laissées libres (section 3.1). En 48 heures le biofilm EA se met en place et atteint le maximum de production de courant. Cette phase de formation revêt donc une importance cruciale, alors qu'elle ne fait l'objet que de très peu d'études dans la bibliographie, souvent réalisées avec des souches pures.

Au chapitre 4, la présence croissante de bactéries des genres *Pseudomonas* et *Desulfohalobium* est notée au fur et à mesure que la longueur des pores s'allonge (section 3.2). Une hypothèse possible serait que ces bactéries soient capables de détecter l'électrode et d'orienter leur déplacement vers sa surface. La recherche bibliographique sur les mécanismes éventuellement impliqués dans la phase d'approche de bactéries vers une électrode (chapitre 1, section 5.2) évoque la possibilité que des bactéries seraient capables de « détecter » un champ électrique (Oram and Jeuken, 2017). Ce phénomène est appelé électrotactisme ou galvanotactisme. Il est bien connu et largement décrit pour les cellules eucaryotes tandis qu'un nombre très limité d'articles s'est intéressé à ce phénomène chez les cellules procaryotes.

L'objectif de ce chapitre est de déceler l'impact éventuel d'un champ électrique sur des bactéries électroactives. Les informations récoltées permettraient d'apporter un éclairage nouveau sur les toutes premières étapes de formation d'un biofilm électroactif.

1.2 Stratégie d'étude et conception d'un réacteur « triple compartiments »

L'ambition ici est de soumettre un consortium bactérien à un champ électrique et d'évaluer si les bactéries vont se déplacer en direction de l'une des deux électrodes utilisées pour créer le champ électrique. Pour cette nouvelle étude, un dispositif expérimental spécial a été élaboré. Il se présente sous la forme d'un réacteur « triple compartiments » dont la description a été détaillée au chapitre 2. Comme l'indique son nom, ce réacteur se compose de trois compartiments hydrauliquement connectés entre eux. L'inoculum est placé dans le compartiment central (C2). Les deux compartiments externes (C1 et C3) ne servent qu'à appliquer un champ électrique aux bactéries présentes dans C2. Une anode est introduite dans C1 (le compartiment anodique), une cathode dans C3 (le compartiment cathodique) et une différence de potentiel (V) est appliquée entre l'anode et la cathode éloignées d'une distance fixe.

Les bactéries sont maintenues au sein du compartiment central par un séparateur avec un seuil de rétention de 0,2 μm positionné sur chacune des connexions avec les compartiments externes. La taille d'une bactérie étant de l'ordre de 1 μm , ou plus, le seuil de rétention du séparateur a été choisi pour éviter que les bactéries n'atteignent les compartiments C1 et C3. Une électrode en tissu de carbone exposée au milieu de C2 est plaquée sur la surface du séparateur. De cette façon les bactéries qui migrent vers l'anode ou la cathode sont piégées à la surface du séparateur, au contact de l'électrode en tissu de carbone. Le tissu de carbone positionné du côté de l'anode est appelé CCA (pour « carbon cloth » anode) et celui du côté de la cathode CCC (pour « carbon cloth » cathode). Pendant l'application du champ électrique, CCA et CCC sont laissées en circuit ouvert (à l'abandon).

Lors de l'application du champ électrique, si les bactéries EA migrent effectivement par électrotaxie, elles devraient se diriger préférentiellement soit vers le compartiment anodique, soit vers le compartiment cathodique. En ne mettant l'inoculum que dans le compartiment C2, nous avons créé une dissymétrie entre les deux électrodes. L'électrode placée proche de l'anode recevra préférentiellement les microorganismes dont le déplacement est orienté vers l'anode et réciproquement. En effet, une solution plus simple aurait consisté à utiliser la même solution dans les trois compartiments mais les deux électrodes auraient alors bénéficié de l'apport de tous les microorganismes se déplaçant sous l'effet du champ, quelle que soit leur direction.

Après l'application du champ électrique, la solution contenant l'inoculum est évacuée du compartiment central C2 afin que seules les bactéries adhérentes sur les électrodes CCA et CCC ou sur les séparateurs, soient présentes pour la suite de l'expérimentation. Le contenu du compartiment C2 est alors remplacé par du milieu synthétique frais non inoculé et les deux électrodes en tissu de carbone sont ensuite simultanément polarisées à -0.2 V/ECS à l'aide d'un N-stat. Le courant produit lors de cette polarisation renseigne sur la formation d'un biofilm EA sur CCA et CCC.

1.3 Première réflexion sur les conditions opératoires

Une première réflexion a été initiée sur les conditions opératoires à adopter pour la mise en œuvre du réacteur « triple compartiments ».

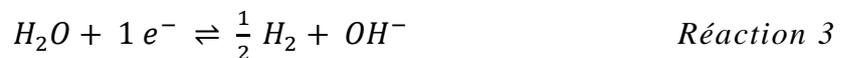
Nécessité d'un bullage d'azote dans les compartiments externes

Seul le compartiment central contient des bactéries, les deux compartiments externes C1 et C3 sont remplis avec une simple solution conductrice. Nous avons opté pour le milieu synthétique décrit au chapitre 2. Dans ces conditions, lors de l'application du champ électrique entre l'anode (DSA) et la cathode (acier inoxydable 316L) les réactions électrochimiques mises en jeu sont :

- Dans le compartiment C1, l'oxydation de l'eau et des ions chlorures à la surface de la DSA :



- Dans le compartiment C3, la réduction de l'eau à la surface de l'acier inoxydable 316L :



Du dioxygène, du dichlore et du dihydrogène sont produits dans les compartiments externes lors de l'application du champ électrique, or ces gaz pourraient contaminer le compartiment central contenant les bactéries par diffusion au-travers du séparateur 0.2 μ m. Pour chasser les produits des réactions aux électrodes, un bullage à l'azote est utilisé en continu dans les deux compartiments externes lorsque le champ électrique est appliqué.

Choix de l'inoculum

Le choix de l'inoculum s'est d'abord porté sur une bioanode primaire formée à partir du lixiviat de terreau selon la procédure décrite au chapitre 2. Ce choix se justifie par le fait que lors de la formation de la bioanode primaire, une première sélection de bactéries électroactives est réalisée. De ce fait, utiliser une bioanode primaire en tant qu'inoculum permettrait de partir d'un pool bactérien déjà enrichi en bactéries électroactives. Pour l'ensemble des expériences la température est maintenue à 40°C.

2 TESTS PRELIMINAIRES

De nombreux tests préliminaires en conditions abiotiques et biotiques ont été nécessaires afin de caler les conditions opératoires en termes de (i) différence de potentiel (DDP) à appliquer entre anode et cathode, (ii) durée d'application de la DDP, (iii) composition des électrolytes des compartiments C1 et C3, (iv) maintien des conditions anaérobies dans les trois compartiments. Ces tests ont surtout permis de mettre en lumière de nombreuses difficultés expérimentales que nous n'avions pas anticipées. En résolvant pas à pas ces problèmes, nous sommes parvenus à mettre au point un protocole expérimental robuste et optimisé.

2.1 En condition abiotique

Les premiers tests en abiotique ont permis de déterminer judicieusement la valeur de la différence de potentiel à appliquer entre l'anode et la cathode pour le champ électrique. Elles ont également montré la nécessité de standardiser l'état des interfaces entre les électrodes en tissu de carbone et l'électrolyte du compartiment C2 avant l'application du champ électrique.

Choix de la différence de potentiel à appliquer

Pour déterminer la différence de potentiel à appliquer entre l'anode (DSA) et la cathode (acier inoxydable 316L), une caractérisation électrochimique du système expérimental a été réalisée. Les expériences ont été menées à 40°C en remplissant chaque compartiment (C1, C2 et C3) avec du milieu minimum qui correspond au milieu synthétique sans vitamines, ni nutriments, ni acétate, qui ne sont utilisés qu'en présence de bactéries. Un bullage d'azote est maintenu tout le long de l'expérience dans

les compartiments C1 et C3. Des DDP croissantes entre la DSA et l'acier inoxydable 316L allant de 0 à 10 V ont été appliquées (Figure 1).

Pour chaque valeur de DDP, la différence de potentiel entre les deux tissus de carbone CCA et CCC (ΔE_{total}) a été déterminée selon :

$$\Delta E_{\text{total}} = \Delta E_a + \Delta E_b \quad \text{Équation 1}$$

Avec ΔE_a la différence de potentiel entre CCA et une électrode de référence ECS positionnée au centre du réacteur C2 et ΔE_b la différence de potentiel entre l'ECS et CCC. ΔE_a et ΔE_b ont été mesurés à l'aide d'un multimètre après 20 minutes d'application d'une valeur donnée de DDP.

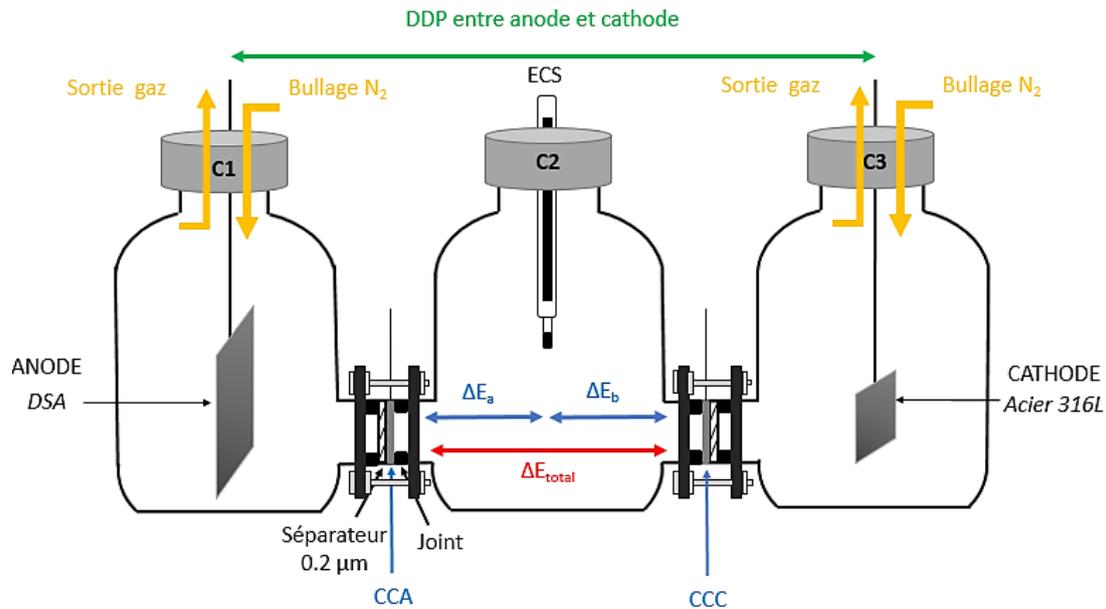


Figure 1 : Représentation schématique de la caractérisation électrochimique du système expérimental.

Le Tableau 1 donne les valeurs de ΔE_a , ΔE_b et ΔE_{total} mesurées pour chaque valeur de DDP appliquée entre la DSA et l'électrode en acier inoxydable 316L. A titre indicatif, le courant produit entre la DSA et l'acier est également mentionné.

Tableau 1 : Valeurs de I , ΔE_a , ΔE_b et ΔE_{total} obtenues pour différentes valeurs de DDP appliquées entre la DSA et l'acier inoxydable 316L (Figure 1).

DDP (V)	I (mA)	ΔE_a (V)	ΔE_b (V)	ΔE_{total} (V)
10	33	3.58	2.05	5.63
9	32	3.61	2.03	5.64
8	32	3.44	1.94	5.38
7	28	2.98	1.65	4.63
6	24	2.55	1.37	3.92
5	19	2.10	1.11	3.21
4	16	1.68	0.87	2.55
3	12	1.28	0.65	1.93
2	8	0.98	0.51	1.49
1	4	0.61	0.32	0.93
0	0	0.22	0.09	0.31

Les valeurs de ΔE_{total} entre CCA et CCC en fonction des valeurs de DDP appliquées sont reportées sur la Figure 2 afin d'estimer le plus judicieusement possible la différence de potentiel à appliquer pour imposer le champ électrique. ΔE_{total} plafonne à une valeur maximale à partir d'une DDP de 8 V. Cette valeur de 8 V sera par conséquent la DDP appliquée pour la suite des travaux. En appliquant 8 V entre la DSA et l'acier, la différence de potentiel entre les deux électrodes en tissu de carbone CCA et CCC est de 5.4 V. Ces deux électrodes étant distantes de 17 cm, le champ au-travers du compartiment C2 est de l'ordre de 31 V.m⁻¹.

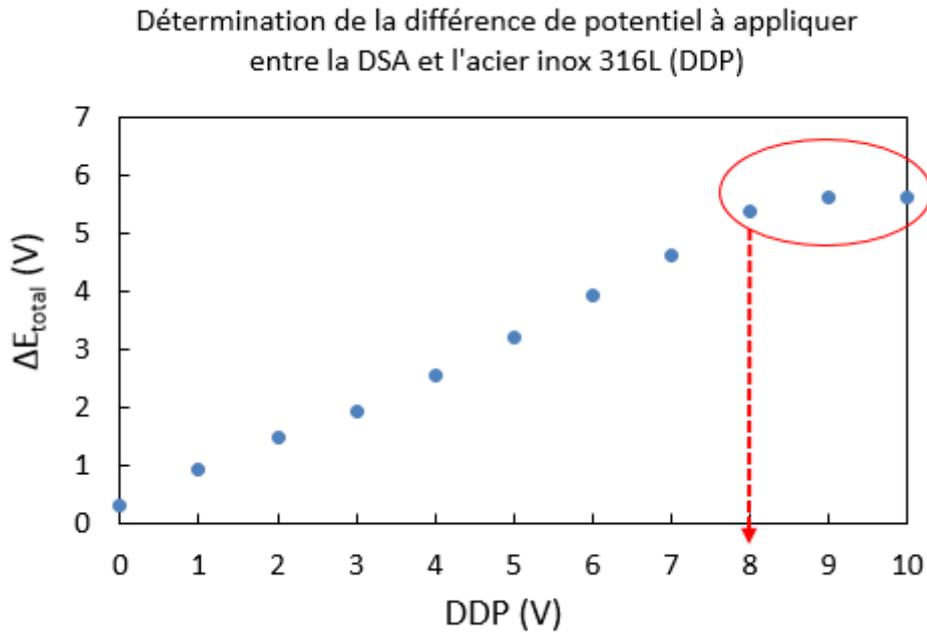


Figure 2 : Détermination de la différence de potentiel à appliquer entre la DSA et l'acier inoxydable 316L pour les expériences de ce chapitre de thèse.

Standardisation par pré-traitement des interfaces CC/électrolyte

D'après le Tableau 1, lorsqu'aucun courant n'est produit entre la DSA et l'acier ($DDP = 0$ V), on constate que les valeurs de ΔE_a et ΔE_b sont différentes avec un écart significatif entre les deux de 130 mV. Cela signifie que les deux tissus de carbone (CCA et CCC) ont initialement des potentiels en circuit ouvert différents, ce qui pourrait biaiser les résultats de notre étude. Ces différences peuvent s'expliquer par la présence de bulles d'oxygène emprisonnées dans le maillage des fibres de CCA et CCC ou des états de surface différents suivant par exemple le soin pris pour découper les tissus de carbone sans les polluer. Pour notre étude il semble important que les deux tissus de carbone présentent avant l'application du champ électrique des potentiels en circuit ouvert similaires. Une étape de prétraitement des interfaces CC/électrolyte a alors été systématiquement mise en place avant d'appliquer le champ électrique. Le prétraitement est réalisé avec du milieu minimum dans les trois compartiments. Au centre du compartiment C2, une électrode de référence (ECS) et une grille de Pt sont introduites. A l'aide d'un N-stat, les deux tissus de carbone (CCA et CCC) sont polarisés individuellement à -0.2 V/ECS pendant 35 minutes à 40°C . Le Tableau 2 compare les valeurs de ΔE_a et ΔE_b avant et après les 35 minutes de polarisation des deux électrodes CCA et CCC.

Tableau 2 : Comparaison des valeurs de ΔE_a et ΔE_b avant et après prétraitement des deux électrodes en tissu de carbone (CCA et CCC).

	Avant initialisation			Après initialisation		
	ΔE_a (V)	ΔE_b (V)	Ecart (mV)	ΔE_a (V)	ΔE_b (V)	Ecart (mV)
E1	0.22	0.09	130	0.024	0.083	59
E2	0.22	0.13	90	0.004	0.001	3

D'après le Tableau 2, cette courte polarisation à -0.2 V/ECS permet de standardiser les deux électrodes en tissu de carbone à des potentiels en circuit ouvert relativement proches. Pour la suite des expériences, cette étape de prétraitement a donc été systématiquement réalisée avant l'application du champ électrique.

2.2 En condition biotique

Les expériences en condition biotique ont été effectuées selon la procédure expérimentale suivante.

Etape 1 : Prétraitement des deux électrodes en tissu de carbone (CCA et CCC) comme expliqué ci-avant dans du milieu minimum.

Etape 2 : L'électrode de référence ECS et la contre-électrode (grille de Pt) sont retirées du compartiment central et l'inoculum y est introduit. Pour certaines expériences, l'inoculum utilisé était une bioanode primaire (4 x 10 cm²) préalablement formée dans du lixiviat de terreau sur du tissu de carbone (protocole décrit au chapitre 2). Pour d'autres expériences, l'inoculum était du lixiviat de terreau. Dans le cas d'une bioanode primaire, celle-ci est directement introduite au centre du compartiment C2 et est laissée à son potentiel d'abandon (sans polarisation). Des vitamines, des nutriments et de l'acétate (20 mM) sont ensuite ajoutés dans le compartiment central afin de favoriser la croissance des bactéries. De l'acétate est également ajouté dans les compartiments externes. Dans le cas où du lixiviat de terreau est employé comme inoculum, le milieu minimum de C2 est retiré à l'aide d'une pompe péristaltique et le lixiviat y est introduit. Le terreau contenant déjà assez de macro- et micro-nutriments, seul de l'acétate est ajouté au compartiment C2 ainsi que dans les compartiments C1 et C3. Un bullage d'azote pendant 15 minutes est réalisé dans C2 afin de limiter la présence d'oxygène, néfaste pour les bactéries électroactives anodiques. Une DDP de 8 V est ensuite appliquée entre les électrodes des compartiments C1 et C3 pendant 65 ou 3 heures avec un bullage constant

d'azote dans les compartiments C1 et C3. Lors de l'application du champ électrique, les potentiels des deux électrodes en tissu de carbone CCA et CCC sont laissés en circuit ouvert.

Etape 3 : Après l'arrêt de l'application du champ électrique, le bullage d'azote dans C1 et C3 est arrêté. La bioanode primaire est retirée du compartiment central ou, suivant les cas, le lixiviat de terreau est délicatement aspiré avec une pompe péristaltique et est remplacé par du milieu synthétique. Des nutriments et des vitamines sont ajoutés dans les compartiments C1 et C3. L'ECS et la grille de platine sont introduits dans le compartiment C2 et les deux tissus de carbone (CCA et CCC) sont polarisés à -0.2 V/ECS pendant 7 jours. Au jour 6, la concentration en acétate est mesurée dans les trois compartiments avant d'être complétée à 20 mM.

2.2.1 Première série d'expériences

Une première série d'expériences a été conduite avec un duplicata de réacteur (E3 et E4) en testant une durée de champ électrique de 65 heures et une bioanode primaire comme inoculum. Les courbes de chronoampérométrie de CCA et CCC pendant les 7 jours de polarisation à -0.2 V/ECS sont données sur la Figure 3, les densités de courant sont rapportées aux surfaces de tissu de carbone exposées à la solution, soit 3.14 cm².

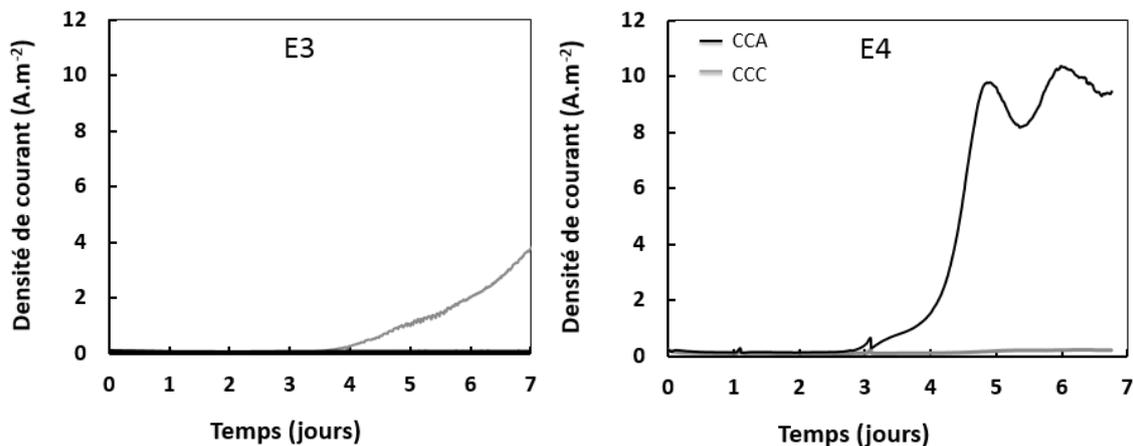


Figure 3 : Chronoampérogrammes obtenus pour les réacteurs E3 et E4 (CCA en noir et CCC en gris). Un champ électrique de 30 V.m⁻¹ a été appliqué pendant 65 h en utilisant comme inoculum une bioanode primaire formée sur tissu de carbone dans du lixiviat de terreau.

Problème d'inoculum ?

Les résultats produits par les deux réacteurs sont très différents. Pour E3, du courant est produit uniquement sur CCC à partir du jour 4 et au jour 7 une densité de courant de l'ordre de 3.5 A.m⁻² est

atteinte. Pour E4, du courant est produit uniquement sur CCA à partir du jour 3 et au jour 7 la densité de courant délivrée est de l'ordre 9.5 A.m^{-2} . Ce manque de reproductibilité pourrait être dû aux deux bioanodes primaires utilisées pour inoculer E3 et E4 qui pourraient présenter des propriétés électrocatalytiques différentes comme déjà évoqué au chapitre 3. L'utilisation d'une bioanode primaire comme inoculum ne semble donc pas être un choix judicieux pour cette étude. Pour la suite, les tests ont été conduits en utilisant comme inoculum du lixiviat de terreau.

Mesure du pH

En mesurant le pH dans les trois compartiments en fin d'expérience, il s'est avéré que le compartiment anodique s'est acidifié ($\text{pH } 4.3 \pm 0.4$), le compartiment central a vu le pH croître ($\text{pH } 9.6 \pm 0.4$), tandis que le compartiment cathodique est devenu très alcalin ($\text{pH } 12.1 \pm 0.3$). Pour rappel, avant le champ électrique le pH des trois compartiments était voisin de 7.0.

Ces évolutions de pH sont liées aux réactions électrochimiques se produisant sur l'anode et la cathode lors du champ électrique : une production d'ions H^+ du côté anodique (réaction 1) et une production d'ions OH^- du côté cathodique (réaction 3). Pour le compartiment central, un équilibre entre C1 et C3 a dû s'établir. Ce gradient important de pH ($4 < \text{pH} < 12$) entre les trois compartiments est un réel problème pour notre étude. En effet, il serait alors difficile de conclure si les résultats obtenus sont réellement dus à un phénomène d'électrotactisme ou bien à la détection du gradient de pH. La durée d'application du champ électrique de 65 heures a par conséquent été réduite.

A la fin de cette première série d'expériences (E3/E4), des précipités solides blanchâtres ont été observés dans les compartiments cathodiques (C3) ainsi qu'à la surface des électrodes en tissu de carbone proches des compartiments cathodiques (CCC) (Figure 4). La précipitation est certainement liée à l'importante alcalinisation observée du côté cathodique.

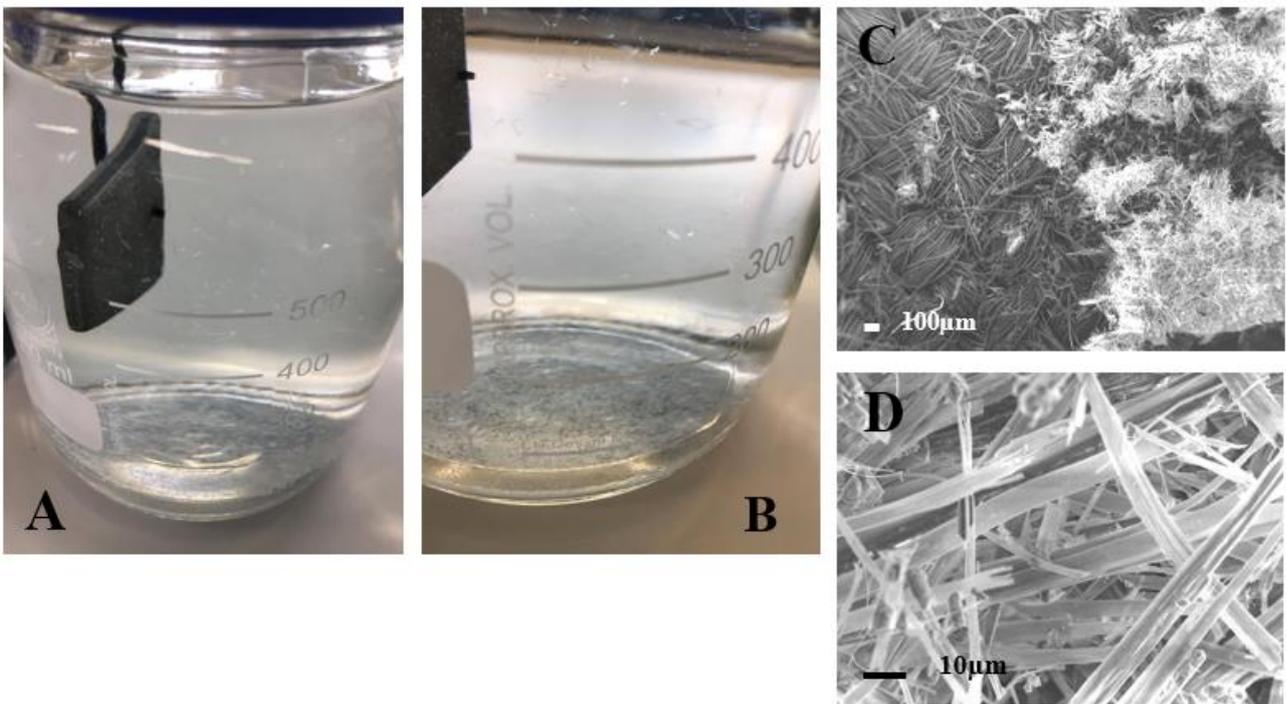
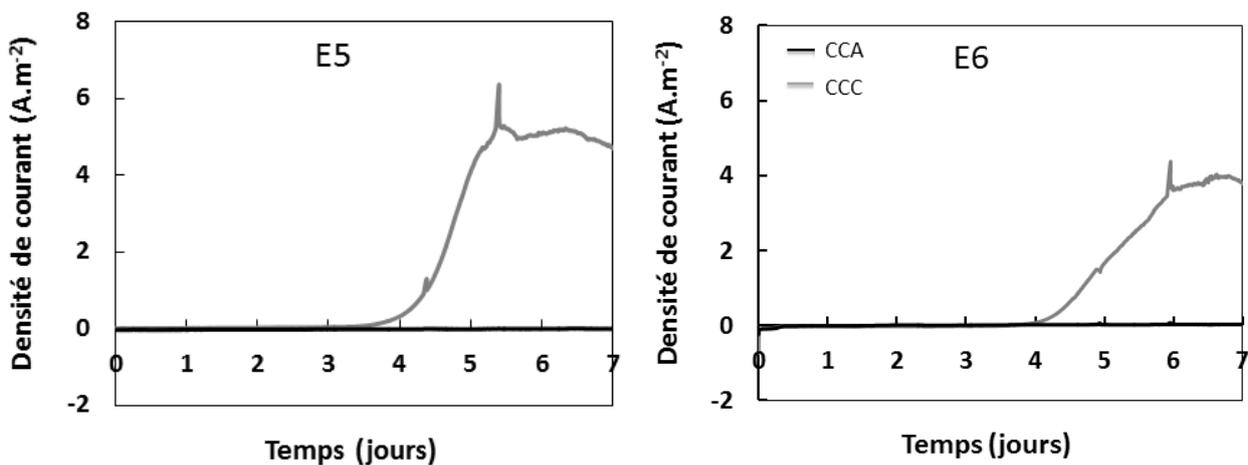


Figure 4 : A-B) Photographies du compartiment cathodique et C-D) images au microscope électronique à balayage de la surface du tissu de carbone proche du compartiment cathodique (CCC).

2.2.2 Deuxième série d'expériences

Une deuxième série d'expériences a été réalisée en tenant compte des précédents constats : la bioanode primaire est remplacée par du lixiviat de terreau et la durée d'application du champ électrique est diminuée à 3 heures. Trois réacteurs ont été mis en œuvre : E5 et E6 ont été soumis à un champ électrique tandis qu'E7 ne l'a pas été. Les courbes de chronoampérométrie réalisées sur CCA et CCC après les 3 heures de champ électrique sont présentées sur la Figure 5.



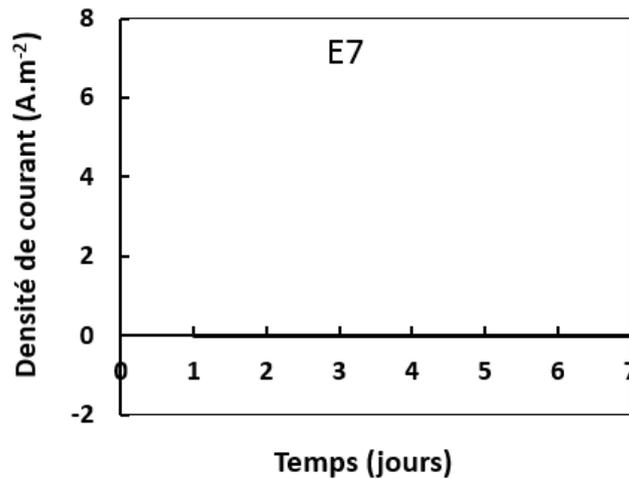


Figure 5 : Chronoampérogrammes obtenus pour les réacteurs E5, E6 et E7 (CCA en noir et CCC en gris). L'inoculum est du lixiviat de terreau, une DDP de 8 V est appliqué pendant 3 h uniquement pour E5 et E6. Pour E7 aucun champ électrique n'a été appliqué (contrôle).

Validation de l'utilisation du lixiviat de terreau comme inoculum

Les résultats obtenus dans ces nouvelles conditions sont très encourageants. Une différence nette apparaît entre les réacteurs avec champ électrique (E5 et E6) et le réacteur sans champ électrique (E7). Après l'application du champ électrique pendant 3 heures, du courant n'est produit que sur les CCA tandis qu'aucun courant n'est produit en absence de champ électrique. De plus, les résultats issus d'E5 et d'E6 sont reproductibles : du courant est systématiquement produit uniquement sur CCA à partir du jour 4 environ et au jour 7 les densités de courant sont voisines de 4.5 A.m⁻². Le passage des électrodes primaires au lixiviat de terreau comme inoculum s'est avéré être un choix pertinent.

Diminution du gradient de pH

Les valeurs de pH dans les trois compartiments d'E5 et d'E6 obtenues après les 7 jours de polarisation des tissus de carbone sont reportées dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Comparaison des pH dans les compartiments anodiques (C1), centraux (C2) et cathodiques (C3) initialement (t0) et après 7 jours de polarisation à -0.2 V/ECS dans du milieu synthétique à 40°C. « n » correspond au nombre de valeurs exploitées pour calculer les moyennes et les écarts-types.

	C1	C2	C3
t0	7.0	7.0	7.0
Après 7 jours de polarisation (n=3)	8.1 ± 0.3	8.6 ± 0.2	9.1 ± 0.1

En diminuant la durée du champ électrique de 65 à 3 heures, le gradient de pH entre les trois compartiments au jour 7 est moins significatif ($8 < \text{pH} < 9$). Toutefois, une différence d'environ une unité de pH subsiste entre C1 et C3 ce qui reste non négligeable pour notre étude. A nouveau, il n'est donc pas garanti que les résultats tirés des expériences E5 et E6 soient uniquement dus à de l'électrotactisme. Il reste possible que le gradient de pH ait également un effet. Nous aurions pu recréer artificiellement ce gradient de pH entre les compartiments C1 et C3 (sans champ électrique) pour évaluer son rôle sur la mobilité/le transport des bactéries EA. Or ceci nous aurait écarté de notre objectif initial. Nous avons raisonnablement choisi de ne pas poursuivre dans cette direction mais cette piste pourrait constituer un axe de recherche intéressant pour de futures études. Bien qu'encourageants, les résultats fournis par E5, E6 et E7 ont été considérés comme des résultats non exploitables.

Par ailleurs, il a été surprenant de voir que le pH anodique passe de 7 (t0) à environ 8 (jour 7) malgré une production d'ions H^+ à l'anode lors de l'application du champ électrique. Ceci a alors attiré notre attention et nous avons voulu comprendre cette augmentation contre-intuitive du pH du côté anodique. Le milieu synthétique utilisé pour les expériences contenait une solution de tampon bicarbonate à 50 mM. Une hypothèse serait que le bullage de N_2 effectué pendant les 3 heures de champ aurait décarbonaté le milieu et ainsi provoqué l'élévation du pH.

Pour vérifier cette hypothèse des tests supplémentaires ont été menés : le réacteur E8 a été mis en œuvre en appliquant pendant 3 heures un bullage seul de N_2 sans champ électrique. Le réacteur E9 a été opéré en appliquant 3 heures de champ électrique sans bullage de N_2 . Le Tableau 4 donne les valeurs de pH relevées dans les trois compartiments.

Tableau 4 : Valeurs des pH obtenues dans les compartiments anodiques (C1), centraux (C2) et cathodiques (C3) lors des tests E8 et E9.

	C1	C2	C3
t0	7.3	7.6	7.3
E8 : 3h bullage N ₂ sans champ électrique	8.5	7.6	9.0
E9: 3h de champ électrique sans bullage N ₂	7.2	7.5	7.7

Les résultats de E8 (sans champ / 3 h bullage N₂) démontrent que notre hypothèse est fondée. Après 3 heures de bullage de N₂ et sans DDP appliquée aux électrodes, le pH augmente de 1.5 à 2 unités dans les compartiments C1 et C3. Au contraire, pour E9 réalisée sans bullage de N₂ mais avec 3 heures de champ électrique, les évolutions attendues de pH sont constatées : une légère acidification dans C1 et une légère alcalinisation dans C3. Ces deux tests ont montré que les ions H⁺ et OH⁻ produits au cours de 3 heures d'application du champ électrique ne sont pas les responsables majoritaires du gradient de pH apparu entre les trois compartiments, mais que c'est bien le bullage de N₂ qui a pour effet de décarbonaté le milieu. Cette durée d'application de la DDP a donc été conservée pour la suite des expériences.

Conditions anaérobies (bullage de N₂)

Au cours de l'ensemble des expériences menées jusqu'ici avec les réacteurs triple compartiments, nous avons parfois remarqué que les solutions des compartiments externes devenaient troubles pendant la période des 7 jours de polarisation des tissus de carbone. Ce phénomène apparaissait de façon très aléatoire, tantôt dans un seul des deux compartiments externes tantôt dans les deux (Figure 6).

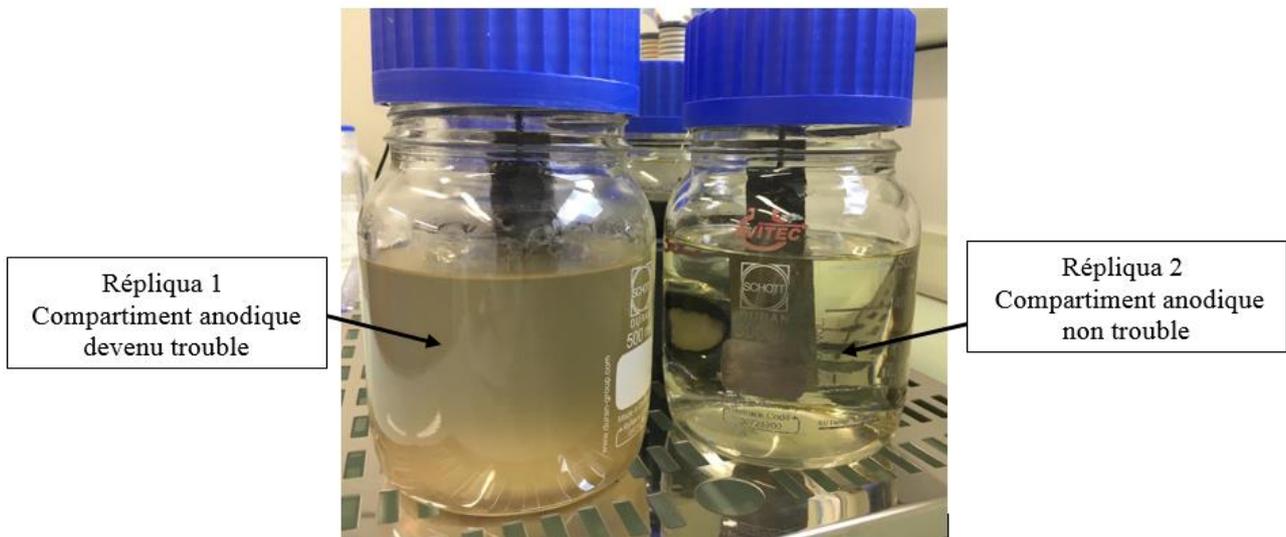


Figure 6 : Photographie mettant en évidence le caractère aléatoire de la turbidité parfois observée dans les compartiments externes du réacteur « triple compartiments ».

Cette turbidité nous a fait penser à un développement microbien. Des échantillons des milieux troubles et limpides ont été prélevés, marqués à l'acridine orange puis observés par microscopie à épifluorescence. Les bactéries foisonnaient dans les échantillons de milieu trouble contrairement aux échantillons de milieu limpide pour lesquels très peu de bactéries ont pu être observées. La turbidité était donc bien liée à un développement microbien. De l'acétate est ajouté dans les compartiments externes afin d'éviter l'appauvrissement du compartiment central par diffusion au-travers des séparateurs. La phase de polarisation des électrodes en tissu de carbone (Etape 3) n'était pas réalisée sous bullage d'azote, du dioxygène a donc pu pénétrer dans les compartiments externes qui n'étaient pas totalement étanches. La présence de dioxygène et d'acétate crée alors un environnement propice au développement d'espèces bactériennes hétérotrophes aérobies. Afin de minimiser les développements microbiens dans les compartiments externes, la suite des expériences a été réalisée en appliquant un bullage d'azote continu dans les compartiments externes durant toute la durée des expériences, c'est-à-dire à la fois les étapes 2 (3 heures de champ) et 3 (7 jours de polarisation).

2.2.3 Troisième série d'expériences

Grâce à l'optimisation expérimentale « pas à pas » qui a été réalisée, certains paramètres opératoires ont enfin pu être fixés. Toutefois, l'apparition d'un gradient de pH entre les trois compartiments induit par l'association d'un tampon bicarbonate avec un bullage de N_2 reste un problème majeur. D'autres tests ont alors été menés en conservant le bullage de N_2 mais en remplaçant la solution de tampon

bicarbonate par un tampon phosphate de composition ionique proche de celle du tampon bicarbonate (Tableau 5).

Tableau 5 : *Composition des solutions tampon de bicarbonate et de phosphate.*

Composition du tampon bicarbonate		Composition du tampon phosphate	
Na ₂ CO ₃] 50 mM	Na ₂ HPO ₄] 70 mM
NaHCO ₃		KH ₂ PO ₄	
NaH ₂ PO ₄	20 mM	KCl	60 mM
KCl	60 mM		

Mesure du pH

Le pH a été relevé dans les trois compartiments avant l’application du champ électrique (t0), après les 3 heures de champ électrique et à la fin des 7 jours de polarisation. Toutes les valeurs sont reportées dans le Tableau 6.

Tableau 6 : *Valeurs des pH dans les compartiments anodiques (C1), centraux (C2) et cathodiques (C3) lors des tests menés avec une solution tampon de phosphate et un bullage de N2. « n » correspond au nombre de valeurs exploitées pour calculer les moyennes et les écarts-types.*

	C1	C2	C3
t0	6.9	7.6	6.9
Après 3 heures de champ électrique (n=2)	6.8 ± 0.1	/	7.0 ± 0.1
Après 7 jours de polarisation à -0.2 V/ECS (n=2)	7.0 ± 0.2	7.4 ± 0.1	7.3 ± 0.2

Les valeurs de pH des trois compartiments restent proches les unes des autres et aucun gradient de pH significatif n’est constaté. Le passage au tampon phosphate s’est avéré être une solution pertinente. De plus, le bullage continu d’azote dans les compartiments C1 et C3 durant les 7 jours de polarisation des tissus de carbone CCA et CCC a également permis d’éviter tout développement biologique dans les compartiments externes.

Finalement, après un nombre conséquent d’expériences préliminaires nous sommes parvenus à élaborer une procédure expérimentale robuste (rappelée à la section 3.1 de ce chapitre) et des conditions opératoires adaptées aux objectifs de notre étude :

- Mise en place d'un prétraitement des tissus de carbone avant le champ électrique.
- Une différence de potentiel de 8 V est appliquée entre l'anode et la cathode pendant 3 heures.
- Le lixiviat de terreau est systématiquement employé comme inoculum.
- Le bullage d'azote est maintenu dans les compartiments C1 et C3 tout le long des opérations.
- Utilisation d'une solution tampon phosphate à 70 mM pour le milieu synthétique.

Ces conditions seront qualifiées par la suite de conditions « standards ». Ces conditions standard ont été utilisées en premier lieu pour déceler l'impact d'un champ électrique sur la formation d'un biofilm EA en particulier grâce à la comparaison des résultats obtenus en appliquant ou non le champ électrique avant la polarisation des électrodes en tissu de carbone.

En deuxième lieu, nous avons voulu modifier quelques paramètres des conditions « standards » et observer les effets produits. Les paramètres modifiés ont été : (i) la composition du milieu synthétique (avec KCl vs. sans KCl), (ii) la durée du champ électrique (3 heures vs. 2 heures) et enfin (iii) le sac de terreau utilisé pour préparer l'inoculum lixiviat de terreau (sac ouvert depuis 1 mois vs. sac fraîchement ouvert).

La section 3 de ce chapitre présente les résultats obtenus avec le sac de terreau SAC 3 (ouvert depuis 1 mois) tandis que la section 4 porte sur les expériences menées avec le sac de terreau SAC 4 (fraîchement ouvert).

3 RESULTATS OBTENUS AVEC LE SAC DE TERREAU SAC 3

La majorité des expériences menées avec le sac de terreau SAC 3 a fait l'objet d'un article intitulé « *Is microbial electrotaxis an osmotaxis ?* » qui sera soumis pour publication dès la thèse soutenue. Il est présenté dans la section 3.1 ci-dessous et les « Supplementary Data » sont en annexe. Des résultats complémentaires à l'article sont présentés dans la section 3.2.

3.1 Article « *Is microbial electrotaxis an osmotaxis?* »

Is microbial electrotaxis an osmotaxis?

Poehere Chong*, Benjamin Erable, Alain Bergel

Laboratoire de Génie Chimique, CNRS, Université de Toulouse, 4 allée Emile Monso, 31432 Toulouse, France

E-mail addresses: poehere.chong@ensiacet.fr, benjamin.erable@ensiacet.fr, alain.bergel@ensiacet.fr

**Corresponding author:* poehere.chong@ensiacet.fr, (+33) 5 34 32 36 27

Abstract

An experimental procedure was designed in order to differentiate the possible impact of the electric field from that of polarisation on the formation of electroactive biofilms. Carbon cloth (CC) electrodes were let at open circuit and exposed to a multi-species inoculum, while an external electric field was applied to the system, or not. The electrodes were then polarised in synthetic medium that did not contain the inoculum. The electric field applied during exposure to the inoculum greatly enhanced the subsequent formation of electroactive biofilms under polarisation. In the absence of electric field current densities remained close to zero even after 1 week of polarization at -0.2 V/SCE, while current densities were generated after only around 3 days of polarization and rapidly surpassed 1 A.m^{-2} , when the electric field was applied. The electrodes that were closest to the cathode that created the electric field produced current first, which cannot be explained by conventional migration of the microbial cells. Analysis of ionic transports showed that the electric field provoked an osmolarity gradient at the surface of the electrodes, and led to consider the capacity of microbial cells to detect interfacial osmolarity gradient as the main motor of surface colonisation.

Keywords: electroactive biofilm; electric field; microbial fuel cell; microbial electrochemical technology; bioelectrochemical system.

1. INTRODUCTION

Electrotaxis is the property of cells to detect electric field and use it to orient their motion. This property has been widely investigated in the case of eukaryotic cells [1], [2]. It has been claimed to play key roles in many physiological processes of living organisms such as cell organising to form tissues [3], wound healing [4], and organ formation and location [5].

In contrast, the possibility of electrotaxis has been very rarely evoked for microbial cells. Even the impressively increasing research on electroactive biofilms has not really boosted the interest on possible microbial electrotaxis yet.

Microbial electroactive biofilms have been seen as the source of many innovative electrochemical processes [6], [7] in a huge number of application fields such as the production of electrical energy or hydrogen, effluent treatments, metal recovery and synthesis of valuable compounds from CO₂ reduction. Microbial electroactive biofilms may also be at stake in microbial corrosion [8]. Beside the field of conventional electrochemical processes, more and more cases of inter-species microbial electron transfers are being discovered to be mediated by conductive solids [9]–[11]. Despite so large context with so great foreseen applications, only a few studies have addressed possible electrotaxis in the formation of microbial electroactive biofilms, mainly dealing with *Shewanella* species [12].

The purpose of this study was to take advantage of microbial electroactivity to go ahead in identifying and deciphering possible microbial electrotaxis by using a complex multi-species consortium. A new type of electrochemical set-up was designed in order to discriminate the impact of the electric field from that of the polarised electrode. Actually, imposing an electric field through a solution requires electrochemical reactions to occur on the surface of the electrodes. It is consequently difficult to discriminate the impact of the electric field from that of the polarized electrode surface in a conventional electrochemical reactor, because the electrodes that create the electric field act also as the electron source or sink for the electroactive species that reach them. The new experimental device and procedure described here made it possible to separate the two effects.

It was thus evidenced here that electric field enhanced the formation of electroactive biofilms on solid surface. The electric field did not impact the biofilm formation only by conventional cell migration but through the combination of different indirect actions due to the osmolarity gradient that was created at the interface. This analysis led to consider the capacity of microbial cells to detect interfacial osmolarity gradient as the main motor of surface colonisation.

The results described here indicate that controlling surface osmolarity may be a key cantilever to enhance or mitigate the formation of electroactive biofilms on solid surfaces. Obvious applications can be foreseen in all domains of microbial electrochemical technologies. Beyond that, and in a more speculative way, considering the ubiquitous presence of endogenous electric fields in living organisms [4] and the huge amount of interfaces that compose them, the results described may also open up new research tracks in the biomedical and physiological domains.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Inoculum and medium composition

The inoculum was a garden compost leachate prepared as already described [13]. It was obtained by filtering a mix of 1.5 L of garden compost (Lombricompost, Or Brun) and 2.25 L of tap water containing 60 mM KCl through a large-mesh cloth.

Medium 1 was a phosphate buffer solution supplemented with 60 mM of KCl. The phosphate buffer solution was obtained by mixing a solution of Na_2HPO_4 (9.47 g.L^{-1}) and a solution of KH_2PO_4 (9.08 g.L^{-1}) with a ratio of respectively 61-39% (v/v). Final pH was 7.0. Medium 2 consisted of medium 1 with the addition of 20 mM of sodium acetate. Medium 3 was the medium 2 supplemented with 10 mL.L^{-1} of macronutrients solution, 1 mL.L^{-1} of micronutrients solution and 1 mL.L^{-1} of vitamins solution (see Supplementary Data Table S.1).

2.2 Electrochemical reactors

The electrochemical reactors (Figure 1) were made by assembling three modified Schott glass bottles (diameter 101 mm – height 152 mm, Duran). The central compartment was separated from the two end-compartments with a system constituted of a flat gasket cut from a rubber foil with an outer diameter of 5 cm and an inner diameter of 2 cm, a membrane with 0.2- μm cut-off threshold (outer diameter 5 cm, PALL SAS France), a carbon cloth electrode (outer diameter 3 cm, PaxiTech SAS France) electrically connected with a platinum wire, and a second rubber gasket identical to the first one. Such a separation system was arranged between the central compartment and each of the two end-compartments, with the carbon cloth electrode facing the central compartment. According to the inner diameter of the flat rubber gasket (2 cm), the surface area of the carbon cloth electrodes exposed to the

solution was of 3.1 cm². Sealing was achieved by pressing the system with an external frame equipped with four bolts.

A dimensionally stable anode (DSA) of 8 cm x 2 cm x 0.1 cm was placed in an end-compartment (C1) and a stainless steel electrode (SS) of 3 cm x 3 cm x 0.3 cm was placed in the other end-compartment (C3). The stainless steel electrode was cleaned with a 50-50% (v/v) mixture of acetone-ethanol, then treated with a 2-20% fluoronitric acid solution and finally rinsed with distilled water. These two metallic electrodes were electrically connected with a 2-mm-diameter screwed titanium wire. The electric field was established between these two metallic electrodes by applying a voltage of 8 V during three hours (or 2 hours when indicated) between the DSA used as the anode and SS used as the cathode, which were separated by 27 cm.

When necessary, a saturated calomel reference electrode (SCE, Radiometer, +0.241V vs SHE) and a platinum grid used as the counter electrode were introduced in the central compartment (C2) and each of the two carbon cloth electrodes was individually polarised as a working electrode at -0.20 V/SCE with a multi-channel potentiostat (N-stat set-up, Biologic SA, France).

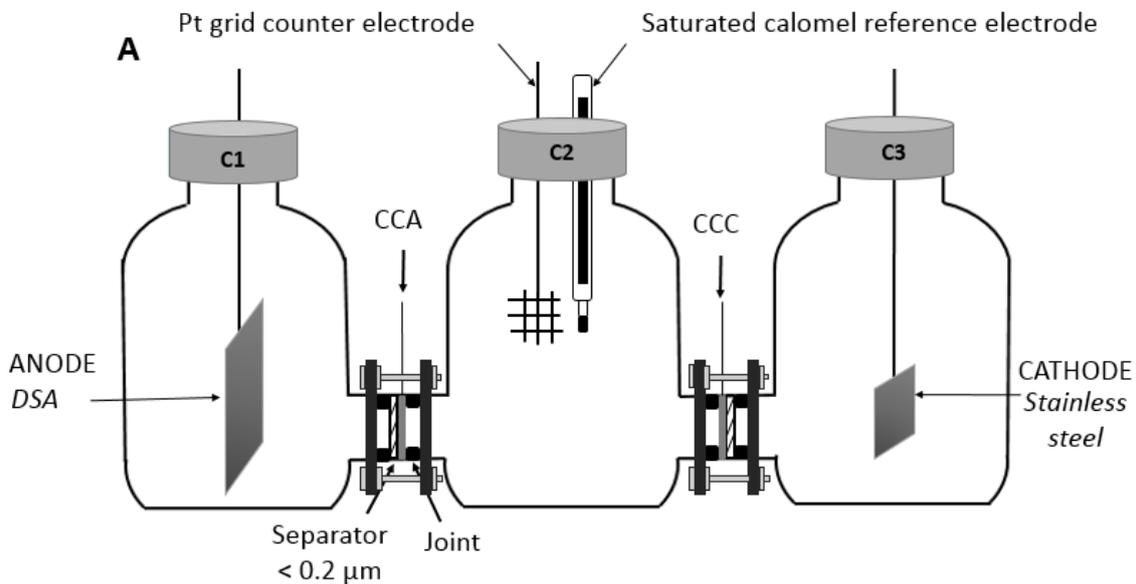




Figure 1: A) Schematic and B) picture of the electrochemical device with garden compost leachate in the central compartment and Medium 2 in the two end-compartments.

2.3 Experimental procedure

All the experiments were carefully carried out following the same experimental procedure that consisted in three successive steps.

Step 1: Electrochemical pre-treatment of the carbon cloth electrodes

The two carbon cloth electrodes were submitted to an electrochemical pre-treatment in order to ensure that both had the same initial surface state before inoculation. The three compartments were filled with 700 mL of medium 1. A reference electrode (SCE) and a counter (CE) electrode were introduced in the central compartment (C2) and the two carbon cloth electrodes, individually addressed as working electrodes, were polarized at -0.20 V/SCE with an N-stat device. After 35 minutes of polarization, cyclic voltammetry (CV) was recorded with each carbon cloth electrode at 1 mV/s in the -0.5 to $+0.2$ V/SCE range in order to check their identical initial electrochemical characteristics.

Step 2: Inoculating with compost leachate and imposing an electric field

The SCE and the CE electrodes were removed from the central compartment. The medium was removed from the central compartment and replaced by garden compost leachate by using a pump and keeping the compartment under constant nitrogen bubbling during the operation. Compost leachate had been previously deoxygenated by 30 min of vigorous nitrogen bubbling. Then 20 mM of sodium acetate was added in the three compartments. During 3 hours, a voltage of 8 V was applied between

the anode (DSA) and the cathode (SS). The carbon cloth electrodes were not connected to an electrical circuit during this step. Nitrogen was continuously bubbling in the end-compartments.

Based on this standard procedure, a few parameters have been varied (Table 1): medium 1 without KCl was used in the end-compartments, or the exposure time to the electric field was reduced to 2 hours. In addition, 3 types of control experiments have been achieved during Step 2:

- with the inoculum and no applied electric field,
- without inoculum (medium 1 in the central compartment instead of compost leachate) and with applied electric field,
- without inoculum (medium 1 in the central compartment instead of compost leachate) and without electric field.

Table 1: Different operating conditions implemented in Step 2.

#	1	2	3	4	5	6
	Controls			Different exposure conditions		
Electric field	no	no	yes	yes	yes	yes, only 2 hours
Medium in central compartment	Medium 1 (abiotic)	Compost leachate	Medium 1 (abiotic)	Compost leachate	Compost leachate	Compost leachate
Medium in end-compartments	Medium 1	Medium 1	Medium 1	Medium 1	Medium 1 w/o KCl	Medium 1

The control experiments, in which medium 1 was used for Step 2 instead of the garden compost inoculate, were named “abiotic”. Rigorously, this term would not be appropriate because medium 1 was not sterilised. The term “abiotic” was used in this report for sake of simplification to express that no inoculum was added into the synthetic medium.

Step 3: “Development” of the carbon cloth electrodes by polarization in the absence of the inoculum

When compost leachate was used in Step 2, it was removed from the central compartment and replaced by 700 mL of medium 2, always under constant nitrogen flux. Medium 2 had been previously deoxygenated by 30 min of vigorous nitrogen bubbling. Macronutrients, micronutrients and vitamins were added into the three compartments (medium 3). The reference and counter electrodes were disposed again into the central compartment. The two carbon cloth electrodes were individually polarized at -0.20 V/SCE during 7 days. At day 6, the concentration of sodium acetate was checked in all compartments with an enzymatic kit (K-ACETAK, Megazymes) and adjusted at 20 mM. At the

end of the polarization, CV curves were recorded at low scan rate (1 mV/s) starting from the polarisation value (-0.20 V/SCE) and in the range from -0.5 to +0.2 V/SCE.

All experiments were carried out in a heat chamber at 40°C. The two end-compartments (C1 and C3) were continuously flushed with nitrogen from Step 1 to 3. The central compartment (C2) was only deaerated by 15 min nitrogen bubbling at the beginning of each step and nitrogen was continuously flowing through it during solution replacements. Current densities were related to the projected surface area of the carbon cloth electrodes exposed to the solution (3.14 cm²).

2.4 Microbial anode analysis

At the end of the experiments, each carbon cloth electrode was removed from the reactor and divided into three pieces to be imaged by epifluorescence microscopy and scanning electron microscopy and for analysis of the microbial population by 16S rRNA pyrosequencing.

Epifluorescence microscopy. Staining with acridine orange marked both extracellular and intracellular nucleic acids so that imaging gave a fair representation of the global biofilm coverage. Samples were stained with acridine orange 0.01% (A6014 Sigma) during 10 minutes, then rinsed in water and dried at ambient temperature overnight. The samples were imaged with a Carl Zeiss Axioimager M2 microscope equipped for epifluorescence with an HBO 50 W ac mercury light source and the Zeiss 09 filter (excitor HP450-490, reflector FT 10, Barrier filter LP520). Images were acquired with a monochrome digital camera (evolution VF) every 3.9 µm along the Z-axis and the set of images was processed with the Axiovision® software. Four different spots were imaged for each electrode to acquire a representative vision of biofilm coverage.

Scanning electron microscopy. Samples were fixed in phosphate buffer solution (0.4 M, pH 7.4) containing 4% of glutaraldehyde. They were then washed with phosphate buffer and saccharose (0.4 M) and dehydrated by immersion in increasing concentrations of acetone (50%, 70%, 100%), then in a mixture of acetone and hexamethyldisilazane (HMDS) (50:50), and finally in 100% HMDS. The last batch of HMDS was dried until complete evaporation. Samples were observed with a scanning electron microscope LEO 435 VP. Four different spots were imaged for each electrode to acquire a representative vision of the biofilm structure.

Microbial community analysis. Biofilms were detached from the carbon cloth electrodes in 15 mL of sterile phosphate buffer solution by sonication (30 min, 80W). Samples of 20 mL were also collected

from the garden compost leachate (inoculum). For all samples (from bioanodes and inoculum), cells were concentrated by centrifugation at 4700 rpm during 8 minutes at 10°C. DNA was extracted using the MOBIO PowerSoil® DNA Isolation kit according to the manufacturer's manual. A 28F-519R bacterial 16s assay was performed on the MiSeq system to identify the microbial communities (RTLGe-nomics, Lubbock, USA).

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Principle and purpose of the experimental procedure

A new type of electrochemical set-up was designed in order to differentiate between the effects of electric field and polarisation. Actually, in a conventional electrochemical reactor, an electric field is established through the solution only when electron transfer occurs at the surface of the electrodes. It is consequently difficult to identify the possible impact of the electric field on the cells, which are in solution approaching the electrode surface, from that of polarisation when the cells reach the electrode surface and use it to grow.

The experimental device and the procedure described here decoupled the effect of the electric field, which was imposed by external electrodes, from that of polarisation, which was carried out in the following step in the absence of the inoculum. An external electric field was applied for 3 hours (Step 2) to two carbon cloth electrodes exposed to the same inoculum. Garden compost leachate was chosen as the inoculum because of the very large microbial diversity provided by soils [14] and because using garden compost leachate has already proved to lead to efficient microbial anodes [15], [16]. The carbon cloth electrodes were not connected to any electrical circuit during these 3 hours of exposure to the inoculum and to the electric field.

Then, the inoculum solution was removed and the two carbon cloth electrodes were polarised at -0.20 V/SCE in minimum synthetic medium (Step 3). Polarizing the carbon cloth electrodes was intended to induce the formation of an electroactive biofilm, from the species that had adhered on the electrode surface during the previous 3-hour exposure to the inoculum. Actually, this third step of polarisation in synthetic medium can be regarded as a kind of photographic development (for readers old enough to know silver photography), which revealed what had happened during the 3 hours of exposure to the inoculum.

It was expected to detect differences in the formation of the electroactive biofilms depending on whether the electric field was applied, or not (control), during exposure to the inoculum. It was also expected to observe differences depending on the location of the carbon cloth electrode upstream or downstream of the electric field. To distinguish the two carbon cloth electrodes, the one closer to the anode was named CCA and the other, closer to the cathode, was named CCC (Figure 1).

3.2 Impact of the electric field on current density

Carbon cloth electrodes were pre-treated in synthetic medium by 35 min of polarisation at -0.20 V/SCE (Step 1). Cyclic voltammeteries (CVs) recorded at the end of the pre-treatment were all similar (Supplementary Data, Figure S.1). The reduction current corresponded to the reduction of oxygen in the medium, which was not deoxygenated during this step. No significant difference was detected between CCA and CCC from the same reactor, and all CVs were similar for the 11 reactors.

After being exposed to the inoculum in the presence of an applied electric field or not (Step 2), the carbon cloth electrodes were polarized at -0.20 V/SCE in minimal synthetic medium (Step 3). The chronoamperometry curves were analysed at two different times: 3 and 7 days. For the sake of clarity, the results of only one reactor per type of operating conditions are plotted in Figure 2 and Figure 3 and replicates are provided in Supplementary Data (Figures S.2 and S.3).

3.2.1 3-day polarisation (Figure 2 and S.2)

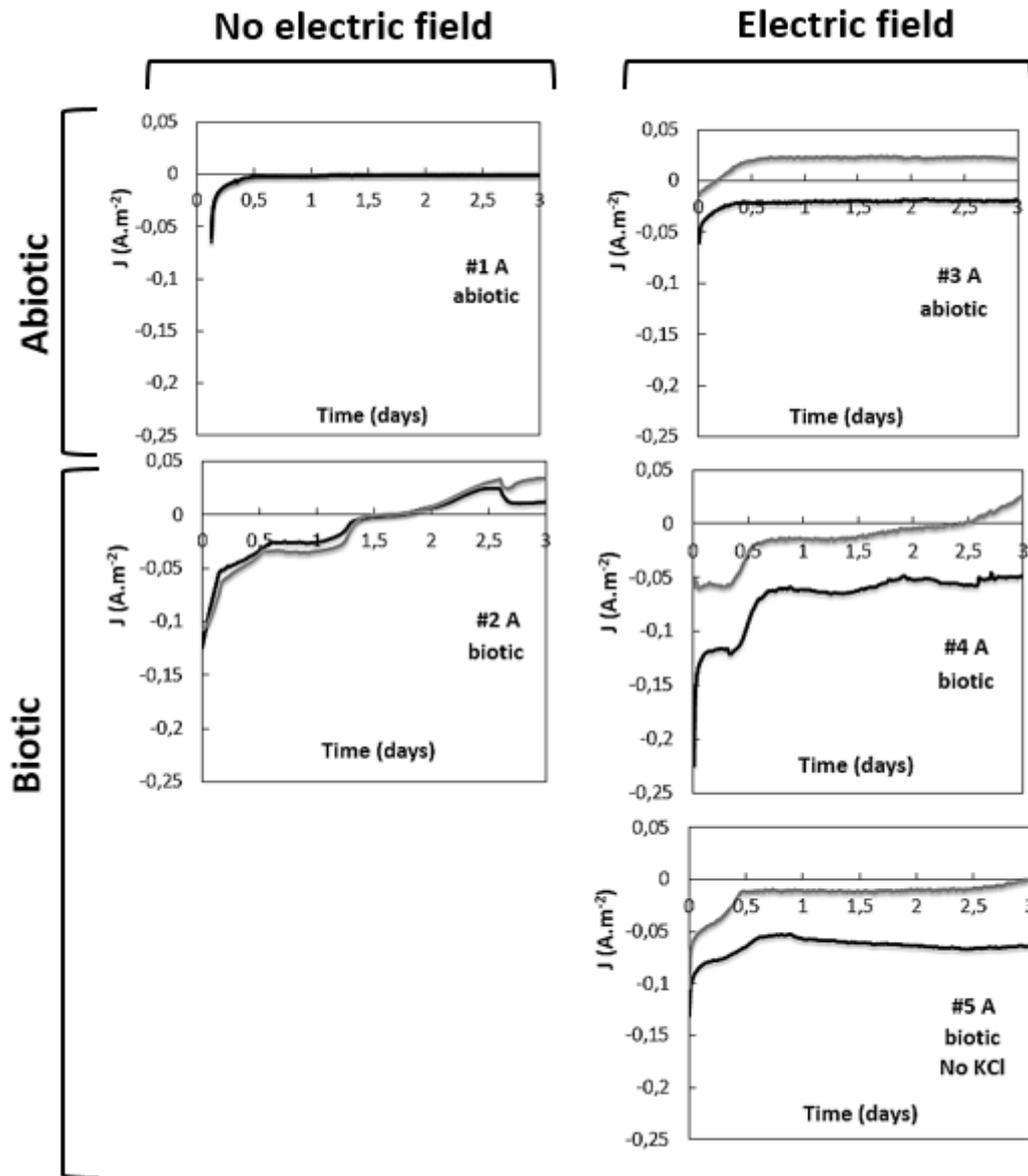


Figure 2: First three days of chronoamperometry (-0.20 V/SCE) of the carbon cloth electrode, which was closer to the anode (CCA, black), and that closer to the cathode (CCC, grey) during exposure to the inoculum, according to the different experimental conditions recalled in Table 1.

All the chronoamperometry curves showed similar features. Initially the current always showed a reduction reaction, which decreased towards zero in a transitional phase lasting around 10 hours to 36 hours. Then the current tended to get a more or less stable value, close to zero or slightly positive, depending on the operating conditions.

When the carbon cloth electrodes were exposed to the synthetic medium 1 in the absence of electric field during Step 2 (#1 Figure 2), the two electrodes CCC and CCA displayed identical chronoamperometry, with an initial phase lasting less than 12 hours before the current stabilised at

zero. Exposure to the inoculum, without applied electric field (#2 Figure 2), significantly impacted the current evolution. The initial phase was longer and the current did not stabilise to zero but displayed a weak oxidation reaction. Nevertheless, in all cases, in the absence of electric field during Step 2, the CCA and CCC electrodes displayed identical electrochemical behaviour.

Seven reactors were submitted to an electric field during Step 2 with varied conditions (2 abiotic controls, 2 standards, 2 without KCl in the medium of the end-compartments and 1 with 2 hours of electric field instead of 3 hours). The CCA and CCC curves showed similar general shape but were no longer superimposed, both in abiotic (#3 Figure 2) and biotic conditions (# 4 and #5 Figure 2). The CCC curve was always shifted above the CCA curve.

In abiotic conditions, the general shape of all chronoamperograms was similar regardless the application (# 3 Figure Figure 2) or not (# 1 Figure 2) of the electric field in Step 2 (except the shift between CCA and CCC). In contrast, the shape of the biotic curves was modified by the application of the electric field. The initial transient period displayed higher reduction current when the electric field was applied (# 4 Figure 2) with respect to the similar experiments performed without applying the electric field (# 3 Figure 2). This increase of the initial reduction current was more marked when KCl was present in the end-compartments (# 4 Figure 2) than when it was absent (#5 Figure 2). The impact of the inoculum on the current recorded during the first hours of polarisation was consequently enhanced by the applied electric field, in a way that depended on the presence or not of KCl in the end-compartments.

In conclusion, during the first 3-days of polarisation the CCC and CCA electrodes showed similar electrochemical behaviours in the absence of electric field. In contrast CCC and CCA were distinguished when an electric field was applied.

3.2.2 7-day polarization (Figure 3 and S.3)

After 7 days of polarization, logically, no current was produced with the abiotic experiments (#1 and #3 Figure 3). In contrast, major differences were noticed between the different kinds of experiments performed in biotic conditions. When no electric field was applied during Step 2 the current density produced by the two carbon cloth electrodes was almost nil after one week of polarization (#2 Figure 3). At the opposite, when the electric field was applied, considerable current densities were produced by both CCA and CCC electrodes. The current density was significantly higher when KCl was present

in the end-compartments: at the end of the chronoamperometries current densities ranged from 4.0 to 11 A.m⁻² in presence of KCl (#4 Figure and Figure S.3) vs. 0.2 to 3.4 A.m⁻² without KCl (#5 Figure 3Figure and Figure S.3). Final current densities were also considerably lower when the electric field was applied only 2 hours instead of 3 hours: CCA and CCC reached only 1 and 3.1 A.m⁻², respectively.

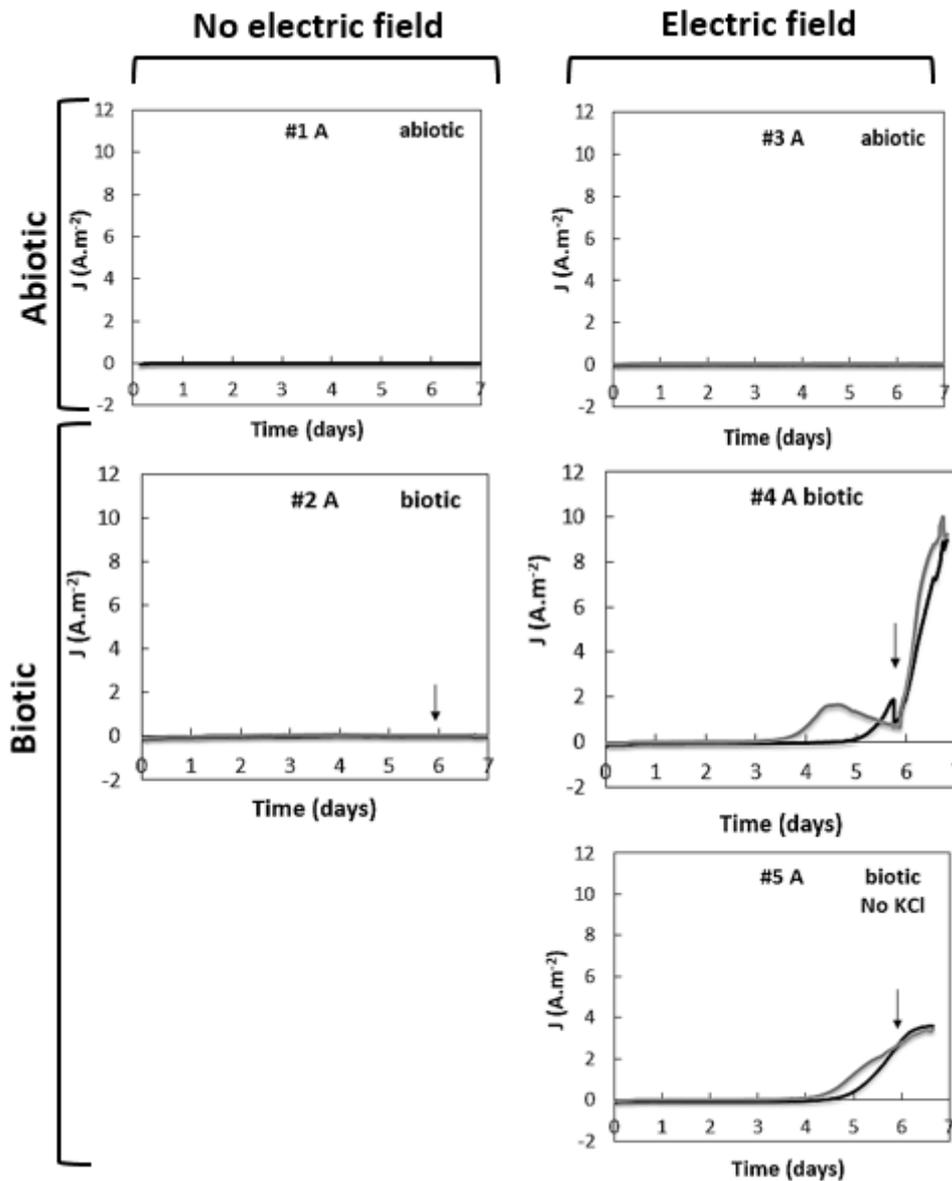


Figure 3: 7-day chronoamperometry (-0.20 V/SCE) of the carbon cloth electrode, which was closer to the anode (CCA, black), and that closer to the cathode (CCC, grey) according to the different experimental conditions recalled in Table 1.

The current always started first on the CCC electrodes. The lead of the CCC curves was more important when KCl was present in the end-compartments (Table 2). CCC electrodes started to produce current around 1.5 to 2 days before CCA when KCl was in the end-compartments and only 0.5 to 0.9 days, without KCl. The lead of CCC was also smaller when the electric field was applied only 2 hours.

In conclusion, applying an electric field during exposure of the electrode to the inoculum considerably enhanced the subsequent formation of the electroactive biofilm. Moreover, electroactivity appeared earlier on the electrodes positioned downstream (CCC) rather than upstream (CCA) of the electric field.

Table 2: Starting of current production (Step 3) defined as the time at which current density reached 0.24 A.m^{-2} (from Figures 3 and S.3). The last column gives the ionic current density (J_{field} , A.m^{-2}) induced by the electric field (Step 2).

	<i>Electric field</i>	<i>KCl in end-compartments</i>	<i>CCA starting (day)</i>	<i>CCC starting (day)</i>	<i>J_{field} (A.m^{-2})</i>
#4	yes	yes	5.11	3.71	56
			6.26	4.28	102
#5	yes	no	4.84	4.36	24
			5.31	4.42	23
	yes only 2 hours	yes	6.89	6.32	87

Cyclic voltammeteries (CV) were recorded at the end of the chronoamperometry (day 7) on the CCC and CCA electrodes experimented in biotic conditions (Figure 4). CVs confirmed that no significant electroactive biofilm was formed when the electric field was not applied during Step 2. In contrast, CVs clearly detected efficient electroactive biofilms when the electric field was applied. The current-potential curves were similar to those already reported for multi-species biofilms obtained from garden compost leachate [13], [17], [18]. CVs confirmed the higher efficiency of the CCC electrode when KCl was present in the end-compartments, while both CCA and CCC gave comparable performance in the absence of KCl.

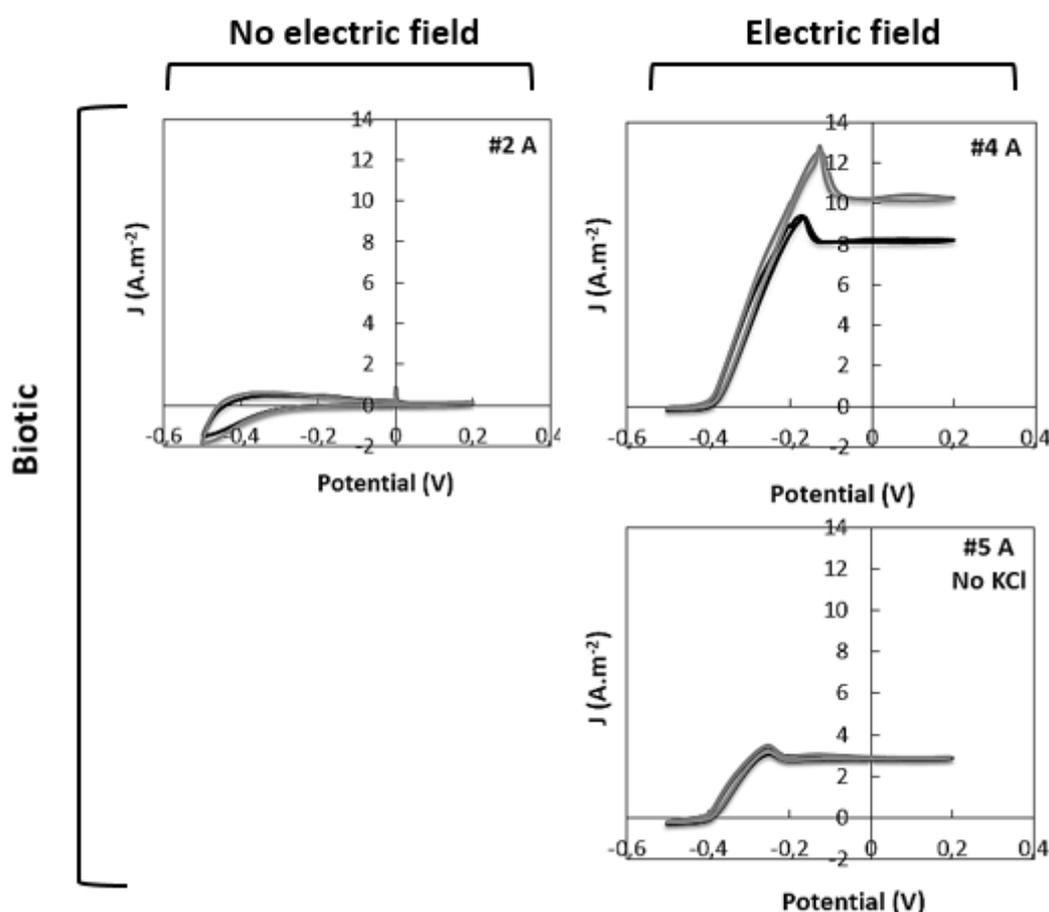


Figure 4: Cyclic voltammograms recorded at the end of the 7-day polarization (1 mV.s⁻¹).

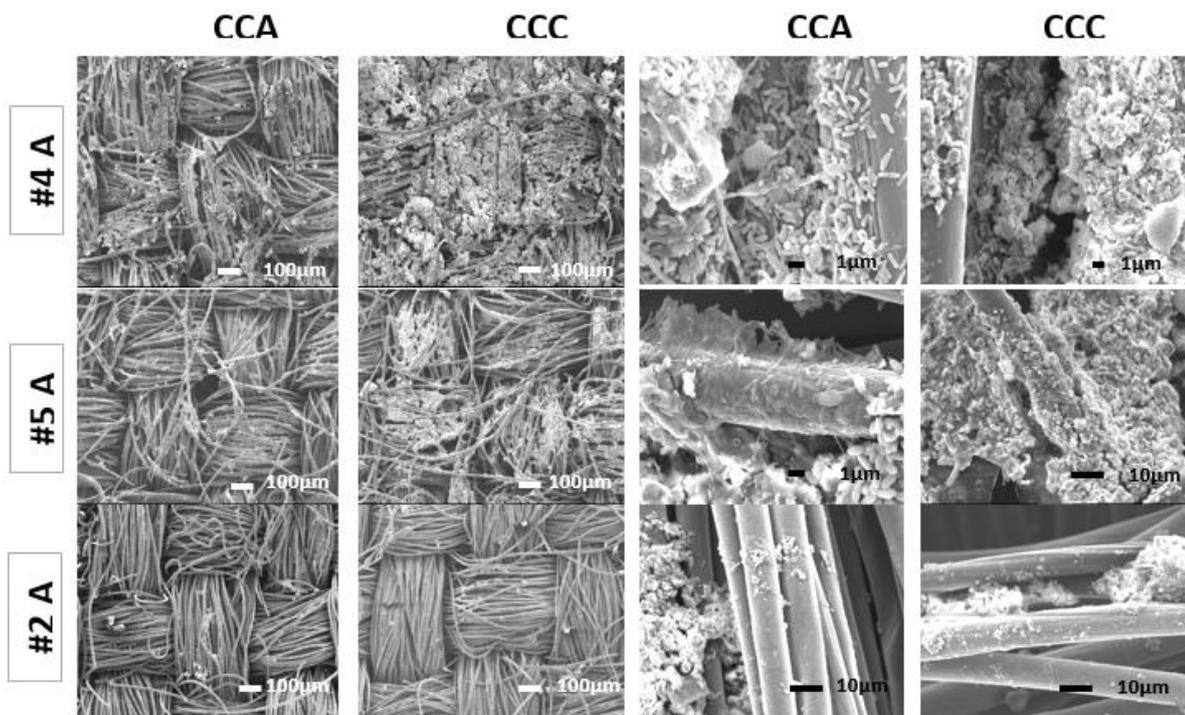
3.3 Biofilm structure

At the end of the 7 days of polarisation, SEM imaging showed no obvious biofilm structure on the electrodes that had not been submitted to electric field during Step 2. Only few traces of salt crystals were observed. The surface of these electrodes appeared pretty clean and it was necessary to use higher magnification to detect precipitated salts and rare bacteria on some fibres (#2 Figure 5). Epifluorescence imaging confirmed that only a few isolated spots were colonised, without obvious difference between CCA and CCC. These observations were consistent with the chronoamperometry curves, which didn't show significant current.

The electrodes that had been submitted to an electric field during Step 2 revealed different SEM images depending on their CCC or CCA position (#4 and #5 Figure 5). At low magnification, CCA electrodes exhibited scattered bacterial colonies, while CCC electrodes showed visible coating, which was more important when KCl was present in the end-compartments (#4 Figure 5). At higher magnification it was possible to see microbial aggregates and a few salt crystals on the CCA electrodes. On the

contrary, CCC electrodes exhibited noticeable salt precipitation so that bacteria were hardly visible. However, fluorescence indicated significant microbial colonisation on the CCC electrodes, showing that CCA and CCC were colonised in similar way. Epifluorescence also revealed more important microbial colonisation when KCl was present in the end-compartments.

In conclusion, the electric field was the cause of significant deposit of salt crystals mainly on the CCC electrodes. The electric field also enhanced the microbial colonisation of the surfaces but, from this standpoint, no significant difference was observed between CCA and CCC electrodes.



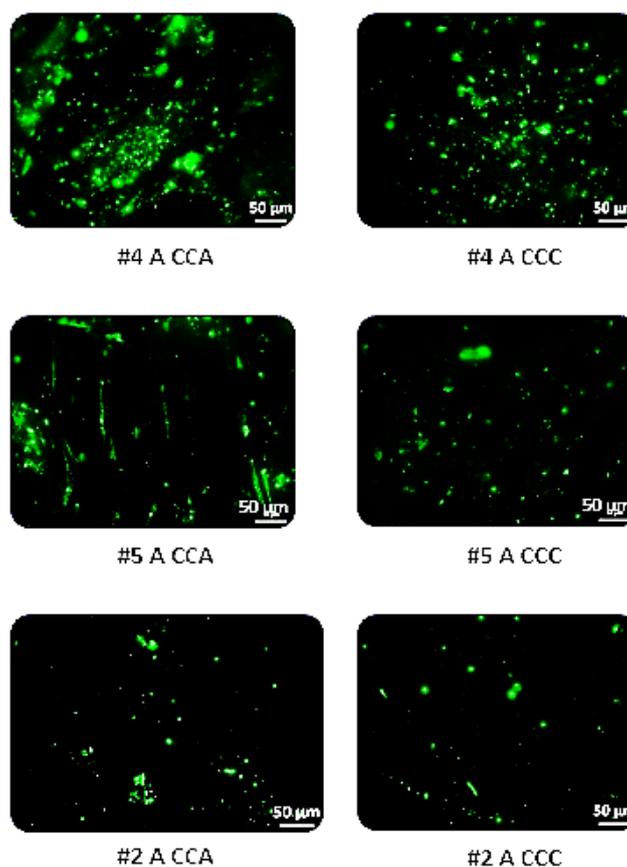


Figure 5 : Epifluorescence and scanning electron microscopy (SEM) images of the carbon cloth electrodes (CCC and CCA) obtained after 7 days of polarisation at -0.20 V/SCE, whose chronoamperograms are reported in Figure 3. Three to four different spots were images for each electrode; the picture presented here was representative of each type of electrode surface.

3.4 Analysis of the microbial communities

At the end of the 7 days of polarisation, the amounts of DNA collected from the electrodes that had not been submitted to the electric field (#2 Table 1) were not sufficient for pyrosequencing, which was consistent with the poor colonisation observed by epifluorescence and the very small current densities recorded. Consequently, only the microbial composition of the CCA and CCC electrodes obtained after exposure to the electric field were analysed and compared to that of the compost leachate used as the inoculum.

At the phylum level, the inoculum was composed of 33% of *Proteobacteria*, 23% of *Firmicutes*, 12% of *Actinobacteria*, 14% of other minor phyla, and 18% of the total reads were not identified. In comparison, the microbial communities of the carbon cloth electrodes (both CCA and CCC) showed clear enrichment in *Proteobacteria* whose relative abundance ranged from 79 to 91%. A few sequences belonged to the phyla *Firmicutes* (7 to 17%). The selective enrichment of *Proteobacteria* has commonly been observed in electroactive biofilms as several known electroactive bacteria (e.g.

Geobacter and *Shewanella*) belong to this phylum. *Firmicutes* are also known to host electroactive species [19].

At the class level (Figure 6.A), the *Proteobacteria* phylum included a majority of *Alpha-proteobacteria* (26%) for the inoculum, while it was mostly divided between *Gamma-* (from 47 to 73%) and *Delta-proteobacteria* (from 3 to 30%) on the electrodes. *Bacilli* emerged as the dominant class of the *Firmicutes* phylum in both the inoculum (19%) and the electrodes (from 4 to 17%). The same classes were present on CCA and CCC electrodes.

At the species level (Figure 6.B), the inoculum showed a wide variety. More than the half (51%) of community was composed by species that had a relative abundance inferior to 2%. A total amount of 7 species were identified and detected at a relative abundance comprise between 2 and 5 %. 24% of the total microbial population was not identified.

The microbial population variety was considerably more restricted on the electrode surfaces. 95% of the total population was identified and more than 80% were covered by only 3 species: *Pseudomonas sp* (*Gamma-proteobacteria*), *Geobacter sulfurreducens* (*Delta-proteobacteria*) and *Bacillus sp* (*Bacilli*). *Geobacter sulfurreducens* is one of the most widely reported electroactive microorganism [20]–[23]. It was not possible to identify the species of *Pseudomonas* and *Bacillus* present on the electrodes surfaces. Nevertheless, many species of *Pseudomonas* have been reported as electroactive, such as *Pseudomonas aeruginosa* [24], [25], *Pseudomonas alcaliphila* [26], [27], and *Pseudomonas fluorescens* [28], [25]. Some bacillus species has also been shown to be electroactive, e.g. *Bacillus subtilis* [25], [29].

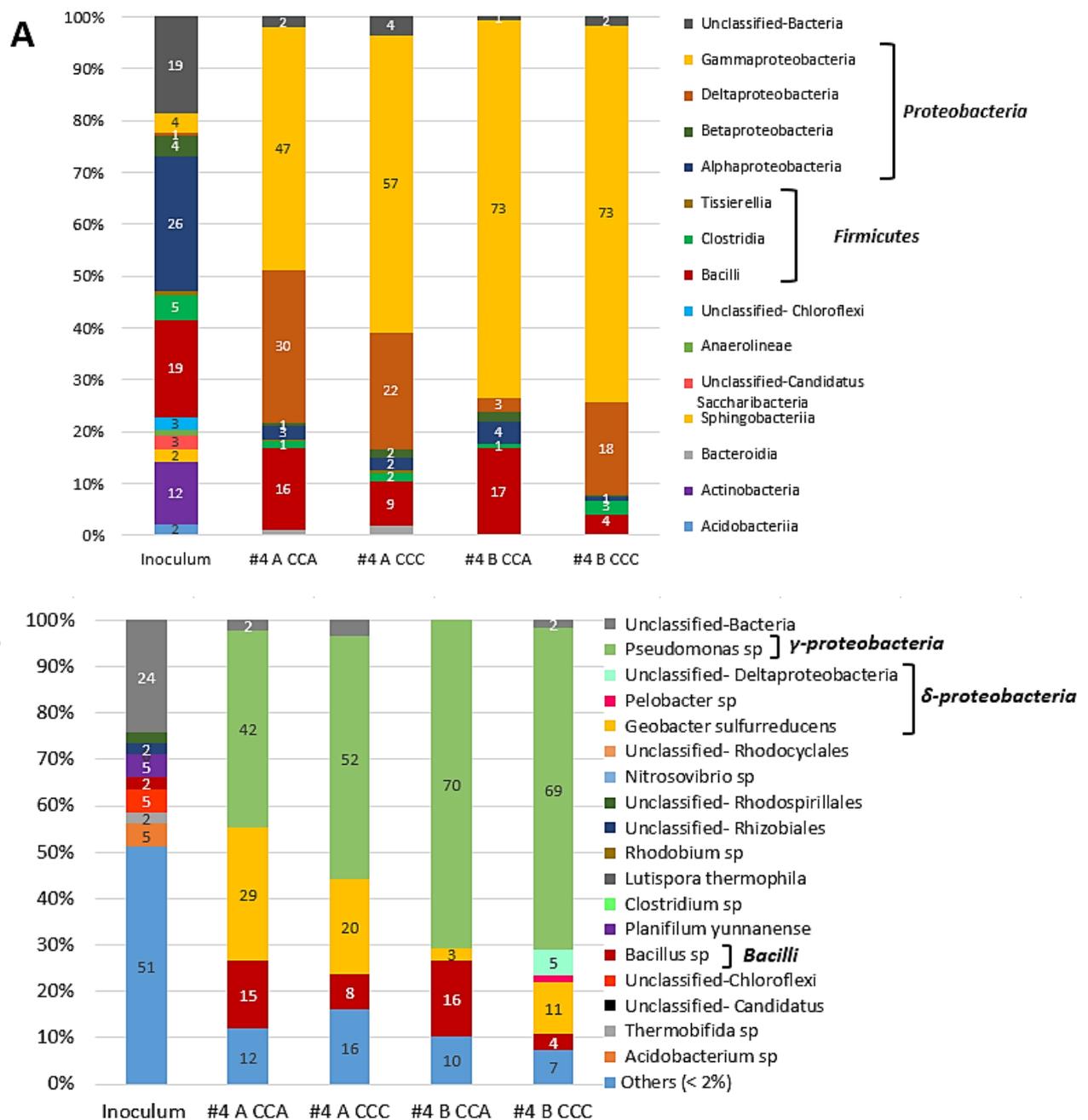


Figure 6: Relative abundances of major A) class and B) species in the inoculum, carbon cloth electrodes close to the cathode (CCC) and those close to the anode (CCA). The four carbon cloth electrodes were prepared with the applied electric field and with KCl in the end-compartments (#4 in Figure 3 and in Figure S.3). Relative abundances of species inferior to 2% were defined as “others”.

The CCA and CCC electrodes from the first reactor (currents reported in Figure 3, #4) showed very close microbial composition and this was in accordance with the similar current densities generated by these two electrodes at day 7 (~ 9 A.m⁻²). The microbial composition of CCA and CCC electrodes from the second reactor (currents reported in Figure S.3, #4) exhibited little difference. The CCA electrode from this reactor produced the lowest current density at day 7 (3.6 A.m⁻²). This low performance might be attributed to the lowest proportion of *Geobacter sulfurreducens* (3 %) with

respect to that of the other electrodes (11 to 29%), which produced higher current densities (9.1 to 10.6 A.m⁻²). Nevertheless, this possible correlation should not be overstated because the three other electrodes produced similar current density with different relative abundance of *Geobacter sulfurreducens* ranging from 11 to 29%. The current produced can consequently not be directly and exhaustively linked to the relative abundance of *Geobacter sulfurreducens* and is more likely the result of the joint involvement of several species.

In conclusion, the electrodes prepared with an applied electric field during exposure to the inoculum (Step 2) produced the highest current densities and showed a stringent microbial selection, since the phylum taxonomic level. Such a selection was common to microbial anodes prepared from multi-species microbial inocula. The same three dominant microbial species made up the microbial communities of both CCA and CCC electrodes, without marked difference in their relative abundance between CCC and CCA electrodes.

3.5 Proposed theoretical explanation

Application of an electric field during the 3 hours of exposure to the inoculum clearly enhanced the subsequent formation of an electroactive biofilm. The electrodes submitted to the electric field produced current after only 3 days of polarisation, which rapidly surpassed 1 A.m⁻². In contrast, when no electric field was applied, current registered during the 7 days of operation was almost nil (Figure 3 and Figure S.3). A great impact of the electric field on the formation of electroactive biofilms was thus evidenced, and decoupled from the effect of polarisation of the electrode on which the biofilm formed.

3.5.1 Common theories for microbial cell motion in an electric field

Surprisingly, the CCC electrodes, i.e. those closest to the cathode that established the electric field, started to produce current first and often produced higher current density than the CCA electrodes closest to the anode (Table 2). Microbial cells are known to bear negative charges on their external membrane. These charges are shielded by cations coming from the solution so that the cells do not display any global charge in solution. Nevertheless, in the presence of an electric field, a part of the cations are ripped off the cell surface so that the cells recover a negative charge. It is consequently generally admitted that microbial cells migrate towards the anode. If it was the case here, the CCA carbon cloth electrodes should have benefited of a higher inflow of microbial cells, while CCC

colonisation would have been hindered. In contrast, the CCC electrodes showed similar microbial colonisation, similar composition of the microbial community and higher electrochemical performance (in terms of response time and maximum current density) than the CCA electrodes. It must be concluded that simple migration of microbial cells under an electric field cannot explain the results observed here.

Many microbial cells are able to generate they own movement thanks to a flagellum that pushes the cell. Weibull et al. have proposed a theory based on the difference in the amount of negative charges borne by the cell body and the flagellum [30]. The ratio of the amount of negative charges on the two parts has been assumed to depend on the microbial species. Depending whether the flagellum or the body bears more negative charges, the cell orients either in the electric field direction or opposite, respectively. Consequently, the flagellum pushes the cell either upstream or downstream of the electric field. However, if such a mechanism was at stake here, it would induce a clear selection of different species on CCA and CCC. This was not the case and this theory can consequently not be used here to explain the performance of the CCC electrodes.

3.5.2 Ionic fluxes created osmolarity gradients at the CCA and CCC electrodes

The effect of the electric field was drastically lower when it was applied for only 2 hours instead of 3 hours, and when KCl was not present in the end-compartments. The ionic current density that was forced through the carbon cloth electrodes during the application of the electric field (J_{field}) was pretty variable from one reactor to the other, and it was mainly dependent on the presence or not of KCl in the end-compartments (Table 2). Without KCl the end-compartments had a lower ionic conductivity so that the ionic flux flowing through the reactor was drastically decreased. The lower impact of the electric field in such condition confirmed that exposure to the inoculum was impacted by the ionic flux flowing through the carbon cloth electrodes.

The ionic fluxes induced by the electric field at the carbon cloth interfaces were approached theoretically by using transport numbers [31]. For each i species, the transport number (t_i) expressed as:

$$t_i = \frac{\lambda_i^0 C_i}{\sum_k \lambda_k^0 C_k} \quad (1)$$

where λ^0 is the molar ionic conductivity at infinite dilution ($\text{m}^2 \cdot \text{S} \cdot \text{mol}^{-1}$) and C is the concentration ($\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}$), gives the ratio of charge that is transported by each i species. The molar flux density of each ion ($\Phi_i \text{ mole} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$) is linked to its transport number as:

$$\Phi_i = \frac{t_i}{z_i} \frac{J_{field}}{F} \quad (2)$$

where z_i is the charge of the species, J_{field} ($\text{A} \cdot \text{m}^{-2}$) is the current density created by the electric field, and F is the Faraday constant ($96\,485 \text{ C} \cdot \text{mole}^{-1}$). The ionic balance sheet can be done by summing the molar flux densities of the cations on the one hand:

$$\Phi^+ = \left(\sum_{cations} \frac{t_i}{z_i} \right) \frac{J_{field}}{F} \quad (3)$$

and of the anions of the other hand:

$$\Phi^- = \left(\sum_{anions} \frac{t_i}{z_i} \right) \frac{J_{field}}{F} \quad (4)$$

in order to assess the ion flux that came to and moved away from the CCA and CCC electrodes.

The carbon cloth electrodes were positioned at the interface between medium 1 (with or without KCl) contained in the end-compartments and compost leachate contained in the central compartment (Figure 7). The transport numbers were calculated on each side of the carbon cloth electrodes (Table 3). For sake of simplicity, for the compost leachate, only the added ions (KCl 60 mM, sodium acetate 20 mM) were taken into account. Ions that were naturally present in the compost leachate were assumed to be at small concentrations and not to disturb the global ion flux balance. On each side of the carbon cloth electrodes the cationic and anionic molar flux densities are reported in Figure 7.A.

Table 3: Ion concentrations (C_i , $\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}$), charge, molar ionic conductivity (λ_i^0 , $10^{-4} \text{ m}^2 \cdot \text{S} \cdot \text{mol}^{-1}$, values from [31]) and transport numbers (t_i) in the inoculum solution and the medium 1 with or without KCl.

	K^+	Na^+	Total cations	Cl^-	CH_3COO^-	HPO_4^{2-}	H_2PO_4^-	Total anions
z_i	1	1		1	1	2	1	
λ_i^0 ($10^{-4} \text{ m}^2 \cdot \text{S} \cdot \text{mol}^{-1}$)	73.5	50.1		76.3	40.9	114	36	
Inoculum (central compartment)								
C_i ($\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}$)	60	20		60	20	0	0	
t_i	0.41	0.09	0.50	0.42	0.08	0	0	0.50
t_i/z_i	0.41	0.09	0.50	0.42	0.08	0	0	0.50
Medium 1 with KCl (end-compartment)								
C_i ($\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}$)	86	102		60	20	41	26	
t_i	0.28	0.23	0.51	0.20	0.04	0.21	0.04	0.49
t_i/z_i	0.28	0.23	0.51	0.20	0.04	0.11	0.04	0.39

	Medium 1 without KCl (end-compartment)							
C_i (mol.m ⁻³)	26	102	0	20	41	26		
t_i	0.14	0.38	0.52	0	0.06	0.35	0.07	0.48
$t_i z_i$	0.14	0.38	0.52	0	0.06	0.17	0.07	0.30

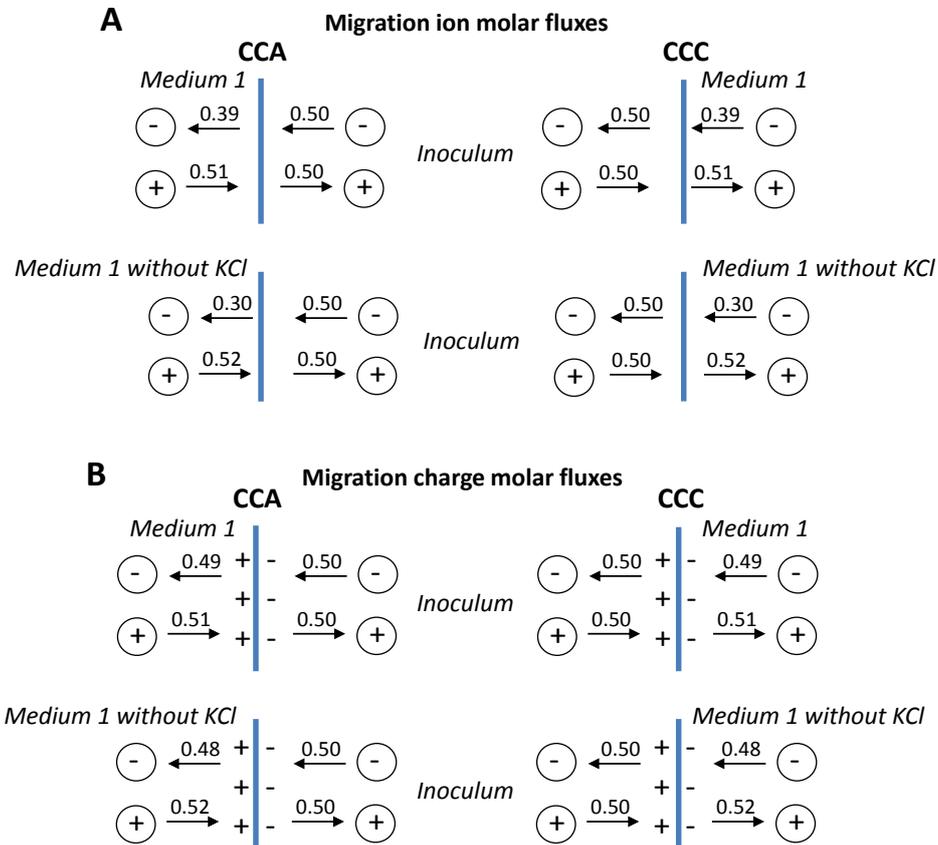


Figure 7: Cationic and anionic migrations fluxes at the CCA and CCC interfaces due to electric field imposed during Step 2. The values reported in the schemes must be multiplied by J_{field}/F to get the molar flux densities in mol.s⁻¹.m⁻². A) Ion molar fluxes (Equation 3 and 4); B) charge molar flux densities (Equations 5 and 6).

In the presence of KCl in the end-compartments, migration brings to CCA a gain $0.12 J_{field}/F$ mole.s⁻¹.m⁻² ($0.11 J_{field}/F$ mole.s⁻¹.m⁻² anions and $0.01 J_{field}/F$ mole.s⁻¹.m⁻² cations). Conversely, migration depleted CCC of the same ion fluxes. The same balance sheet can be commented in another way, on the basis of 100 electrons flowing through the electric circuit. In this case, migration brings a gain of 12 ions to CCA, while CCC undergoes a loss of 12 ions. The situation was similar in the absence of KCl in the end-compartments, but the flux gained by CCA and lost by CCC was of $0.22 J_{field}/F$ (22 ions for 100 electrons flowing through the electrical circuit).

Migration due to the applied electric field provoked an unbalance in the ionic fluxes at the electrode. Osmolarity increased at CCA while it decreased at CCC. These interfacial gradients of osmolarity at the carbon cloth electrodes were balanced by diffusion, which mitigates the concentration gradients,

and by osmosis. Osmosis drove water molecules towards CCA, where osmolarity was higher than in the bulk and, in contrast, moved water molecules away from CCC, where osmolarity was lower. It should be noted that the transport of microbial cells by electro-osmosis has been reported [32], but this phenomenon cannot explain the enhanced microbial colonisation of CCC that was observed here, because the osmosis flux moved away from the CCC electrode (Figure 7.A).

In conclusion, electroactive biofilm formation was enhanced by the electric field applied during electrode exposure to the inoculum. Several phenomena can be used to explain this effect on the CCA electrodes, such as the conventional migration of microbial cells because of their negative surface charge. Osmosis towards CCA can also contribute to explain enhancement by the electric field. In contrast, these phenomena cannot explain the enhancing effect on CCC electrodes, i.e. the electrodes close to the cathode. The effect of the electric field on these electrodes can only be explained by the capacity of microbial cells to detect the interfacial osmolarity gradients created by the electric field (Figure 8).

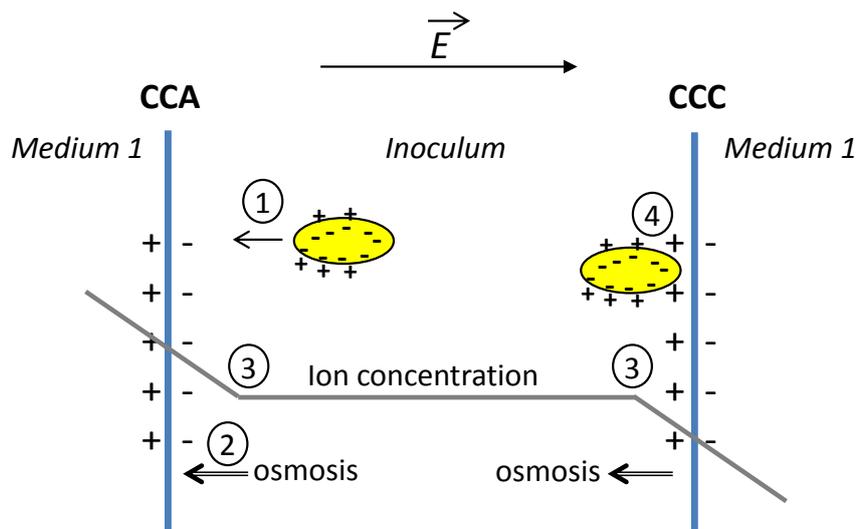


Figure 8: Scheme of theoretical interpretation. Microbial cells can be driven to CCA by migration (1) due to their negative surface charge and by the osmosis (2) induced by the interfacial osmolarity gradient. CCC formed electroactive biofilms in shorter time because microbial cells were able to detect the interfacial osmolarity gradient (3) and because the positive charge surface at the electrode side facing the inoculum was more appropriate for cell anchorage (4). According to the similar biofilm coverages and microbial populations on CCA and CCC it can be speculated that the detection of osmolarity gradient was the main motor for cell approach for both electrodes.

The capacity of microbial cells to detect osmolarity fields and the impact of osmolarity on biofilm formation have already been reported [33]–[35]. It was speculated here that microbial cells used this capacity to colonise the CCC electrodes. Moreover, since both CCC and CCA electrodes displayed similar microbial colonisation and similar microbial communities, this phenomenon was likely also the main motor of colonisation of the CCA electrodes.

3.5.3 Charge surface distribution

Finally, the ionic balance at the CCA and CCC interfaces can also be made in terms of charge fluxes, rather than molar fluxes (Figure 7.B). In this case the flux density of positive charges is:

$$\Phi^+ = (\sum_{cations} t_i) \frac{J_{field}}{F} \quad (5)$$

and of negative charges:

$$\Phi^- = (\sum_{anions} t_i) \frac{J_{field}}{F} \quad (6)$$

At the CCC electrode, in the presence of KCl in the end-compartment, a flux density of $0.49 J_{field} / F$ negative charges came from the end-compartment, while $0.51 J_{field} / F$ left the interface to the central-compartment. Symmetrically, $0.50 J_{field} / F$ positive charges came from the central-compartment, while $0.51 J_{field} / F$ left the interface to the end-compartment. The interface tended thus to be positively charged on the side that faced the inoculum and negatively on the other side. The global charge of the interface remained equal to zero, but the ions fluxes created a charge dissymmetry between the two sides of the CCC electrode, by promoting a positive surface charge on the face exposed to the inoculum. Symmetrically, the similar dissymmetry promoted a negative surface charge on the side of the CCA electrode exposed to the inoculum.

It has been reported that positively-charged surfaces are appropriate to host microbial cells and favour microbial adhesion and biofilm formation [36]. Here the ion fluxes tended to induce a positive surface charge on the side of the CCC electrodes exposed to the inoculum. This may be an additional explanation of the surprising capacity of the CCC electrodes to establish electroactive biofilms faster than the CCA electrodes. Nevertheless, the scope of this last remark must be qualified. Actually, carbon cloth electrodes are pieces of woven cloth and are therefore greatly permeable at the ion scale. It would thus be wrong to imagine a strict sharing of surface charges between the two sides. It is only claimed here that the migration fluxes tended to promote a surface charge dissymmetry. Moreover, it is important to recall that this surface charge dissymmetry had only a short-range action, likely involved only in the cell adhesion step and not on cell motion toward the surface.

3.5.4 Salt deposits

Epifluorescent imaging showed that both CCA and CCC electrodes displayed similar microbial colonisation coverages, but SEM imaging clearly showed very different biofilm structures with an

important deposit of salt crystal on the CCC electrodes only. The biofilm formed at the CCC surface seemed to be a mixture of exopolymeric substances and salt precipitation. Such a mixture has already been observed elsewhere at the surface of an activated carbon air-cathode of microbial fuel cells [37], [38]. In the case of air-cathode the important salt precipitation has been attributed to three different phenomena: i) evaporation that occurred after months of operation, ii) local alkalinisation due to the oxygen reduction reaction, iii) an unidentified effect of the electric field. An et al. have recently demonstrated that salt precipitation was due to the electric field in great extent rather than to the other two phenomena [38].

Here, the pH may be locally modified according the ratio of the HPO_4^{2-} to H_2PO_4^- ion fluxes that came from the end-compartment to the CCC electrode. According to the transport numbers from Table 3, the ratio the HPO_4^{2-} molar flux on the H_2PO_4^- flux was equal to 2.7 (Table 3). This ratio leads to a pH value equal to:

$$pH = pKa + \log \frac{[\text{HPO}_4^{2-}]}{[\text{H}_2\text{PO}_4^-]} \quad (7)$$

With $pKa = 7.2$, the local pH would only increase from 7.0 to 7.4. This increase was not sufficient to explain the so massive precipitation of salts on CCC electrodes.

The electric field was imposed only during the 3 hours of exposure to the inoculum (Step 2). It consequently only affected cell approach towards the surface and likely cell adhesion, while salt precipitation occurred on the CCC electrodes during the subsequent biofilm formation. It must be concluded that the electric field impacted the CCC surface in a way that modified the subsequent biofilm formation during the Step 3. Actually, modification of the electrochemical characteristics of the electrode was clearly detected by the first 3 days of chronoamperometry (Figure 2), with clear and reproducible distinction between the CCA and CCC chronoamperograms due to the electric field. This phenomenon occurred at similar level in abiotic and biotic conditions but impacted the first hours of polarisation in biotic conditions. The accurate way by which the electric field impacted the subsequent biofilm formation remains an open and exciting question, which deserves further basic research. It can only be claimed here that the way of action was most likely due to the modification of the electrochemical state of the electrode surface, which depended on the CCA or CCC position.

3.5.5 Future prospects

The first insights reported here, looking for possible involvement of electrotaxis in the formation of multi-species electroactive biofilms, provided surprising results that should offer the research community a new way to explore the formation of electroactive biofilms. These very first results are not sufficient to suggest practical guidelines to promote or delayed the formation of electroactive biofilms, but they open up new research avenues in this direction. Local osmolarity gradient at the material surface should be considered as a key parameter at stake in the recognition of surface by microbial cells. As this phenomenon addresses the very first phase of biofilm formation, it may be a powerful cantilever to drive the biofilm to a wished state.

Considering the ubiquitous presence of endogenous electric fields in living organisms [4] and the huge amount of interfaces that compose them, the results described here may also impact the biomedical and physiological research domains. Local endogenous electric fields should unavoidably create interfacial osmolarity gradient at the numerous interfaces present in living cells. The results reported here strongly suggest that hosted microorganisms may be able to use the osmolarity gradients to detect interfaces and form biofilms on them. The extraordinary capacity of microorganisms to detect and infect the surface of prostheses, so fast after implanting, is an obvious example we should think to. Moreover, the increasing number of recent discoveries on the presence of electroactive microorganisms in living organisms [39], [40] support the relevance of using electroactivity as an investigation tool for possible applications in biomedical and physiological domains.

4. CONCLUSION

An electric field was applied to electrodes let at open circuit and exposed to a multi-species inoculum. Then, the electrodes were polarized in synthetic medium in the absence of the inoculum. It was thus evidenced that the electric field enhanced the formation of electroactive biofilms. The electric field did not impact the biofilm formation only by conventional cell migration, but also through the combination of different indirect actions due to the osmolarity gradient created at the interface. The interfacial osmolarity gradient induced local osmosis. It also likely modified the charge surface distribution in a way that affects surface adhesion of electroactive cells (Figure 8). Analysing the possible phenomena that may explain the impact of the electric field on biofilm formation led to consider the capacity of microbial cells to detect interfacial osmolarity gradient as the main motor of surface colonisation. This

hypothesis should now to be confirmed or qualified by checking different operating conditions, different types of electrode materials, and different inocula including pure and mixed cultures, in order to define in what extent interfacial osmolarity gradient may help in controlling electroactive biofilms and their effects.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the French state, managed by the Agence Nationale de la Recherche (ANR), within the framework of the “Bioelec” project (ANR-13-BIME-006) and the “Koropokkuru” project (ANR-14-CE05-0004).

REFERENCE

- An, Jingkun, Nan Li, Lili Wan, Lean Zhou, Qing Du, Tian Li, et Xin Wang. 2017. « Electric Field Induced Salt Precipitation into Activated Carbon Air-Cathode Causes Power Decay in Microbial Fuel Cells ». *Water Research* 123: 369-77. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.06.087>.
- Bond, Daniel R., et Derek R. Lovley. 2003. « Electricity Production by *Geobacter Sulfurreducens* Attached to Electrodes ». *Applied and Environmental Microbiology* 69 (3): 1548-55. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.3.1548-1555.2003>.
- Cercado, B., N. Byrne, M. Bertrand, D. Pocaznoi, M. Rimboud, W. Achouak, et A. Bergel. 2013. « Garden Compost Inoculum Leads to Microbial Bioanodes with Potential-Independent Characteristics. » *Bioresource Technology* 134 (avril): 276-84. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.123>.
- Chen, Shanshan, Amelia-Elena Rotaru, Pravin Malla Shrestha, Nikhil S. Malvankar, Fanghua Liu, Wei Fan, Kelly P. Nevin, et Derek R. Lovley. 2014. « Promoting Interspecies Electron Transfer with Biochar ». *Scientific Reports* 4 (mai): 5019. <https://doi.org/10.1038/srep05019>.
- Cortese, Barbara, Ilaria Elena Palamà, Stefania D'Amone, et Giuseppe Gigli. 2014. « Influence of Electrotaxis on Cell Behaviour ». *Integrative Biology* 6 (9): 817-30. <https://doi.org/10.1039/C4IB00142G>.
- Cournet, Amandine, Marie-Line Délia, Alain Bergel, Christine Roques, et Mathieu Bergé. 2010. « Electrochemical reduction of oxygen catalyzed by a wide range of bacteria including Gram-positive ». *Electrochemistry Communications* 12 (4): 505-8. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2010.01.026>.
- Ericsson, Aaron Conrad, Daniel John Davis, Craig Lawrence Franklin, et Catherine Elizabeth Hagan. 2015. « Exoelectrogenic capacity of host microbiota predicts lymphocyte recruitment to the gut ». *Physiological Genomics* 47 (7): 243-52. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00010.2015>.
- Funk, Richard H. W. 2015. « Endogenous Electric Fields as Guiding Cue for Cell Migration ». *Frontiers in Physiology* 6. <https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00143>.

- Guo, Kun, Stefano Freguia, Paul G. Dennis, Xin Chen, Bogdan C. Donose, Jurg Keller, J. Justin Gooding, et Korneel Rabaey. 2013. « Effects of Surface Charge and Hydrophobicity on Anodic Biofilm Formation, Community Composition, and Current Generation in Bioelectrochemical Systems ». *Environmental Science & Technology* 47 (13): 7563-70. <https://doi.org/10.1021/es400901u>.
- Haeger, Anna, Katarina Wolf, Mirjam M. Zegers, et Peter Friedl. 2015. « Collective Cell Migration: Guidance Principles and Hierarchies ». *Trends in Cell Biology* 25 (9): 556-66. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.06.003>.
- Jiang, Yun-Bin, Wen-Hui Zhong, Cheng Han, et Huan Deng. 2016. « Characterization of Electricity Generated by Soil in Microbial Fuel Cells and the Isolation of Soil Source Exoelectrogenic Bacteria ». *Frontiers in Microbiology* 7: 1776. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01776>.
- Kato, Souichiro, Kazuhito Hashimoto, et Kazuya Watanabe. 2012. « Methanogenesis Facilitated by Electric Syntrophy via (Semi)Conductive Iron-Oxide Minerals ». *Environmental Microbiology* 14 (7): 1646-54. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02611.x>.
- Koch, Christin, et Falk Harnisch. 2016. « Is There a Specific Ecological Niche for Electroactive Microorganisms? » *ChemElectroChem* 3 (9): 1282-95. <https://doi.org/10.1002/celec.201600079>.
- Kumar, Amit, Leo Huan-Hsuan Hsu, Paul Kavanagh, Frédéric Barrière, Piet N. L. Lens, Laure Lapinonnière, John H. Lienhard V, Uwe Schröder, Xiaocheng Jiang, et Dónal Leech. 2017. « The Ins and Outs of Microorganism–electrode Electron Transfer Reactions ». *Nature Reviews Chemistry* 1 (3): 0024. <https://doi.org/10.1038/s41570-017-0024>.
- Levin, Michael. 2014. « Molecular bioelectricity: how endogenous voltage potentials control cell behavior and instruct pattern regulation in vivo ». *Molecular Biology of the Cell* 25 (24): 3835-50. <https://doi.org/10.1091/mbc.E13-12-0708>.
- Li, Jing, et Francis Lin. 2011. « Microfluidic devices for studying chemotaxis and electrotaxis ». *Trends in Cell Biology* 21 (8): 489-97. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.05.002>.
- Light, Samuel H., Lin Su, Rafael Rivera-Lugo, Jose A. Cornejo, Alexander Louie, Anthony T. Iavarone, Caroline M. Ajo-Franklin, et Daniel A. Portnoy. 2018. « A Flavin-Based Extracellular Electron Transfer Mechanism in Diverse Gram-Positive Bacteria ». *Nature*, septembre, 1. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0498-z>.
- Lovley, Derek R. 2012. « Electromicrobiology ». *Annual Review of Microbiology* 66 (1): 391-409. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092611-150104>.
- Mehanna, Maha, Regine Basseguy, Marie-Line Delia, et Alain Bergel. 2009. « Role of direct microbial electron transfer in corrosion of steels ». *Electrochemistry Communications* 11 (3): 568-71. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2008.12.019>.
- Nimje, Vanita Roshan, Chien-Cheng Chen, Hau-Ren Chen, Chien-Yen Chen, Min-Jen Tseng, Kai-Chien Cheng, Ruey-Chyuan Shih, et Young-Fo Chang. 2012. « A Single-Chamber Microbial Fuel Cell without an Air Cathode ». *International Journal of Molecular Sciences* 13 (3): 3933-48. <https://doi.org/10.3390/ijms13033933>.
- Oliot, Manon, Poehere Chong, Benjamin Erable, et Alain Bergel. 2017. « Influence of the electrode size on microbial anode performance ». *Chemical Engineering Journal* 327 (novembre): 218-27. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.06.044>.
- Oliot, Manon, Benjamin Erable, Marie-Line De Solan, et Alain Bergel. 2017. « Increasing the temperature is a relevant strategy to form microbial anodes intended to work at room temperature ». *Electrochimica Acta* 258 (décembre): 134-42. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2017.10.110>.

- Oliot, Manon, Sylvain Galier, Hélène Roux de Balmann, et Alain Bergel. 2016. « Ion transport in microbial fuel cells: Key roles, theory and critical review ». *Applied Energy* 183 (décembre): 1682-1704. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2016.09.043>.
- Oram, Joseph, et Lars J. C. Jeuken. 2017. « *Shewanella oneidensis* MR-1 electron acceptor taxis and the perception of electrodes poised at oxidative potentials ». *Current Opinion in Electrochemistry* 5 (1): 99-105. <https://doi.org/10.1016/j.coelec.2017.07.013>.
- Park, J. H., H. J. Kang, K. H. Park, et H. D. Park. 2018. « Direct Interspecies Electron Transfer via Conductive Materials: A Perspective for Anaerobic Digestion Applications. » *Bioresource Technology* 254 (avril): 300-311. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.095>.
- Pocaznoi, Diana, Benjamin Erable, Luc Etcheverry, Marie-Line Delia, et Alain Bergel. 2012. « Forming Microbial Anodes under Delayed Polarisation Modifies the Electron Transfer Network and Decreases the Polarisation Time Required ». *Bioresource Technology* 114 (juin): 334-41. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.03.042>.
- Prigent-Combaret, C., E. Brombacher, O. Vidal, A. Ambert, P. Lejeune, P. Landini, et C. Dorel. 2001. « Complex Regulatory Network Controls Initial Adhesion and Biofilm Formation in *Escherichia Coli* via Regulation of the *CsgD* Gene ». *Journal of Bacteriology* 183 (24): 7213-23. <https://doi.org/10.1128/JB.183.24.7213-7223.2001>.
- Qin, Jinyi, Xiaohui Sun, Yang Liu, Tom Berthold, Hauke Harms, et Lukas Y. Wick. 2015. « Electrokinetic Control of Bacterial Deposition and Transport ». *Environmental Science & Technology* 49 (9): 5663-71. <https://doi.org/10.1021/es506245y>.
- Rabaey, Korneel, Nico Boon, Monica Höfte, et Willy Verstraete. 2005. « Microbial Phenazine Production Enhances Electron Transfer in Biofuel Cells ». *Environmental Science & Technology* 39 (9): 3401-8. <https://doi.org/10.1021/es048563o>.
- Reeser, Ryan J., Robert T. Medler, Stephen J. Billington, B. Helen Jost, et Lynn A. Joens. 2007. « Characterization of *Campylobacter* *Jejuni* Biofilms under Defined Growth Conditions ». *Appl. Environ. Microbiol.* 73 (6): 1908-13. <https://doi.org/10.1128/AEM.00740-06>.
- Rinaudi, Luciana, Nancy A. Fujishige, Ann M. Hirsch, Erika Banchio, Angeles Zorreguieta, et Walter Giordano. 2006. « Effects of nutritional and environmental conditions on *Sinorhizobium meliloti* biofilm formation ». *Research in Microbiology* 157 (9): 867-75. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2006.06.002>.
- Steidl, Rebecca J., Sanela Lampa-Pastirk, et Gemma Reguera. 2016. « Mechanistic Stratification in Electroactive Biofilms of *Geobacter Sulfurreducens* Mediated by Pilus Nanowires ». *Nature Communications* 7 (août): 12217. <https://doi.org/10.1038/ncomms12217>.
- Su, Wentao, Lixia Zhang, Daping Li, Guoqiang Zhan, Junwei Qian, et Yong Tao. 2012. « Dissimilatory Nitrate Reduction by *Pseudomonas Alcaliphila* with an Electrode as the Sole Electron Donor ». *Biotechnology and Bioengineering* 109 (11): 2904-10. <https://doi.org/10.1002/bit.24554>.
- Torsvik, V., R. Sørheim, et J. Goksøyr. 1996. « Total Bacterial Diversity in Soil and Sediment Communities—A Review ». *Journal of Industrial Microbiology* 17 (3): 170-78. <https://doi.org/10.1007/BF01574690>.
- Wang, Heming, et Zhiyong Jason Ren. 2013. « A comprehensive review of microbial electrochemical systems as a platform technology ». *Biotechnology Advances* 31 (8): 1796-1807. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.10.001>.
- Weibull Claes. 1950. « Electrophoretic and Titrimetric Measurements on Bacterial Flagella. » *Acta Chemica Scandinavica* 4: 260-67. <https://doi.org/10.3891/acta.chem.scand.04-0260>.
- Wrighton, Kelly C., Peter Agbo, Falk Warnecke, Karrie A. Weber, Eoin L. Brodie, Todd Z. DeSantis, Philip Hugenholtz, Gary L. Andersen, et John D. Coates. 2008. « A Novel Ecological Role of

- the Firmicutes Identified in Thermophilic Microbial Fuel Cells ». *The ISME Journal* 2 (11): 1146-56. <https://doi.org/10.1038/ismej.2008.48>.
- Yoshida, N., K. Yano, T. Morita, S. J. McNiven, H. Nakamura, et I. Karube. 2000. « A Mediator-Type Biosensor as a New Approach to Biochemical Oxygen Demand Estimation ». *Analyst* 125 (12): 2280-84. <https://doi.org/10.1039/B005995L>.
- Zhang, T., L. Zhang, W. Su, P. Gao, D. Li, X. He, et Y. Zhang. 2011. « The Direct Electrocatalysis of Phenazine-1-Carboxylic Acid Excreted by *Pseudomonas Alcaliphila* under Alkaline Condition in Microbial Fuel Cells. » *Bioresource Technology* 102 (14): 7099-7102. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.04.093>.
- Zhang, Xiaoyuan, Deepak Pant, Fang Zhang, Jia Liu, Weihua He, et Bruce E. Logan. 2014. « Long-Term Performance of Chemically and Physically Modified Activated Carbons in Air Cathodes of Microbial Fuel Cells ». *ChemElectroChem* 1 (11): 1859-66. <https://doi.org/10.1002/celec.201402123>.

3.2 Résultats complémentaires non présentés dans l'article

Des expériences ont été reproduites selon les conditions standards en modifiant la durée d'application du champ électrique à 2 heures. Deux réacteurs ont été mis en œuvre : E20 sans champ électrique et E21 avec champ électrique. La Figure 7 présente les chronoampérogrammes analysés au cours des 3 premiers jours et des 7 jours de polarisation à -0.2 V/ECS.

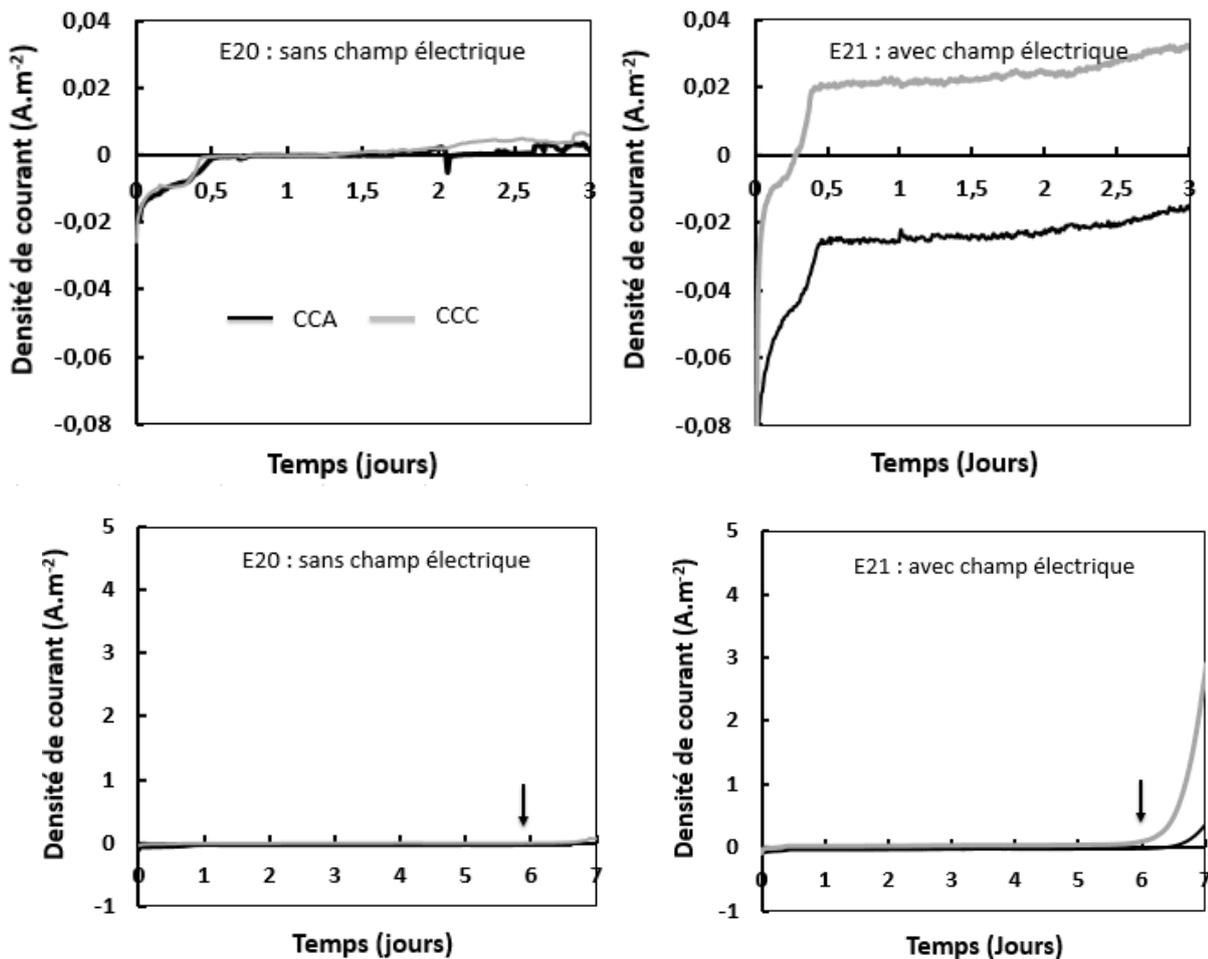


Figure 7 : Chronoampérométrie enregistrées pour deux réacteurs triple compartiments (E20 : 2h sans DDP appliquée et E21 : 2h de DDP de 8 V) dont le compartiment central est inoculé avec du lixivat de terreau préparé à partir du SAC 3. Les deux électrodes de travail CCA (en noir) et CCC (en gris) de 3.14 cm² sont polarisées à -0.2 V/ECS. Les chronoampérogrammes sont analysés après 3 et 7 jours de polarisation. Les flèches indiquent les ajouts d'acétate (20 mM).

Les observations décrites dans l'article sont confirmées :

- En absence du champ électrique (E20), les courbes de CCA et CCC se superposent lors des 3 premiers jours avec une phase transitoire qui dure près de 12 heures. Durant les 7 jours de polarisation les densités de courant produites restent proches de 0 A.m⁻².
- En présence du champ électrique (E21), dès les premiers instants de polarisation les courbes de CCA et CCC ne se superposent plus et la courbe de CCC est au-dessus de celle de CCA. Sur les 3 premiers jours, les courbes ont une allure similaire à celles obtenues avec les manipulations sans KCl (Figure 3 de l'article).

En diminuant la durée du champ électrique de 3 à 2 heures, le démarrage de la production de courant est retardé de 58 % (jour 4 pour 3 h et jour 6.3 pour 2 h) sur CCC et de 21 % (jour 5.7 pour 3 h et jour 6.9 pour 2 h) sur CCA. En outre, les densités de courant sont diminuées d'un facteur 4 (~ 9.5 A.m⁻² pour 3 h et ~2.4 A.m⁻² pour 2 h) sur CCC tandis qu'elles restent proches de 0 A.m⁻² sur CCA. Ces résultats indiqueraient que l'application du champ électrique pendant 2 heures est beaucoup moins efficace que l'application pendant 3 heures pour favoriser la formation subséquente d'un biofilm EA, confirmant ainsi l'impact crucial du champ électrique dans le processus de colonisation de la surface des électrodes. Toutefois, des expériences supplémentaires sont nécessaires afin de vérifier (ou non) ces constatations. En effet, le SAC 3 de terreau ayant été totalement consommé il ne nous a pas été possible de produire d'autres résultats.

4 RESULTATS OBTENUS AVEC LE SAC DE TERREAU SAC 4

Des expériences ont été reproduites selon les conditions standards en modifiant cette fois le sac de terreau utilisé pour préparer l'inoculum lixiviat de terreau. Le SAC 4 fraîchement ouvert a alors été utilisé. Quatre réacteurs ont été mis en œuvre : E22 / E23 sans champ électrique et E24 / E25 avec champ électrique.

4.1 Chronoampérométrie

Les Figure 8 et Figure 9 présentent respectivement les chronoampérogrammes enregistrés au cours des 3 premiers jours et des 7 jours de polarisation à -0.2 V /ECS .

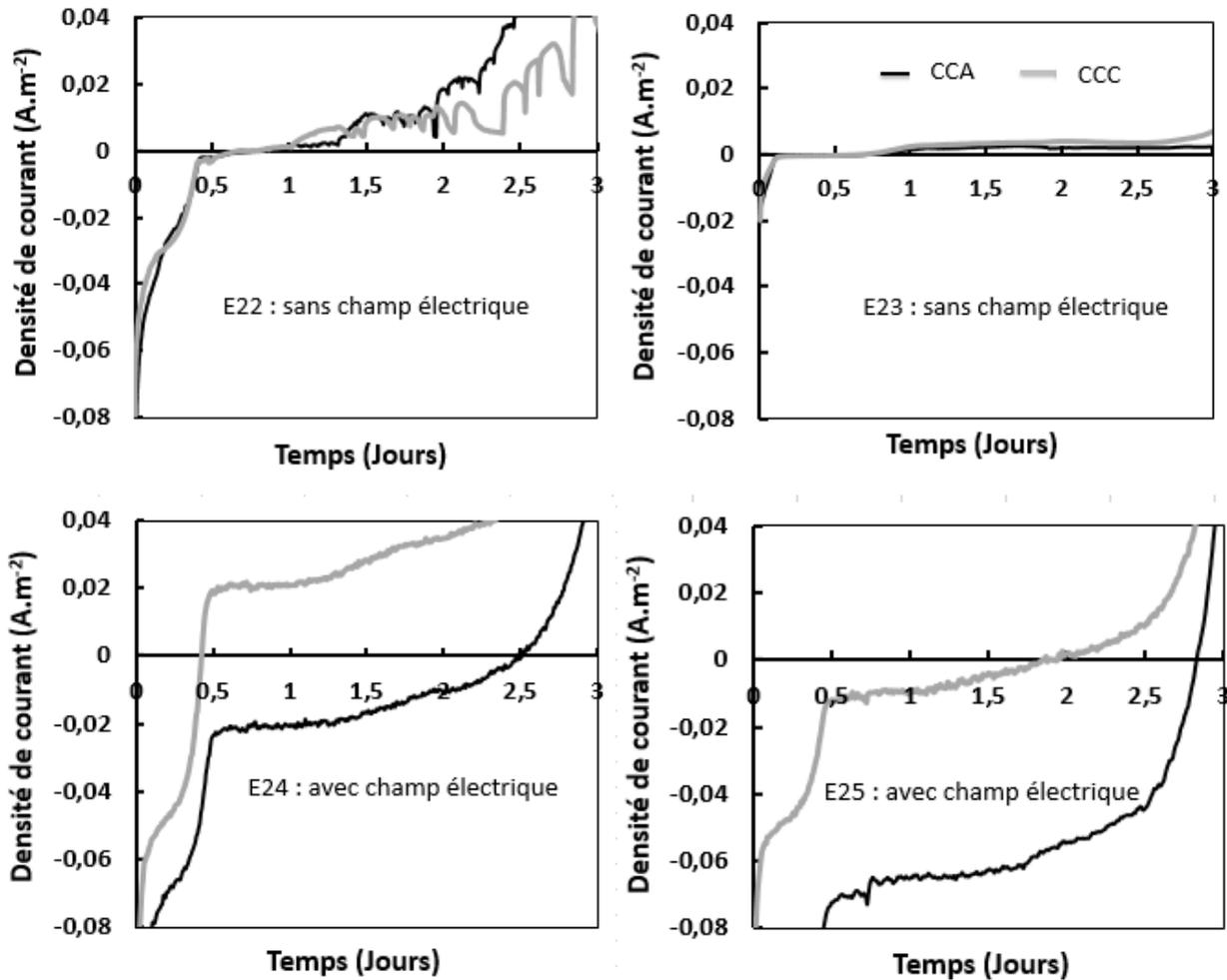


Figure 8 : Chronoampérométrie enregistrées pour quatre réacteurs triple compartiments (E22 / E23 : 3 h sans champ électrique et E24 / E25 : 3 h avec champ électrique) dont le compartiment central est inoculé avec du lixivat de terreau préparé à partir du SAC 4. Les deux électrodes de travail CCA (en noir) et CCC (en gris) de 3.14 cm^2 sont polarisées à -0.2 V/ECS .

Les chronoampérogrammes présentent des allures identiques à celles qui a été précédemment obtenues avec le SAC 3 (Figure 2 de l'article, section 3.1), avec et sans champ électrique. Toutefois, un début de production de courant est observé dans 3 cas sur 4 (E22 au jour 2, et E24 / E25 aux jours 2.5).

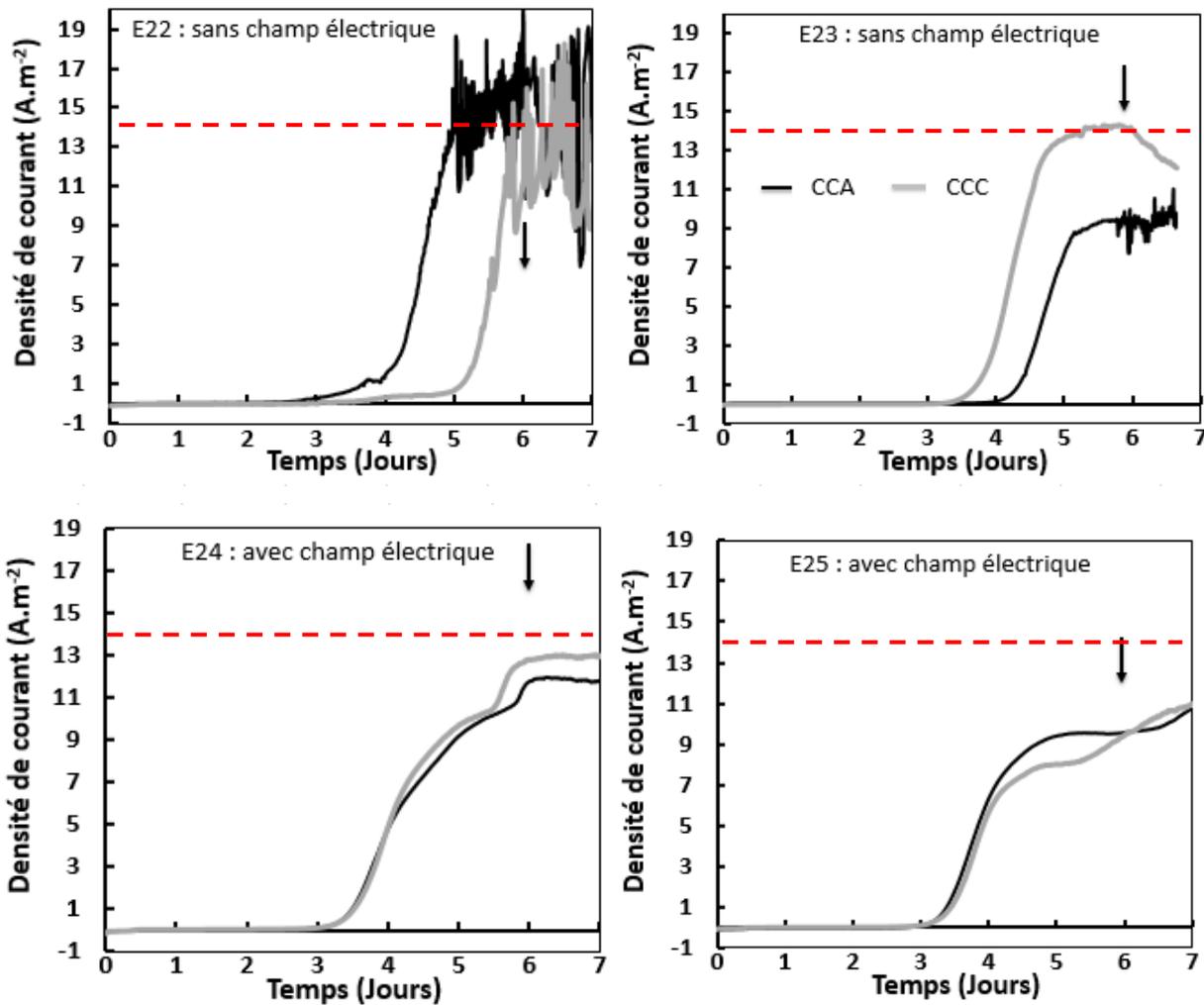


Figure 9 : Chronoampérométrie enregistrées pour quatre réacteurs triple compartiments (E22 / E23 : 3 h sans champ électrique et E24 / E25 : 3 h avec champ électrique) dont le compartiment central est inoculé avec du lixiviat de terreau préparé à partir du SAC 4. Les deux électrodes de travail CCA (en noir) et CCC (en gris) de 3.14 cm² sont polarisées à -0.2 V/ECS. Les flèches indiquent les ajouts d'acétate (20 mM).

Après 7 jours de polarisation, les chronoampérogrammes obtenus avec le SAC 4 (Figure 9) sont très différents de ceux fournis avec le SAC 3 (Figure 3 de l'article, section 3.1).

En absence de champ électrique (E22 / E23), du courant est produit sur les deux électrodes en tissu de carbone (CCA et CCC) avec des densités élevées, atteignant 14 A.m⁻². La production initiale de courant sur CCA et CCC se fait de façon aléatoire. Pour E22, du courant est généré en premier lieu sur CCA (jour 3) tandis que pour E23 le courant est d'abord produit sur CCC (jour 3.4). La deuxième électrode en tissu de carbone entame ensuite sa production de courant presque 1 jour après la première. L'apparition du bruit au niveau de quelques courbes s'explique par des problèmes de connexion survenus vers la fin des expériences pour E22 et E23. Malgré un changement des pinces crocodiles et

de l'électrode de référence le bruit a persisté. Nous pensons que le problème de connexion résidait soit au niveau du fil de platine connecté au tissu de carbone soit au niveau des voies de potentiostat.

En présence d'un champ électrique (E24 / E25), la production initiale du courant a lieu au même moment sur les deux électrodes CCA et CCC (jour 3) et les densités de courant délivrées sont légèrement faibles que celles obtenues sans champ électrique, avec des valeurs restant inférieures à 13 A.m⁻².

Avec le sac de terreau SAC 4, l'application du champ électrique semble accélérer la colonisation initiale des deux électrodes en tissu de carbone (CCA et CCC) et tend à donner aux deux électrodes des comportements similaires et reproductibles. Cependant, les densités de courant produites sont légèrement faibles qu'en l'absence de champ électrique.

4.2 Analyse des populations microbiennes

Après 7 jours d'expérience, des échantillons des électrodes CCA et CCC des expériences E22 (sans champ électrique) et E24 (avec champ électrique) sont prélevés pour une analyse par pyroséquençage du gène codant pour l'ARNr 16S afin d'identifier les populations microbiennes. Un échantillon de l'inoculum préparé à partir du SAC 4 a également été analysé.

Au rang taxonomique du phylum, les phyla majoritaires présents dans l'inoculum sont *Proteobacteria* (29%), *Firmicutes* (21%) et *Actinobacteria* (10%). De nombreux autres phyla minoritaires (< 10%) sont également détectés et couvrent 18% de la population totale. Environ 22% des populations microbiennes n'ont pas pu être identifiées au rang du phylum. Les populations microbiennes présentes sur les électrodes sont en revanche plus spécifiques et se répartissent entre seulement 3 phyla identifiés : *Proteobacteria*, *Firmicutes* et *Bacteroidetes*. Une différence est clairement observée entre les populations microbiennes des électrodes soumises au champ électrique (E24) et celles des électrodes non soumises au champ électrique (E22). Sur les électrodes soumises au champ, les populations sont dominées par *Proteobacteria* (75% sur CCA et 64% sur CCC). *Firmicutes* représente seulement 9 à 12% de la population totale et *Bacteroidetes* 2 à 4%. En revanche, les communautés des électrodes non soumises au champ sont dominées par *Firmicutes* (44% sur CCA et 39% sur CCC). *Proteobacteria* occupe 23 à 24% de la population totale et *Bacteroidetes* entre 6 à 9%.

Au niveau de la classe bactérienne (Figure 10), les populations des électrodes sont très différentes de celles de l'inoculum. En effet, *Proteobacteria* inclue une majorité d'*Alpha-proteobacteria* (21%) pour l'inoculum, tandis que pour les électrodes il se divise entre les *Delta-* (18-65%) et les *Gamma-proteobacteria* (1-17%). Le phylum *Firmicutes* est quant à lui majoritairement constitué de *Bacilli* (20%) pour l'inoculum alors qu'il inclut généralement des *Clostridia* (8-44%) pour les électrodes. Des différences sont également constatées au niveau des populations des électrodes : en présence de champ électrique (E24), *Delta-proteobacteria* (46-65%) émerge en tant que classe bactérienne dominante alors qu'en absence de champ électrique (E22) il s'agit de la classe des *Clostridia* (38-44%). Le champ électrique semble alors favoriser la prolifération des *Delta-proteobacteria*.

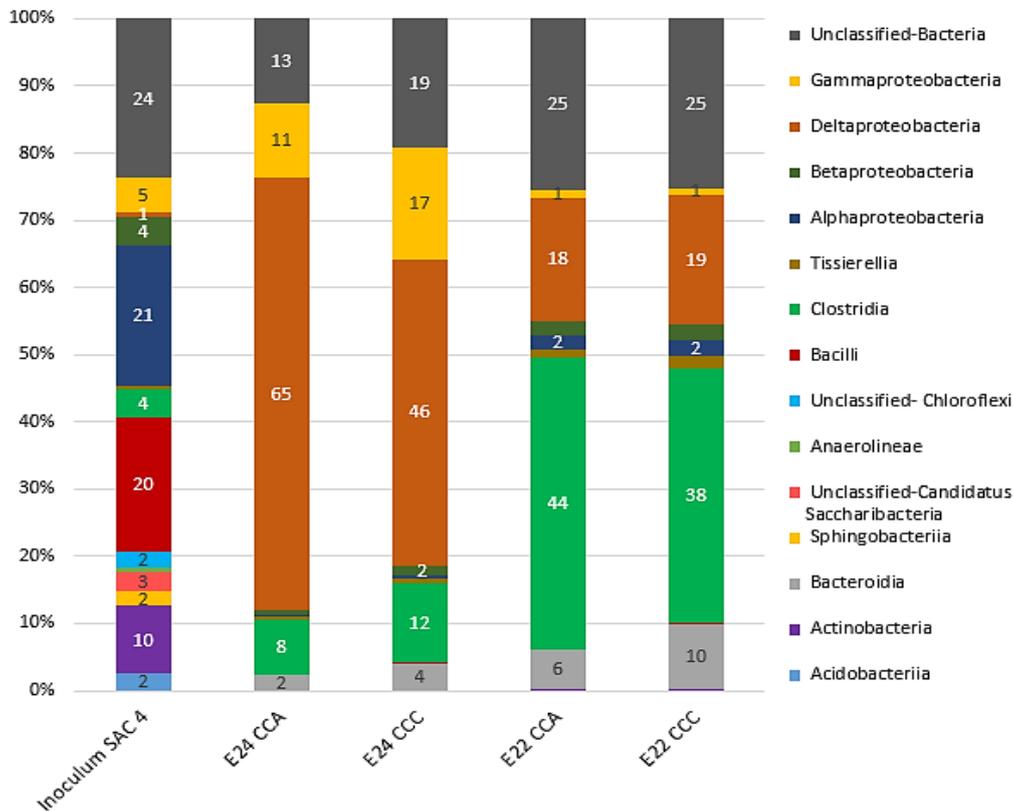


Figure 10 : Abondances relatives au niveau taxonomique de la classe dans l'inoculum initial et les biofilms prélevés sur les électrodes en tissu de carbone CCA et CCC ayant été soumises 3h à un champ électrique (E24) ou 3h sans champ électrique (E22). CCA et CCC sont ensuite polarisées à -0.2 V/ECS pendant 7 jours.

Enfin, au niveau de l'espèce (Figure 11), à nouveau une différence nette apparaît entre les populations microbiennes de l'inoculum et celles des électrodes. Comme observé au chapitre 4, le lixiviat de terreau présente une large variété d'espèces microbiennes. Environ 48% des espèces qui le composent ont une proportion inférieure à 2%. En comparaison, les communautés des électrodes sont beaucoup

plus spécifiques : deux (E22) ou trois (E24) espèces bactériennes seulement composent plus de 50% de la communauté.

- Une espèce de *Pseudomonas* (10-16%) ainsi qu'une espèce non classifiée de *Delta-proteobacteria* (15-28%) se sont développées exclusivement sur les électrodes qui ont été exposées au champ électrique (E24). C'est également le cas d'une espèce de *Pelobacter* mais avec des abondances relatives beaucoup plus faibles (2-3%). Au chapitre 4, une recherche dans la base de données de BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), a révélé que l'espèce présentant le plus de similarité (97%) avec l'espèce non classifiée de *Delta-proteobacteria* est *Desulfuromonas sp.* Comme exposé au chapitre 4 et dans l'article (section 3.1 de ce chapitre), ces trois espèces peuvent être pressenties comme électroactives. Vu leur présence exclusive sur les électrodes exposées au champ, il semble que leur approche vers la surface de l'électrode soit nettement favorisée par la présence du champ électrique.
- L'espèce *G. sulfurreducens* est détectée sur les électrodes exposées au champ électrique (E24, 28-34%) et, dans une moindre proportion, sur les électrodes non-exposées au champ (E22, 18-20%). *G. sulfurreducens* est connue pour son électroactivité. La différence des abondances relatives entre E24 et E22 suggère que son approche vers l'électrode pourrait être favorisée par le champ électrique.
- L'effet du champ électrique est par contre inversé sur l'espèce de *Clostridium* qui est retrouvée sur toutes les électrodes mais à des proportions beaucoup plus faibles sur celles qui ont été exposés au champ (E24, 6-9%) que sur les contrôles non exposés (E22, 32-39%).
- Enfin, *Lutispora thermophila* (2-3%) et une espèce non classifiée de *Rhodocyclaes* (2%) sont détectées uniquement sur les électrodes non exposées au champ (E22) mais dans de très faibles proportions.

L'analyse des populations microbiennes montre que l'application du champ électrique favorise la colonisation par des espèces connues pour leur électroactivité (*G. sulfurreducens*), ou pressenties comme électroactives (*Pseudomonas sp*, *Pelobacter sp* et *Desulfuromonas sp*) car l'identification jusqu'à l'espèce n'a pas abouti. Certaines semblent modérément sensibles au champ électrique (*G. sulfurreducens*), alors que d'autres ne colonisent l'électrode que grâce à l'application du champ (*Pseudomonas sp*, *Pelobacter sp* et *Desulfuromonas sp*). Au contraire, d'autres espèces pour lesquelles

nous n'avons pas d'information sur d'éventuelles capacités électroactives, sont gênées par le champ (*Clostridium sp*).

Le champ électrique a donc un effet majeur sur la composition des communautés microbiennes qui colonisent les électrodes, même dans le cas où l'inoculum est suffisamment riche en espèces électroactives (Sac 4) pour assurer la formation d'un biofilm EA sans la présence du champ. Il faut en outre remarquer, que comme dans le cas des électrodes préparées à partir de l'inoculum du Sac 3, les bactéries qui semblent sensibles au champ électrique ne font pas de différence entre les électrodes CCA et CCC. En effet, aucune différence nette n'est remarquée entre les populations des biofilms de CCA et CCC (Figure 11). Cela renforce l'hypothèse qu'il s'agit plutôt d'un phénomène tel que la détection d'un gradient d'osmolarité que d'un processus directionnel comme l'action directe du champ électrique sur des colloïdes chargés.

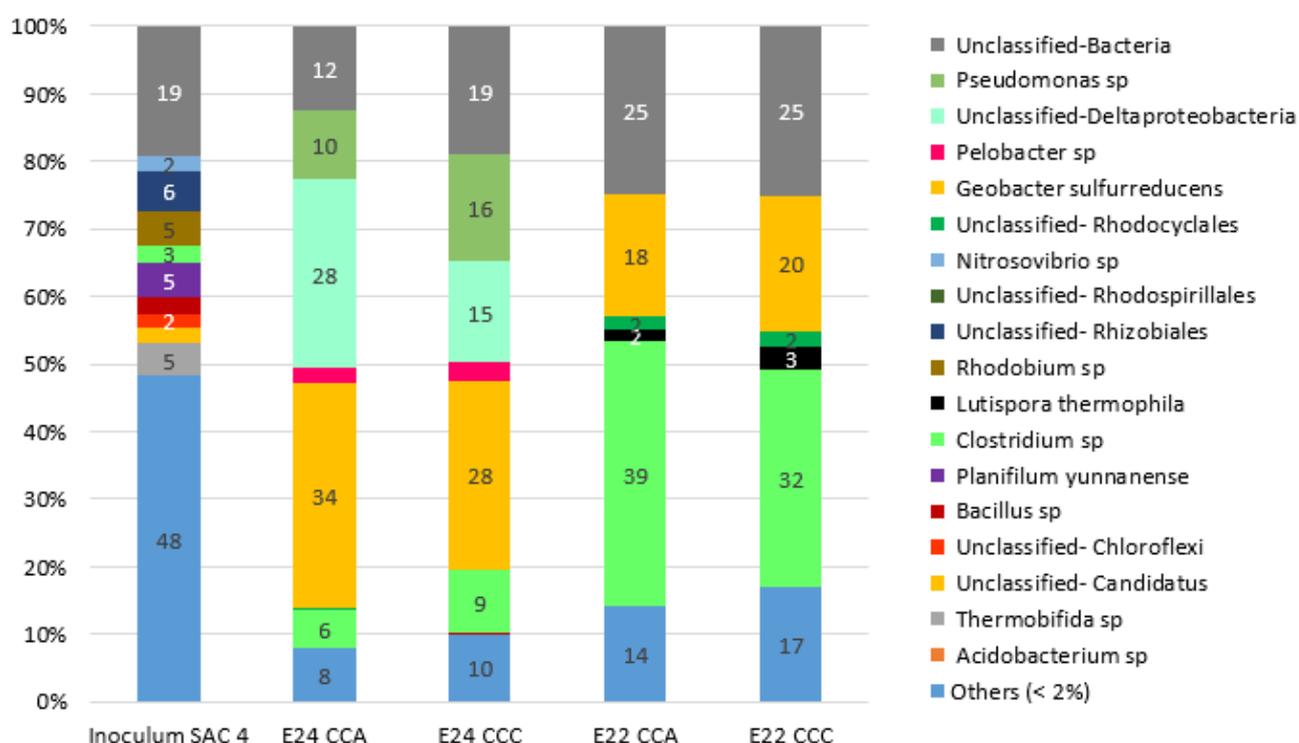


Figure 11 : Abondances relatives au niveau taxonomique de l'espèce dans l'inoculum initial et les biofilms prélevés sur les électrodes en tissu de carbone CCA et CCC ayant été soumises 3h à un champ électrique (E24) ou 3h sans champ électrique (E22). CCA et CCC sont ensuite polarisées à -0.2 V/ECS pendant 7 jours.

4.3 Comparaison avec les résultats obtenus avec le sac de terreau SAC 3

Seules les expériences ayant été réalisées dans les conditions standards sont utilisées pour comparaison. Le Tableau 7 rappelle les expériences concernées pour chacun des deux sacs de terreau.

Tableau 7 : Liste des expériences utilisées pour comparaison.

	3h sans champ électrique	3h avec champ électrique
SAC 3 <i>article de la section 3.1</i>	#2A / #2B	#4A / #4B
SAC 4	E22 / E23	E24 / E25

Les chronoampérogrammes enregistrés au cours des 7 jours de polarisation avec le sac de terreau Sac 3 (Figure 3, Article) présentent des différences significatives par rapport à ceux obtenus avec le Sac 4 (Figure 9) :

- Les expériences menées sans champ électrique n'ont pas produit de courant significatif avec le Sac 3 ($\sim 0 \text{ A.m}^{-2}$), tandis qu'avec le Sac 4 des densités de courant élevées ($\sim 14 \text{ A.m}^{-2}$) ont été générées. Le Sac 4 donne donc un inoculum plus performant que le Sac 3. Ceci paraît logique car la communauté microbienne a certainement évolué dans le Sac 3, ouvert depuis environ 1 mois à la date des expériences. De nombreuses espèces EA anaérobies ont dû souffrir de l'exposition à l'air. Au contraire, le sac 4 maintenu fermé hermétiquement jusqu'à son utilisation renfermait certainement une plus grande proportion d'espèces capables d'électroactivité.
- Les expériences avec champ électrique conduites avec le Sac 3 ont montré que du courant était systématiquement produit en premier lieu sur CCC (au jour 4 ± 0.4) puis sur CCA (au jour 5.7 ± 0.8). Alors qu'avec le Sac 4 le courant est produit exactement au même moment sur CCA et CCC et de façon plus rapide qu'avec le sac 3 (au jour 3.1 ± 0.1). De plus, les valeurs des densités de courant maximales sont plus élevées avec le Sac 4 ($10.5 \leq J_{\max} \text{ (A.m}^{-2}) \leq 12.9$) qu'avec le Sac 3 ($3.5 \leq J_{\max} \text{ (A.m}^{-2}) \leq 10.5$). Cela confirme bien la plus grande efficacité de l'inoculum issu du Sac 4, qui permet un démarrage du courant plus rapide et des densités de courant maximales plus élevées.

Avec le Sac 3, les électrodes qui n'ont pas été exposées au champ électrique (#2 A et #2B) n'ont pas produit de courant, il n'a pas été observé de colonisation microbienne significative à leur surface et il n'a pas été possible de récupérer suffisamment d'ADN pour faire une analyse valable de la communauté microbienne présente. Au contraire, avec le Sac 4, même les électrodes non soumises au champ ont vu leur surface colonisée et l'ADN collecté a été suffisant pour l'analyse des communautés microbiennes (E22).

Au niveau taxonomique du phylum (Figure 12), les deux inocula présentent des populations microbiennes similaires. Quant aux bioanodes, aucune différence n'est constatée entre les communautés microbiennes des électrodes inoculées avec le Sac 3 ou le Sac 4. En effet, toutes les électrodes (CCA et CCC) soumises au champ électrique (#4A / #4B / E24) sont dominées par les *Proteobacteria* à hauteur de 64 à 91%. En revanche, les communautés des électrodes non soumises au champ (E22) sont dominées par les *Firmicutes* (44% sur CCA et 39% sur CCC), les *Proteobacteria* n'occupant que 23 à 24% de la population totale. La comparaison des communautés microbiennes au niveau du phylum révèle donc un effet significatif du champ sur la composition des populations microbiennes qui ne dépend pas du sac dont est issu l'inoculum.

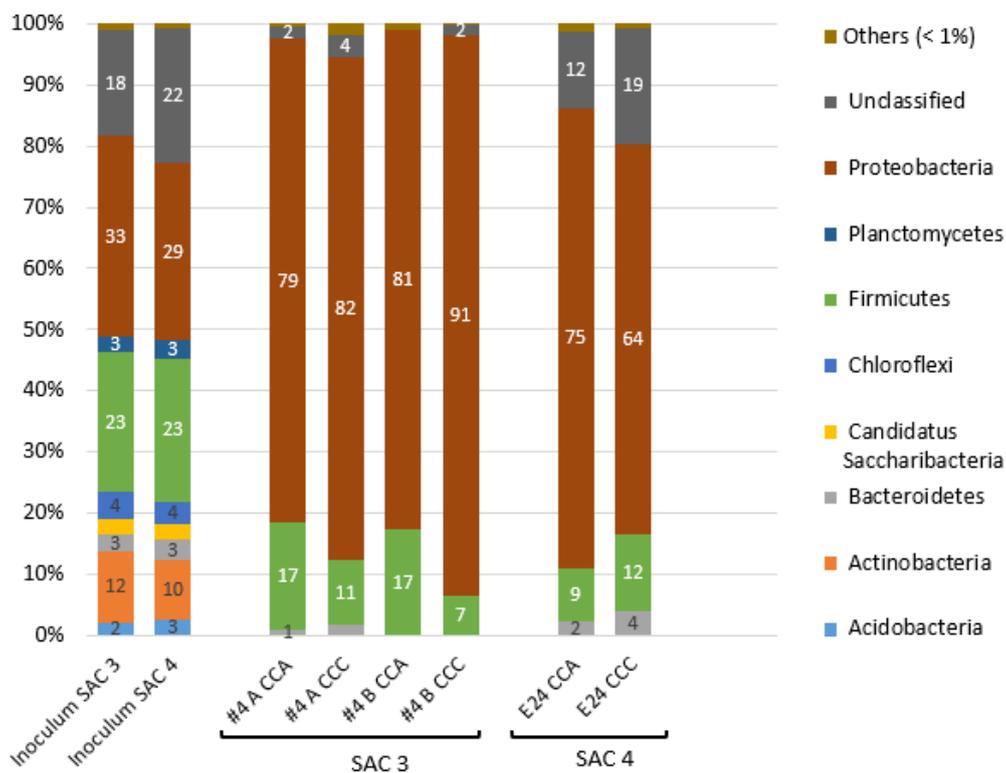


Figure 12 : Comparaison des abondances relatives au niveau taxonomique du phylum des échantillons (inocula et électrodes) provenant des sacs de terreau SAC 3 et SAC 4.

Les communautés microbiennes qui sont comparées dans cette section sont présentées dans la figure 6 de l'article (section 3.1) et dans les figures 10 et 11 ci-dessus au niveau taxonomique des classes et des espèces.

Au niveau taxonomique de la classe, les populations microbiennes des électrodes qui ont été exposées au champ sont clairement dominées par les *Gamma-proteobacteria* et *Delta-proteobacteria* dont la somme des abondances relatives va de 63 à 91 %. On note toutefois une différence entre l'inoculum du sac 3 qui privilégie les *Gamma-proteobacteria* (47-73%) et celui du Sac 4 qui donne la majorité aux *Deltaproteobacteria* (46-65%). Au contraire les électrodes formées sans exposition au champ sont dominées par les *Clostridia* (38-44%) alors que la somme des *Gamma-proteobacteria* et *Delta-proteobacteria* ne dépasse pas 20%. L'effet du champ électrique constaté au niveau des phyla se confirme évidemment au niveau des classes, ainsi qu'une certaine cohérence des communautés microbiennes formées après l'exposition au champ indépendamment du sac d'origine de l'inoculum. Enfin, l'analyse au niveau des espèces confirme un effet reproductible de l'exposition au champ électrique. *Pseudomonas sp.* (*Gamma-proteobacteria*) et *Geobacter sulfurreducens* (*Delta-proteobacteria*), qui composent la majorité des communautés microbiennes obtenues après exposition au champ à partir du sac 3 (71 à 80%), restent en très fortes proportions dans les communautés formées à partir du sac 4 lorsqu'il y a eu une exposition au champ (E24, 44 à 46 %). Par contre elles ne dépassent pas 20% (E22) lorsqu'il n'y a pas eu d'exposition au champ. D'ailleurs *Pseudomonas sp.* n'est plus présente en l'absence de champ électrique. Inversement, en l'absence de champ c'est *Clostridium sp.* qui devient dominante (E22, 32 à 39 %), alors qu'elle ne dépasse pas 9 % en présence du champ pour le sac 4, voire 'est pas détectée pour la sac 3.

5 CONCLUSIONS DU CHAPITRE 5

La mise au point du système expérimental fut un long cheminement parsemée d'essais et d'erreurs. Finalement, le système et la procédure donnent de premiers résultats très encourageants. Nous pouvons donc conclure que le système expérimental mérite que l'on poursuive dans cette voie, sans doute en continuant à le rendre encore plus fiable. Nous avons par exemple noté qu'il était difficile de maîtriser précisément le courant qui traverse la solution, bien que la tension appliquée ait été toujours identique. La maîtrise de ce paramètre serait à améliorer, par exemple en travaillant sur le prétraitement des électrodes qui assurent le champ électrique (anode en DSA et cathode en acier inoxydable). Cela

permettrait de multiplier les expériences en faisant varier de façon précise et bien contrôlé la densité de courant qui traverse l'inoculum pendant la période d'exposition.

En l'état le système expérimental nous a permis de mettre en évidence l'effet du champ électrique sur la formation des biofilms EA. Le champ était appliqué pendant la phase d'exposition des électrodes à l'inoculum, alors que les électrodes n'étaient pas polarisées. C'est donc bien le seul effet du champ électrique qui est responsable des différences observées lorsque les électrodes « imprégnées » de l'inoculum sont ensuite polarisées dans un milieu synthétique dépourvu d'inoculum. L'exposition au champ électrique améliore considérablement la formation des biofilms EA avec un inoculum jugé moins efficace. Par contre, il accélère toujours l'apparition de l'électroactivité avec un inoculum jugé plus efficace, mais diminue la densité de courant maximale. L'effet du champ électrique est donc fortement dépendant de la nature de l'inoculum. C'est un paramètre donc nous n'avons pas mesuré l'importance au début de cette thèse, car lors de la formation de biofilms EA suivant la procédure conventionnelle de polarisation les résultats en termes d'évolution de la densité de courant avait toujours été pratiquement reproductibles.

Le champ électrique a un effet significatif sur la composition des communautés microbiennes qui composent les biofilms EA. En termes de phyla, de classes et même d'espèces, l'application du champ électrique conduit à des similitudes dans les communautés formées à partir des deux sources d'inoculum utilisées, alors que ces inocula ont conduit à des performances extrêmement différentes en l'absence d'exposition au champ électrique. La présence du champ électrique durant l'exposition de l'électrode à l'inoculum influence donc la sélection des espèces microbiennes qui composent les biofilms EA. C'est semble-t-il la première fois que ce constat est fait.

Les premiers résultats décrits dans ce chapitre ont conduit à modifier la perception intuitive que nous avions de l'effet d'un champ électrique sur les mécanismes d'approche des surfaces par les cellules microbiennes. Il semble que l'effet direct du champ sur la cellule assimilable à un colloïde chargé ne soit pas le moteur essentiel de l'approche de la surface. Nous avons émis l'hypothèse que le mécanisme principal consiste plutôt en la détection du gradient d'osmolarité que le champ électrique crée à la surface des électrodes. L'analyse des mécanismes que nous avons proposée est résumée par la figure 8 de l'article présenté ci-dessus.

Evidemment, ces premiers résultats doivent être complétés par des séries d'expériences qui devront faire varier les divers paramètres qui pourraient avoir un effet. La densité du courant ionique qui

traverse l'inoculum est le premier paramètre auquel nous pensons ; la durée de l'exposition également. La seule expérience réalisée avec 2 heures d'exposition, au lieu des 3 heures du protocole standard, indique que cette durée est sans doute trop brève. Il serait intéressant d'expérimenter des temps plus longs en espérant observer un effet encore plus marqué. La composition des milieux sera également à modifier, comme un moyen de modifier les gradients de concentrations aux électrodes. Enfin, les résultats montrent l'importance de la nature de l'inoculum. D'autres sources seront à tester, les boues de station d'épuration ou les sédiments marins par exemple, qui sont des sources communes de biofilms EA. Dans tous les cas il sera important de tenter de stabiliser autant que possible la composition de la population microbienne de l'inoculum. Dans cette direction, la mise en œuvre de cultures mixtes contrôlées pourrait également être une voie prometteuse pour la poursuite de ces recherches.

Conclusion
générale

Le sujet traité dans le cadre de cette thèse s'inscrit dans une démarche de recherche fondamentale sur les biofilms EA anodique. Ces biofilms EA sont appréhendés dans cette thèse comme des interfaces bioélectrocatalytiques complexes (systèmes électrodes / biofilms / électrolytes) dont l'étude nécessite de faire appel à des notions issues de plusieurs champs disciplinaires : l'électrochimie, la microbiologie et les procédés à biofilms, pour ne citer que les principaux. Dans ce cadre, l'objectif général de mes travaux était d'aborder les premières étapes de la mise en place des biofilms EA anodiques à la surface d'électrodes afin d'identifier les étapes ou les phénomènes limitant leur développement et/ou leur activité électrocatalytique. En effet, jusqu'à présent, très peu d'études se sont focalisées sur les premiers instants de formation des biofilms EA. La majorité des études est plutôt tournée vers la pérennisation du fonctionnement des bioanodes à long terme.

L'analyse bibliographique présentée au Chapitre 1 a fait apparaître que les électrodes tridimensionnelles poreuses étaient de plus en plus utilisées comme support pour former des biofilms EA. Au démarrage de la thèse, en 2015, il n'existait ni théorie, ni règle empirique pour guider la fabrication de telles bioanodes. La revue bibliographique fait pourtant ressortir l'importance de la taille des pores sur la colonisation et les performances des bioanodes poreuses. Selon cette revue, les densités de courant les plus élevées sont atteintes avec une taille de pore de l'ordre du millimètre.

Le premier jalon de cette thèse a été d'initier une base de connaissance sur la formation des biofilms EA à l'échelle d'un pore unique. Un dispositif expérimental modèle a été conçu qui approche un pore par un canal parallélépipédique dont la hauteur est fixée à différentes valeurs entre 0,2 et 5 mm. Les résultats du chapitre 3 ont confirmé qu'une taille de pore de l'ordre de quelques millimètres était le bon ordre de grandeur pour obtenir une colonisation rapide (en 4 jours) même avec des profondeurs de plusieurs centimètres. Le diamètre d'ouverture du canal (1 mm ou 5 mm) a seulement un impact sur le temps de démarrage du courant anodique et sur la densité de courant à long terme.

Néanmoins, les transports de matière limitent l'activité électrocatalytique des biofilms qui se forment au sein du canal. Une modélisation numérique simple sur la base de l'équation de diffusion-réaction et l'utilisation du nombre de Damkholer modifié se sont révélés de bons outils pour approcher ces limitations. Ils ont permis de démontrer que la diffusion des espèces tampons de la solution externe vers l'intérieur des pores (ou canaux) ne compense pas la

production de protons générés par l'oxydation de l'acétate par les biofilms. Pour concevoir des bioanodes poreuses optimales, il semble donc indispensable de prendre en compte l'acidification locale liée à l'activité électrocatalytique d'oxydation. Parmi les principales pistes pour lever cette limitation, on peut imaginer utiliser des consortia bactériens acidophiles comme ceux présents dans les drainages miniers acides, ou encore de travailler en présence de fortes concentrations en espèces tampon afin de maximiser leur transport dans les pores. En contrepartie, cette idée nécessite de déterminer la concentration maximale en espèces tampon tolérables par les microorganismes et, le cas échéant, d'acclimater des consortia ou biofilms à ces fortes concentrations.

Ce chapitre a également mis en évidence un découplage entre l'évolution de la colonisation des électrodes au sein des canaux et l'évolution de la production de courant. Il a paru difficile d'interpréter cette observation et seules quelques pistes ont été suggérées pour continuer les recherches sur ce point.

A long terme, les électrodes placées dans un canal produisent des densités de courant plus élevées que les électrodes de contrôle, libres de toute contrainte géométrique. Dans certains cas les électrodes de contrôle voient même leur production de courant s'annihiler, alors que cela n'a jamais été observé avec les électrodes placées au sein des canaux. Nous avons émis l'hypothèse que le confinement dans le canal limiterait la croissance du biofilm à un état de développement en deçà de la maturité nécessaire pour provoquer les processus d'auto-détachement du biofilm. Voici une nouvelle hypothèse qu'il conviendra bien entendu de confirmer (ou non) avant d'envisager des stratégies de confinement des biofilms EA permettant de stabiliser leur activité électrocatalytique sur le long terme.

Enfin, la dernière singularité constatée dans le chapitre 3 fut que l'établissement d'un biofilm EA secondaire, c'est-à-dire formé à partir d'une bioanode primaire, a toujours eu lieu en deux jours, et ce quelle que soit la configuration de l'électrode secondaire, libre ou enfermée dans un canal. Ceci confirme l'importance qu'ont assurément les premières étapes de formation des biofilms EA sur les électrodes. Aujourd'hui, pour ce qui concerne les biofilms EA, on n'a que peu de connaissances sur ces étapes que l'on peut résumer par le triptyque détection-adhésion-croissance. Le gain de connaissance fondamentale sur ces étapes permettrait sans nul doute de trouver de nouveaux leviers pour optimiser la mise en place des biofilms électroactifs. La

piste de recherche reste donc ouverte et offre de nouvelles perspectives à explorer dans les années à venir au LGC.

Dans le chapitre 4 un nouveau dispositif expérimental a permis d'étudier pour la première fois l'accessibilité des bactéries EA au fond de pores de différentes longueurs. Dans ce dispositif les parois des pores sont non-conducteurs et l'électrode est uniquement placée au fond. Le diamètre des pores a été fixé à 2 mm et les longueurs de pores étaient comprises entre 5 et 24 mm. Les résultats ont à nouveau confirmé que des pores de quelques millimètres de diamètre permettent l'accès des bactéries EA jusqu'au fond des pores de plusieurs centimètres de longueur.

La longueur des pores n'impacte pas le temps de démarrage du courant. Par contre, elle induit une sélection des espèces bactériennes qui se sont développées au fond des pores. Plus la longueur des pores est importante (5, 10, 24 mm), plus les biofilms EA sont enrichis en espèces bactériennes des genres *Pseudomonas* et *Desulfuromonas*. De manière plus conventionnelle, les biofilms développés sur électrodes simples ou au fond de pores peu profonds (5 mm) renferment majoritairement des espèces du genre *Geobacter*. Cet enrichissement progressif en *Pseudomonas* et *Desulfuromonas* qui augmente avec la longueur des pores peut avoir plusieurs origines. Les espèces des genres *Pseudomonas*, *Desulfuromonas* et *Geobacter* n'ont peut-être pas la même capacité intrinsèque à se déplacer (mécanismes de mobilité et cinétique) et/ou à détecter des surfaces solides conductrices. Le transport de matières de plus en plus limité à mesure que la longueur du pore augmente peut aussi avoir une part de responsabilité en créant sur la longueur des pores des gradients de concentration en substrats essentiels à la croissance et à l'activité des bactéries.

L'acidification locale au niveau du biofilm est également amplifiée au fond des pores les plus profonds. En effet, nous avons vu dans le chapitre 3 que la diffusion des espèces tampon était limitante pour compenser la production des protons dans le biofilm. Cette acidification pourrait avoir une influence différente sur la cinétique de croissance des différentes populations ou sur l'activité des enzymes bactériennes impliquées dans l'oxydation du substrat.

Pour de futurs travaux, il sera intéressant d'observer comment la proportion de *Pseudomonas*, *Desulfuromonas* et *Geobacter* évolue avec d'autres tailles de pores et de tenter d'établir des corrélations en lien avec le transport de matière en solution dans les pores. Cela nécessiterait

de reprendre les outils définis au chapitre 3 afin de modéliser le pH et le transport de substrats et d'espèces tampon au sein des pores.

Le dernier objectif de cette thèse était d'étudier le rôle du champ électrique sur les toutes premières étapes d'initiation d'un biofilm EA en espérant contribuer ainsi à la compréhension des mécanismes impliqués dans la phase d'approche des bactéries vers l'électrode. Dans un premier temps, il a fallu optimiser les conditions opératoires et mettre au point un protocole expérimental qui permette de distinguer l'effet éventuel du champ électrique au sein de la solution de celui de la polarisation de l'électrode qui reçoit les microorganismes. Ceci a fait l'objet d'un nombre conséquent d'expérimentations dont les résultats ne sont pas directement valorisables, si ce n'est par le savoir-faire acquis.

Les résultats ont révélé que l'application d'un champ électrique pendant que l'électrode est exposée à l'inoculum accélère l'apparition de l'électroactivité. C'est un résultat original car, pour la première fois à notre connaissance, l'effet du champ est découplé de celui de la polarisation. L'analyse des mécanismes d'action possibles a conduit à ne pas privilégier l'explication conventionnelle basée sur la force exercée directement par le champ électrique sur des cellules assimilables à un colloïde chargé. Nous avons suggéré que le moteur essentiel de l'effet du champ électrique était la détection par les cellules microbiennes du gradient d'osmolarité créé à la surface des électrodes. Cette hypothèse ouvrirait une nouvelle voie de recherche dans l'étude des mécanismes d'établissement des biofilms EA.

L'effet du champ électrique est très dépendant de la nature de l'inoculum. Toutefois, à partir d'échantillons différents de la source d'inoculum utilisée ici (le compost de jardin), il semble favoriser une colonisation très similaire des électrodes par un nombre restreint d'espèces qui se retrouvent toujours dans les communautés microbiennes des biofilms formés avec une exposition préalable au champ électrique.

Ces observations originales et l'hypothèse ambitieuse issue de l'analyse des mécanismes appellent maintenant d'autres investigations. Tout d'abord, le dispositif expérimental paraît suffisamment prometteur que l'on consacre du temps à l'améliorer afin de mieux maîtriser un certain nombre de paramètres et de systématiser les expérimentations. Ensuite, il faudra affiner l'analyse des mécanismes, tenter de découpler par une démarche « pas à pas » les différents processus qui ont été suggérés dans le Chapitre 5 et multiplier les expériences en faisant varier les paramètres un à un (densité de courant ionique, temps d'application du

champ, composition des solutions, nature de l'électrode, nature de l'inoculum, etc.) En vue d'exploiter et de combiner les connaissances et les savoir-faire acquis lors de ce travail de thèse il serait en outre très tentant d'étudier l'influence du champ électrique avec le dispositif multi-pores décrit au Chapitre 4. On pourrait ainsi espérer accélérer la formation du biofilm EA et surtout observer quel serait l'effet couplé du champ électrique et de la longueur des pores sur la sélection des bactéries ; l'objectif pratique à long terme restant l'identification de voies pour maîtriser et optimiser la formation des biofilms EA.

En conclusion, les recherches effectuées dans ce travail de thèse procurent de premières bases pour la compréhension de la formation des biofilms électroactifs. En fait, le terme « premières bases » est sans doute exagéré car le résultat du travail consiste plutôt en un ensemble de nouveaux questionnements scientifiques et de pistes de recherches pour le futur. Nous espérons avoir suffisamment étayé les hypothèses émises au moins pour convaincre la communauté des chercheurs impliqués dans l'étude et l'exploitation des biofilms EA de l'intérêt qu'il y a à poursuivre ces voies de recherche. D'un point de vue technologique, en couplant ces avancées à celles réalisées récemment dans le cadre des thèses de P. Champigneux et E. Roubaud, respectivement sur l'influence de l'état de surface des électrodes et sur le design de géométries tridimensionnelles d'électrodes (Figure 1), le LGC devrait être en mesure de proposer des structures d'électrodes optimisées à trois niveaux d'échelles complémentaires : nano-micro, milli et macro.

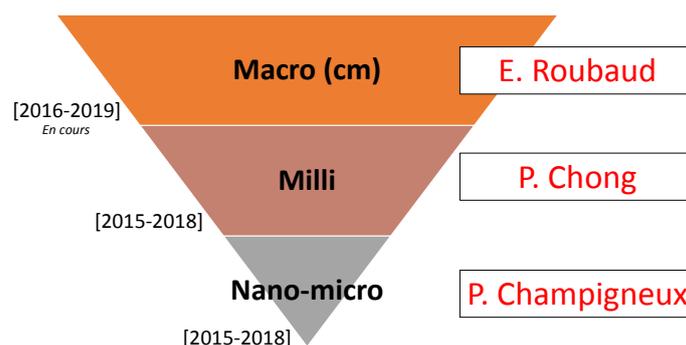


Figure 1 : Illustration de la complémentarité des échelles d'étude explorées sur les interfaces électrodes / biofilms électroactifs pendant la période 2015-2019 au Laboratoire de Génie Chimique.

Pour terminer, nous espérons de tout cœur que ces travaux initiés ainsi que les perspectives que nous avons proposées contribueront à l'émergence de connaissances nouvelles dans le domaine de l'électrochimie microbienne.

*Références
bibliographiques*

- Abbott, James Francis, et Andrew Creamore Life. 1908. « Galvanotropism in bacteria ». *American Journal of Physiology-Legacy Content* 22 (1): 202-6. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1908.22.1.202>.
- Adler, J., et W. Shi. 1988. « Galvanotaxis in Bacteria ». *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 53 (janvier): 23-25. <https://doi.org/10.1101/SQB.1988.053.01.006>.
- Alexandre, Gladys. 2010. « Coupling Metabolism and Chemotaxis-Dependent Behaviours by Energy Taxis Receptors ». *Microbiology (Reading, England)* 156 (Pt 8): 2283-93. <https://doi.org/10.1099/mic.0.039214-0>.
- An, Jingkun, Nan Li, Lili Wan, Lean Zhou, Qing Du, Tian Li, et Xin Wang. 2017. « Electric Field Induced Salt Precipitation into Activated Carbon Air-Cathode Causes Power Decay in Microbial Fuel Cells ». *Water Research* 123: 369-77. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.06.087>.
- Andrea Ieropoulos, Ioannis, Andrew Stinchcombe, Iwona Gajda, Samuel Forbes, Irene Merino-Jimenez, Grzegorz Pasternak, Daniel Sanchez-Herranz, et John Greenman. 2016. « Pee Power Urinal – Microbial Fuel Cell Technology Field Trials in the Context of Sanitation ». *Environmental Science: Water Research & Technology* 2 (2): 336-43. <https://doi.org/10.1039/C5EW00270B>.
- Artyushkova, K., Roizman, D., Santoro, C., Doyle, L.E., Fatima Mohidin, A., Atanassov, P., and Marsili, E. (2016). Anodic biofilms as the interphase for electroactive bacterial growth on carbon veil. *Biointerphases 11*, 031013.
- Awasthi, Abhishek Kumar, et Jinhui Li. 2017. « An overview of the potential of eco-friendly hybrid strategy for metal recycling from WEEE ». *Resources, Conservation and Recycling* 126 (novembre): 228-39. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2017.07.014>.
- Badalamenti, Jonathan P., Zarath M. Summers, Chi Ho Chan, Jeffrey A. Galnack, et Daniel R. Bond. 2016. « Isolation and Genomic Characterization of “Desulfuromonas Soudanensis WTL”, a Metal- and Electrode-Respiring Bacterium from Anoxic Deep Subsurface Brine ». *Frontiers in Microbiology* 7: 913. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00913>.
- Baeza, Juan A., Àlex Martínez-Miró, Javier Guerrero, Yolanda Ruiz, et Albert Guisasola. 2017. « Bioelectrochemical hydrogen production from urban wastewater on a pilot scale ». *Journal of Power Sources* 356 (juillet): 500-509. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2017.02.087>.
- Ball, P., 2007. Bacteria may be wiring up the soil. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/449388a>
- Bancroft, Frank W. s. d. « On the Influence of the Relative Concentration of Calcium Ions on the Reversal of the Polar Effects of the Galvanic Current in Paramecium ». *The Journal of Physiology* 34 (6): 444-63. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1906.sp001167>.
- Baraquet, Claudine, Laurence Théraulaz, Chantal Iobbi-Nivol, Vincent Méjean, et Cécile Jourlin-Castelli. 2009. « Unexpected Chemoreceptors Mediate Energy Taxis towards Electron Acceptors in *Shewanella Oneidensis* ». *Molecular Microbiology* 73 (2): 278-90. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06770.x>.
- Barkay, T., et J. Schaefer. 2001. « Metal and Radionuclide Bioremediation: Issues, Considerations and Potentials ». *Current Opinion in Microbiology* 4 (3): 318-23.
- Battle-Vilanova, Pau, Ramon Ganigué, Sara Ramió-Pujol, Lluís Bañeras, Gerard Jiménez, Manuela Hidalgo, M. Dolors Balaguer, Jesús Colprim, et Sebastià Puig. 2017. « Microbial electrosynthesis of butyrate from carbon dioxide: Production and extraction ». *Bioelectrochemistry* 117 (octobre): 57-64. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2017.06.004>.
- Baudler, Andre, Igor Schmidt, Markus Langner, Andreas Greiner, et Uwe Schroeder. 2015. « Does It Have to Be Carbon? Metal Anodes in Microbial Fuel Cells and Related Bioelectrochemical Systems ». *Energy & Environmental Science* 8 (7): 2048-55. <https://doi.org/10.1039/c5ee00866b>.

- Bencharit, Sira, et Mandy J. Ward. 2005. « Chemotactic Responses to Metals and Anaerobic Electron Acceptors in *Shewanella Oneidensis* MR-1 ». *Journal of Bacteriology* 187 (14): 5049-53. <https://doi.org/10.1128/JB.187.14.5049-5053.2005>.
- Biebl, Hanno, et Norbert Pfennig. 1978. « Growth Yields of Green Sulfur Bacteria in Mixed Cultures with Sulfur and Sulfate Reducing Bacteria ». *Archives of Microbiology* 117 (1): 9-16. <https://doi.org/10.1007/BF00689344>.
- Bjarnsholt, Thomas. 2013. « The Role of Bacterial Biofilms in Chronic Infections ». *APMIS. Supplementum*, n° 136 (mai): 1-51. <https://doi.org/10.1111/apm.12099>.
- Blanchet, Elise, François Duquenne, Yan Rafrafi, Luc Etcheverry, Benjamin Erable, et Alain Bergel. 2015. « Importance of the Hydrogen Route in Up-Scaling Electrosynthesis for Microbial CO₂ Reduction ». *Energy & Environmental Science* 8 (12): 3731-44. <https://doi.org/10.1039/C5EE03088A>.
- Blanchet, Elise, Benjamin Erable, Marie-Line De Solan, et Alain Bergel. 2016. « Two-dimensional carbon cloth and three-dimensional carbon felt perform similarly to form bioanode fed with food waste ». *Electrochemistry Communications* 66 (mai): 38-41. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2016.02.017>.
- Boles, B.R., and Horswill, A.R. (2008). agr-Mediated Dispersal of *Staphylococcus aureus* Biofilms. *PLOS Pathog.* 4, e1000052.
- Bond, Daniel R., Dawn E. Holmes, Leonard M. Tender, et Derek R. Lovley. 2002. « Electrode-Reducing Microorganisms That Harvest Energy from Marine Sediments ». *Science* 295 (5554): 483-85. <https://doi.org/10.1126/science.1066771>.
- Bond, Daniel R., et Derek R. Lovley. 2003. « Electricity Production by *Geobacter Sulfurreducens* Attached to Electrodes ». *Applied and Environmental Microbiology* 69 (3): 1548-55. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.3.1548-1555.2003>.
- Bosecker, Klaus. 1997. « Bioleaching: metal solubilization by microorganisms ». *FEMS Microbiology Reviews* 20 (3): 591-604. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(97\)00036-3](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(97)00036-3).
- Brown, Ian D., John G. Connolly, et G. A. Kerkut. 1981. « Galvanotaxic response of *tetrahymena vorax* ». *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology* 69 (2): 281-91. [https://doi.org/10.1016/0306-4492\(81\)90140-4](https://doi.org/10.1016/0306-4492(81)90140-4).
- Caccavo, F., Lonergan, D.J., Lovley, D.R., Davis, M., Stolz, J.F., and McInerney, M.J. (1994). *Geobacter sulfurreducens* sp. nov., a hydrogen- and acetate-oxidizing dissimilatory metal-reducing microorganism. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 3752–3759.
- Cerf, Olivier. 2002. « Risques bactériens liés aux produits laitiers ». *Revue Française des Laboratoires* 2002 (348): 67-69. [https://doi.org/10.1016/S0338-9898\(02\)80310-9](https://doi.org/10.1016/S0338-9898(02)80310-9).
- Cercado Quezada, B. (2009). Traitement de déchets issus de l'industrie agro-alimentaire par pile à combustible microbienne (Toulouse, INPT).
- Cercado, B., N. Byrne, M. Bertrand, D. Pocaznoi, M. Rimboud, W. Achouak, et A. Bergel. 2013. « Garden Compost Inoculum Leads to Microbial Bioanodes with Potential-Independent Characteristics. » *Bioresource Technology* 134 (avril): 276-84. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.123>.
- Chabert, N., Amin Ali, O., Achouak, W., 2015. All ecosystems potentially host electrogenic bacteria. *Bioelectrochemistry Amst. Neth.* 106, 88–96. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2015.07.004>
- Chae, K.-J., Choi, M.-J., Lee, J.-W., Kim, K.-Y., and Kim, I.S. (2009). Effect of different substrates on the performance, bacterial diversity, and bacterial viability in microbial fuel cells. *Bioresour. Technol.* 100, 3518–3525.
- Champigneux, P., Renault-Sentenac, C., Bourrier, D., Rossi, C., Delia, M.-L., and Bergel, A. (2018). Effect of surface nano/micro-structuring on the early formation of microbial anodes with

- Geobacter sulfurreducens: Experimental and theoretical approaches. *Bioelectrochemistry* 121, 191–200.
- Chaudhuri, Swades K., et Derek R. Lovley. 2003. « Electricity Generation by Direct Oxidation of Glucose in Mediatorless Microbial Fuel Cells ». *Nature Biotechnology* 21 (10): 1229–32. <https://doi.org/10.1038/nbt867>.
- Che, D, et J. C Desenclos. 2002. « L’alerte dans la surveillance actuelle des maladies infectieuses ». *Médecine et Maladies Infectieuses* 32 (12): 704–16. [https://doi.org/10.1016/S0399-077X\(02\)00457-2](https://doi.org/10.1016/S0399-077X(02)00457-2).
- Cheng, Shaoan, Hong Liu, et Bruce E. Logan. 2006. « Increased performance of single-chamber microbial fuel cells using an improved cathode structure ». *Electrochemistry Communications* 8 (3): 489–94. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2006.01.010>.
- Cheng, Shaoan, et Bruce E. Logan. 2007a. « Ammonia treatment of carbon cloth anodes to enhance power generation of microbial fuel cells ». *Electrochemistry Communications* 9 (3): 492–96. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2006.10.023>.
- . 2007b. « Sustainable and efficient biohydrogen production via electrohydrogenesis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (47): 18871–73. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706379104>.
- Chen, S., Hou, H., Harnisch, F., Patil, S.A., Carmona-Martinez, A.A., Agarwal, S., Zhang, Y., Sinha-Ray, S., Yarin, A.L., Greiner, A., et al. (2011a). Electrospun and solution blown three-dimensional carbon fiber nonwovens for application as electrodes in microbial fuel cells. *Energy Environ. Sci.* 4, 1417–1421.
- Chen, S., He, G., Carmona-Martinez, A.A., Agarwal, S., Greiner, A., Hou, H., and Schröder, U. (2011b). Electrospun carbon fiber mat with layered architecture for anode in microbial fuel cells. *Electrochem. Commun.* 13, 1026–1029.
- Chen, S., Liu, Q., He, G., Zhou, Y., Hanif, M., Peng, X., Wang, S., and Hou, H. (2012a). Reticulated carbon foam derived from a sponge-like natural product as a high-performance anode in microbial fuel cells. *J. Mater. Chem.* 22, 18609–18613.
- Chen, S., He, G., Liu, Q., Harnisch, F., Zhou, Y., Chen, Y., Hanif, M., Wang, S., Peng, X., Hou, H., et al. (2012b). Layered corrugated electrode macrostructures boost microbial bioelectrocatalysis. *Energy Environ. Sci.* 5, 9769–9772.
- Chen, W., Huang, Y.-X., Li, D.-B., Yu, H.-Q., and Yan, L. (2014a). Preparation of a macroporous flexible three dimensional graphene sponge using an ice-template as the anode material for microbial fuel cells. *RSC Adv.* 4, 21619–21624.
- Chen, Shanshan, Amelia-Elena Rotaru, Pravin Malla Shrestha, Nikhil S. Malvankar, Fanghua Liu, Wei Fan, Kelly P. Nevin, et Derek R. Lovley. 2014b. « Promoting Interspecies Electron Transfer with Biochar ». *Scientific Reports* 4 (mai): 5019. <https://doi.org/10.1038/srep05019>.
- Clauwaert, Peter, Peter Aelterman, The Hai Pham, Liesje De Schamphelaire, Marta Carballa, Korneel Rabaey, et Willy Verstraete. 2008. « Minimizing Losses in Bio-Electrochemical Systems: The Road to Applications ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 79 (6): 901–13. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1522-2>.
- Commault, Audrey S., Frédéric Barrière, Laure Lapinonnière, Gavin Lear, Solène Bouvier, et Richard J. Weld. 2015. « Influence of inoculum and anode surface properties on the selection of Geobacter-dominated biofilms ». *Bioresource Technology, Microbial Fuel Cells*, 195 (novembre): 265–72. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.06.141>.
- Cortese, Barbara, Ilaria Elena Palamà, Stefania D’Amone, et Giuseppe Gigli. 2014. « Influence of Electrotaxis on Cell Behaviour ». *Integrative Biology* 6 (9): 817–30. <https://doi.org/10.1039/C4IB00142G>.

- Costerton, J. W. 1999a. « Introduction to biofilm ». *International Journal of Antimicrobial Agents* 11 (3): 217-21. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(99\)00018-7](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(99)00018-7).
- Costerton, J. W., P. S. Stewart, et E. P. Greenberg. 1999b. « Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections ». *Science (New York, N.Y.)* 284 (5418): 1318-22.
- Cournet, Amandine, Marie-Line Délia, Alain Bergel, Christine Roques, et Mathieu Bergé. 2010. « Electrochemical reduction of oxygen catalyzed by a wide range of bacteria including Gram-positive ». *Electrochemistry Communications* 12 (4): 505-8. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2010.01.026>.
- Critchley, M. M., R. Pasetto, et R. J. O'Halloran. 2004. « Microbiological Influences in “Blue Water” Copper Corrosion ». *Journal of Applied Microbiology* 97 (3): 590-97. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02341.x>.
- Dalton, H. M., et P. E. March. 1998. « Molecular Genetics of Bacterial Attachment and Biofouling ». *Current Opinion in Biotechnology* 9 (3): 252-55.
- Debabov, V. G. 2008. « Electricity from Microorganisms ». *Microbiology* 77 (2): 123. <https://doi.org/10.1134/S002626170802001X>.
- Dewan, Alim, Haluk Beyenal, et Zbigniew Lewandowski. 2008. « Scaling up Microbial Fuel Cells ». *Environmental Science & Technology* 42 (20): 7643-48. <https://doi.org/10.1021/es800775d>.
- Dhar, B.R., Sim, J., Ryu, H., Ren, H., Santo Domingo, J.W., Chae, J., and Lee, H.-S. (2017). Microbial activity influences electrical conductivity of biofilm anode. *Water Res.* 127, 230–238.
- Djamgoz MBA, null, M. Mycielska, Z. Madeja, S. P. Fraser, et W. Korohoda. 2001. « Directional Movement of Rat Prostate Cancer Cells in Direct-Current Electric Field: Involvement of Voltagegated Na⁺ Channel Activity ». *Journal of Cell Science* 114 (Pt 14): 2697-2705.
- DJERIBI-MOUSSAOUI, S., T. JOUENNE, et R. DJERIBI. 2006. « Formation de biofilms sur les dispositifs intra-utérins (DIU) et risque d'infection pelvienne (IP) » 505-506: 13-17.
- Dryl, S., et A. Grębecki. 1966. « Progress in the Study of Excitation and Response in Ciliates ». *Protoplasma* 62 (2-3): 255-84. <https://doi.org/10.1007/BF01248088>.
- Dumas, Claire, Régine Basséguy, et Alain Bergel. 2008. « Electrochemical activity of *Geobacter sulfurreducens* biofilms on stainless steel anodes ». *Electrochimica Acta* 53 n° 16. (juin): 5235-5241, available on : http://oatao.univ-toulouse.fr/984/1/basseguy_984.pdf.
- Erable, Benjamin, et Alain Bergel. 2009. « First air-tolerant effective stainless steel microbial anode obtained from a natural marine biofilm ». *Bioresource Technology* 100 (13): 3302-7. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.02.025>.
- Erable, B., Etcheverry, L., Bergel, A., 2011. From microbial fuel cell (MFC) to microbial electrochemical snorkel (MES): maximizing chemical oxygen demand (COD) removal from wastewater. *Biofouling* 27, 319–326. <https://doi.org/10.1080/08927014.2011.564615>
- Erable, B., Byrne, N., Etcheverry, L., Achouak, W., and Bergel, A. (2017). Single medium microbial fuel cell: Stainless steel and graphite electrode materials select bacterial communities resulting in opposite electrocatalytic activities. *Int. J. Hydrog. Energy* 42, 26059–26067.
- Ericsson, Aaron Conrad, Daniel John Davis, Craig Lawrence Franklin, et Catherine Elizabeth Hagan. 2015. « Exoelectrogenic capacity of host microbiota predicts lymphocyte recruitment to the gut ». *Physiological Genomics* 47 (7): 243-52. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00010.2015>.
- Estevez-Canales, Marta, Antonio Berná, Zulema Borjas, et Abraham Esteve-Núñez. 2015. « Screen-Printed Electrodes: New Tools for Developing Microbial Electrochemistry at Microscale Level ». *Energies* 8 (11): 13211-21. <https://doi.org/10.3390/en8112366>.

- Feng, Yujie, Xin Wang, Bruce E. Logan, et He Lee. 2008. « Brewery Wastewater Treatment Using Air-Cathode Microbial Fuel Cells ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 78 (5): 873-80. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1360-2>.
- Feng, Yujie, Qiao Yang, Xin Wang, et Bruce E. Logan. 2010. « Treatment of carbon fiber brush anodes for improving power generation in air-cathode microbial fuel cells ». *Journal of Power Sources* 195 (7): 1841-44. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2009.10.030>.
- Flemming, H.-C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S.A., Kjelleberg, S., 2016. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat. Rev. Microbiol.* 14, 563-575. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94>
- Fornero, Jeffrey J., Miriam Rosenbaum, et Largus T. Angenent. 2010. « Electric Power Generation from Municipal, Food, and Animal Wastewaters Using Microbial Fuel Cells ». *Electroanalysis* 22 (7-8): 832-43. <https://doi.org/10.1002/elan.200980011>.
- Franks, Ashley E., Kelly P. Nevin, Hongfei Jia, Mounir Izallalen, Trevor L. Woodard, et Derek R. Lovley. 2008. « Novel Strategy for Three-Dimensional Real-Time Imaging of Microbial Fuel Cell Communities: Monitoring the Inhibitory Effects of Proton Accumulation within the Anode Biofilm ». *Energy & Environmental Science* 2 (1): 113-19. <https://doi.org/10.1039/B816445B>.
- Freguia, Stefano, Seiya Tsujimura, et Kenji Kano. 2010. « Electron transfer pathways in microbial oxygen biocathodes ». *Electrochimica Acta* 55 (3): 813-18. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2009.09.027>.
- Fuchs, S., T. Haritopoulou, et M. Wilhelmi. 1996. « Biofilms in freshwater ecosystems and their use as a pollutant monitor ». *Water Science and Technology, Water Quality International '96 Part 4*, 34 (7): 137-40. [https://doi.org/10.1016/S0273-1223\(96\)00735-4](https://doi.org/10.1016/S0273-1223(96)00735-4).
- Funk, Richard H. W. 2015. « Endogenous Electric Fields as Guiding Cue for Cell Migration ». *Frontiers in Physiology* 6. <https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00143>.
- Gao, Chongyang, Aijie Wang, Wei-Min Wu, Yalin Yin, et Yang-Guo Zhao. 2014. « Enrichment of anodic biofilm inoculated with anaerobic or aerobic sludge in single chambered air-cathode microbial fuel cells ». *Bioresource Technology* 167 (septembre): 124-32. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.05.120>.
- Garrett, Trevor Roger, Manmohan Bhakoo, et Zhibing Zhang. 2008. « Bacterial adhesion and biofilms on surfaces ». *Progress in Natural Science* 18 (9): 1049-56. <https://doi.org/10.1016/j.pnsc.2008.04.001>.
- Gil, G.-C., Chang, I.-S., Kim, B.-H., Kim, M., Jang, J.-K., Park, H.S., and Kim, H.-J. (2003). Operational parameters affecting the performance of a mediator-less microbial fuel cell. *Biosens. Bioelectron.* 18, 327-334.
- Gomes, I. B., M. Simões, et L. C. Simões. 2014. « An overview on the reactors to study drinking water biofilms ». *Water Research* 62 (octobre): 63-87. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.05.039>.
- Green, D.W., and Perry, R.H. (2007). *Perry's Chemical Engineers' Handbook*, Eighth Edition (New York, NY: McGraw-Hill Professional).
- Guo, Aihua, Bing Song, Brian Reid, Yu Gu, John V. Forrester, Colin A. B. Jahoda, et Min Zhao. 2010. « Effects of Physiological Electric Fields on Migration of Human Dermal Fibroblasts ». *The Journal of Investigative Dermatology* 130 (9): 2320-27. <https://doi.org/10.1038/jid.2010.96>.
- Guo, Kun, Stefano Freguia, Paul G. Dennis, Xin Chen, Bogdan C. Donose, Jurg Keller, J. Justin Gooding, et Korneel Rabaey. 2013. « Effects of Surface Charge and Hydrophobicity on Anodic Biofilm Formation, Community Composition, and Current Generation in Bioelectrochemical Systems ». *Environmental Science & Technology* 47 (13): 7563-70. <https://doi.org/10.1021/es400901u>.

- Guo, Kun, Antonin PrévotEAU, Sunil A Patil, et Korneel Rabaey. 2015. « Engineering electrodes for microbial electrocatalysis ». *Current Opinion in Biotechnology*, Environmental biotechnology • Energy biotechnology, 33 (juin): 149-56. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.02.014>.
- Guo, Kun, Antonin PrévotEAU, et Korneel Rabaey. 2017. « A novel tubular microbial electrolysis cell for high rate hydrogen production ». *Journal of Power Sources* 356 (juillet): 484-90. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2017.03.029>.
- Häder, D. P. 1977. « Influence of Electric Fields on Photophobic Reactions in Blue-Green Algae ». *Archives of Microbiology* 114 (1): 83-86.
- Hai, Faisal Ibney, Kazuo Yamamoto, et Kensuke Fukushi. 2007. « Hybrid Treatment Systems for Dye Wastewater ». *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 37 (4): 315-77. <https://doi.org/10.1080/10643380601174723>.
- Hao Yu, Eileen, Shaoan Cheng, Keith Scott, et Bruce Logan. 2007. « Microbial fuel cell performance with non-Pt cathode catalysts ». *Journal of Power Sources* 171 (2): 275-81. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2007.07.010>.
- Harris, H. W., M. Y. El-Naggar, O. Bretschger, M. J. Ward, M. F. Romine, A. Y. Obraztsova, et K. H. Nealson. 2010. « Electrokinesis is a microbial behavior that requires extracellular electron transport ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (1): 326-31. <https://doi.org/10.1073/pnas.0907468107>.
- Harnisch, F., and Schröder, U. (2009). Selectivity versus mobility: separation of anode and cathode in microbial bioelectrochemical systems. *ChemSusChem* 2, 921-926.
- Haynes, William M. 2014. *CRC Handbook of Chemistry and Physics, 95th Edition*. CRC Press.
- Haeger, Anna, Katarina Wolf, Mirjam M. Zegers, et Peter Friedl. 2015. « Collective Cell Migration: Guidance Principles and Hierarchies ». *Trends in Cell Biology* 25 (9): 556-66. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.06.003>.
- He, Zhen, Shelley D. Minter, et Largus T. Angenent. 2005. « Electricity Generation from Artificial Wastewater Using an Upflow Microbial Fuel Cell ». *Environmental Science & Technology* 39 (14): 5262-67. <https://doi.org/10.1021/es0502876>.
- Heijne, Annemiek Ter, Fei Liu, Renata van der Weijden, Jan Weijma, Cees J.N. Buisman, et Hubertus V.M. Hamelers. 2010. « Copper Recovery Combined with Electricity Production in a Microbial Fuel Cell ». *Environmental Science & Technology* 44 (11): 4376-81. <https://doi.org/10.1021/es100526g>.
- Helmenstine, Anne Marie, et Ph.D. s. d. « Know the Electrical Conductivity and Resistivity of Common Materials ». ThoughtCo. Consulté le 15 mai 2018. <https://www.thoughtco.com/table-of-electrical-resistivity-conductivity-608499>.
- Holmes, D. E., D. R. Bond, R. A. O'Neil, C. E. Reimers, L. R. Tender, et D. R. Lovley. 2004. « Microbial Communities Associated with Electrodes Harvesting Electricity from a Variety of Aquatic Sediments ». *Microbial Ecology* 48 (2): 178-90. <https://doi.org/10.1007/s00248-003-0004-4>.
- Hou, J., Liu, Z., Yang, S., and Zhou, Y. (2014). Three-dimensional macroporous anodes based on stainless steel fiber felt for high-performance microbial fuel cells. *J. Power Sources* 258, 204-209.
- Huang, Liping, et Bruce E. Logan. 2008. « Electricity Generation and Treatment of Paper Recycling Wastewater Using a Microbial Fuel Cell ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 80 (2): 349-55. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1546-7>.
- Huang, Ching-Wen, Ji-Yen Cheng, Meng-Hua Yen, et Tai-Horng Young. 2009. « Electrotaxis of Lung Cancer Cells in a Multiple-Electric-Field Chip ». *Biosensors & Bioelectronics* 24 (12): 3510-16. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2009.05.001>.
- Huang, Liping, Jingwen Chen, Xie Quan, et Fenglin Yang. 2010. « Enhancement of Hexavalent Chromium Reduction and Electricity Production from a Biocathode Microbial Fuel Cell ».

- Bioprocess and Biosystems Engineering* 33 (8): 937-45. <https://doi.org/10.1007/s00449-010-0417-7>.
- Huang, L., Li, X., Ren, Y., and Wang, X. (2016). A monolithic three-dimensional macroporous graphene anode with low cost for high performance microbial fuel cells. *RSC Adv.* 6, 21001–21010.
- Huq, Anwar, Chris A Whitehouse, Christopher J Grim, Munirul Alam, et Rita R Colwell. 2008. « Biofilms in water, its role and impact in human disease transmission ». *Current Opinion in Biotechnology, Energy biotechnology / Environmental biotechnology*, 19 (3): 244-47. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2008.04.005>.
- J W Costerton, K J Cheng, G G Geesey, T I Ladd, J C Nickel, M Dasgupta, et and T. J. Marrie. 1987. « Bacterial Biofilms in Nature and Disease ». *Annual Review of Microbiology* 41 (1): 435-64. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.41.100187.002251>.
- Janssen, Peter H. 2006. « Identifying the Dominant Soil Bacterial Taxa in Libraries of 16S rRNA and 16S rRNA Genes ». *Applied and Environmental Microbiology* 72 (3): 1719-28. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.3.1719-1728.2006>.
- Jia, Jianna, Yu Tang, Bingfeng Liu, Di Wu, Nanqi Ren, et Defeng Xing. 2013. « Electricity generation from food wastes and microbial community structure in microbial fuel cells ». *Bioresource Technology* 144 (septembre): 94-99. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.06.072>.
- Jia, Xiuqin, Zaihua He, Xin Zhang, et Xingjun Tian. 2016. « Carbon paper electrode modified with TiO₂ nanowires enhancement bioelectricity generation in microbial fuel cell ». *Synthetic Metals* 215 (mai): 170-75. <https://doi.org/10.1016/j.synthmet.2016.02.015>.
- Jiang, Yangyue, Yuan Xu, Qian Yang, Yingwen Chen, Shemin Zhu, et Shubao Shen. 2014. « Power Generation Using Polyaniline/Multi-Walled Carbon Nanotubes as an Alternative Cathode Catalyst in Microbial Fuel Cells ». *International Journal of Energy Research* 38 (11): 1416-23. <https://doi.org/10.1002/er.3155>.
- Jiang, H., Halverson, L.J., and Dong, L. (2015). A miniature microbial fuel cell with conducting nanofibers-based 3D porous biofilm. *J. Micromechanics Microengineering* 25, 125017.
- Jiang, Yun-Bin, Wen-Hui Zhong, Cheng Han, et Huan Deng. 2016. « Characterization of Electricity Generated by Soil in Microbial Fuel Cells and the Isolation of Soil Source Exoelectrogenic Bacteria ». *Frontiers in Microbiology* 7: 1776. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01776>.
- Jiang, Hongmei, Lu Yang, Wenfang Deng, Yueming Tan, et Qingji Xie. 2017. « Macroporous graphitic carbon foam decorated with polydopamine as a high-performance anode for microbial fuel cell ». *Journal of Power Sources* 363 (septembre): 27-33. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2017.07.064>.
- Jumas-Bilak, E., Roudière, L., and Marchandin, H. (2009). Description of “Synergistetes” phyl. nov. and emended description of the phylum “Deferribacteres” and of the family Syntrophomonadaceae, phylum “Firmicutes.” *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59, 1028–1035.
- Jung, Sokhee, et John M. Regan. 2007. « Comparison of Anode Bacterial Communities and Performance in Microbial Fuel Cells with Different Electron Donors ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 77 (2): 393-402. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1162-y>.
- Kaewkannetra, P., W. Chiwes, et T. Y. Chiu. 2011. « Treatment of cassava mill wastewater and production of electricity through microbial fuel cell technology ». *Fuel* 90 (8): 2746-50. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2011.03.031>.
- Kamada, T. 1929. « Control of galvanotropism in Paramecium ». *J. Fac. Sci. Imp. Univ. Tokyo, Sect. IV, Zoology* 2: 123-39.
- Karthikeyan, R., Wang, B., Xuan, J., Wong, J.W.C., Lee, P.K.H., and Leung, M.K.H. (2015). Interfacial electron transfer and bioelectrocatalysis of carbonized plant material as effective anode of microbial fuel cell. *Electrochimica Acta* 157, 314–323.

- Kato, Souichiro, Kazuhito Hashimoto, et Kazuya Watanabe. 2012. « Methanogenesis Facilitated by Electric Syntrophy via (Semi) Conductive Iron-Oxide Minerals ». *Environmental Microbiology* 14 (7): 1646-54. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02611.x>.
- Ketep, Stephanie F., Alain Bergel, Marie Bertrand, Wafa Achouak, et Eric Fourest. 2013. « Lowering the Applied Potential during Successive Scratching/Re-Inoculation Improves the Performance of Microbial Anodes for Microbial Fuel Cells ». *Bioresource Technology* 127 (janvier): 448-55. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.09.008>.
- Ketep, Stephanie F., Alain Bergel, Amandine Calmet, et Benjamin. Erable. 2014. « Stainless steel foam increases the current produced by microbial bioanodes in bioelectrochemical systems. » *Energy & Environmental Science* 7 (Copyright (C) 2015 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 1633-37. <https://doi.org/10.1039/c3ee44114h>.
- Kim, N., Y. Choi, S. Jung, et S. Kim. 2000. « Effect of Initial Carbon Sources on the Performance of Microbial Fuel Cells Containing *Proteus Vulgaris* ». *Biotechnology and Bioengineering* 70 (1): 109-14.
- Kim, Mi-Sun, et Yu-jin Lee. 2010. « Optimization of culture conditions and electricity generation using *Geobacter sulfurreducens* in a dual-chambered microbial fuel-cell ». *International Journal of Hydrogen Energy*, Asian Hydrogen Energy Conference 2009, 35 (23): 13028-34. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.04.061>.
- Kim, Beum Jun, Injun Chu, Sebastian Jusuf, Tiffany Kuo, Michaela A. TerAvest, Largus T. Angenent, et Mingming Wu. 2016. « Oxygen Tension and Riboflavin Gradients Cooperatively Regulate the Migration of *Shewanella Oneidensis* MR-1 Revealed by a Hydrogel-Based Microfluidic Device ». *Frontiers in Microbiology* 7: 1438. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01438>.
- Kimura, Z., and Okabe, S. (2013). Acetate oxidation by syntrophic association between *Geobacter sulfurreducens* and a hydrogen-utilizing exoelectrogen. *ISME J.* 7, 1472–1482.
- Koch, Christin, et Falk Harnisch. 2016. « Is There a Specific Ecological Niche for Electroactive Microorganisms? » *ChemElectroChem* 3 (9): 1282-95. <https://doi.org/10.1002/celec.201600079>.
- Kumar, G. Gnana, V. G. Sathiya Sarathi, et Kee Suk Nahm. 2013. « Recent advances and challenges in the anode architecture and their modifications for the applications of microbial fuel cells ». *Biosensors and Bioelectronics* 43 (mai): 461-75. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.12.048>.
- Kumar, Ravinder, Lakhveer Singh, A. W. Zularisam, et Faisal I. Hai. 2016. « Potential of Porous Co₃O₄ Nanorods as Cathode Catalyst for Oxygen Reduction Reaction in Microbial Fuel Cells ». *Bioresource Technology* 220 (novembre): 537-42. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.09.003>.
- . 2017a. « Microbial Fuel Cell Is Emerging as a Versatile Technology: A Review on Its Possible Applications, Challenges and Strategies to Improve the Performances ». *International Journal of Energy Research* 42 (2): 369-94. <https://doi.org/10.1002/er.3780>.
- Kumar, Amit, Leo Huan-Hsuan Hsu, Paul Kavanagh, Frédéric Barrière, Piet N. L. Lens, Laure Lapinonnière, John H. Lienhard V, Uwe Schröder, Xiaocheng Jiang, et Dónal Leech. 2017b. « The Ins and Outs of Microorganism–electrode Electron Transfer Reactions ». *Nature Reviews Chemistry* 1 (3): 0024. <https://doi.org/10.1038/s41570-017-0024>.
- Kumlanghan, Ampai, Jing Liu, Panote Thavarungkul, Proespichaya Kanatharana, et Bo Mattiasson. 2007. « Microbial fuel cell-based biosensor for fast analysis of biodegradable organic matter ». *Biosensors and Bioelectronics*, Chem and Biosensing Transistors: from materials to systems, 22 (12): 2939-44. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2006.12.014>.
- Lacroix, R., Silva, S.D., Gaig, M.V., Rousseau, R., Délia, M.-L., and Bergel, A. (2014). Modelling potential/current distribution in microbial electrochemical systems shows how the optimal bioanode architecture depends on electrolyte conductivity. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 16, 22892–22902.

- Lanthier, Martin, Kelvin B Gregory, et Derek R Lovley. 2008. « Growth with high planktonic biomass in *Shewanella oneidensis* fuel cells ». *Fems Microbiology Letters* 278 (1): 29-35. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00964.x>.
- Lee, Tae Kwon, Tuan Van Doan, Kyuseon Yoo, Soojung Choi, Changwon Kim, et Joonhong Park. 2010. « Discovery of Commonly Existing Anode Biofilm Microbes in Two Different Wastewater Treatment MFCs Using FLX Titanium Pyrosequencing ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 87 (6): 2335-43. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2680-6>.
- Lee, Jae Sun, D. S. Kim, Hyeon Jin Jeon, B. S. Park, Hee Jin Yang, M. S. Hyun, et M. Kim. 2015. « Microbial fuel cell as a biosensor to monitor various toxic metal substances in water ». In *2015 9th International Conference on Sensing Technology (ICST)*, 416-19. <https://doi.org/10.1109/ICSensT.2015.7438433>.
- Lefebvre, Olivier, Zi Tan, Yujia Shen, et How Y. Ng. 2013. « Optimization of a microbial fuel cell for wastewater treatment using recycled scrap metals as a cost-effective cathode material ». *Bioresource Technology* 127 (janvier): 158-64. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.005>.
- Lepage, G., Albernaz, F.O., Perrier, G., and Merlin, G. (2012). Characterization of a microbial fuel cell with reticulated carbon foam electrodes. *Bioresour. Technol.* 124, 199–207.
- Levi, Yves. 2001. « Écologie microbienne des réseaux d'eau potable et risque microbiologique : l'exemple de *Legionella pneumophila* ». *Revue Française des Laboratoires* 2001 (336): 33-37. [https://doi.org/10.1016/S0338-9898\(01\)80387-5](https://doi.org/10.1016/S0338-9898(01)80387-5).
- Levin, Michael. 2014. « Molecular bioelectricity: how endogenous voltage potentials control cell behavior and instruct pattern regulation in vivo ». *Molecular Biology of the Cell* 25 (24): 3835-50. <https://doi.org/10.1091/mbc.E13-12-0708>.
- Li, Zhongjian, Xingwang Zhang, et Lecheng Lei. 2008. « Electricity production during the treatment of real electroplating wastewater containing Cr6+ using microbial fuel cell ». *Process Biochemistry*, Bioenergy Production by Process Engineering Approach, 43 (12): 1352-58. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.08.005>.
- Li, Yan, Anhuai Lu, Hongrui Ding, Song Jin, Yunhua Yan, Changqiu Wang, Cuiping Zen, et Xin Wang. 2009. « Cr(VI) reduction at rutile-catalyzed cathode in microbial fuel cells ». *Electrochemistry Communications* 11 (7): 1496-99. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2009.05.039>.
- Li, Jing, et Francis Lin. 2011. « Microfluidic devices for studying chemotaxis and electrotaxis ». *Trends in Cell Biology* 21 (8): 489-97. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.05.002>.
- Li, Rui, James M. Tiedje, Chichia Chiu, et R. Mark Worden. 2012. « Soluble Electron Shuttles Can Mediate Energy Taxis toward Insoluble Electron Acceptors ». *Environmental Science & Technology* 46 (5): 2813-20. <https://doi.org/10.1021/es204302w>.
- Li, X., N. Zhu, Y. Wang, P. Li, P. Wu, et J. Wu. 2013. « Animal Carcass Wastewater Treatment and Bioelectricity Generation in Up-Flow Tubular Microbial Fuel Cells: Effects of HRT and Non-Precious Metallic Catalyst. » *Bioresource Technology* 128 (janvier): 454-60. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.053>.
- Light, Samuel H., Lin Su, Rafael Rivera-Lugo, Jose A. Cornejo, Alexander Louie, Anthony T. Iavarone, Caroline M. Ajo-Franklin, et Daniel A. Portnoy. 2018. « A Flavin-Based Extracellular Electron Transfer Mechanism in Diverse Gram-Positive Bacteria ». *Nature*, septembre, 1. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0498-z>.
- Lin, Francis, Fabio Baldessari, Christina Crenguta Gyenge, Tohru Sato, Robert D. Chambers, Juan G. Santiago, et Eugene C. Butcher. 2008. « Lymphocyte Electrotaxis in Vitro and in Vivo ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 181 (4): 2465-71.

- Lin, X., Nishio, K., Konno, T., and Ishihara, K. (2012). The effect of the encapsulation of bacteria in redox phospholipid polymer hydrogels on electron transfer efficiency in living cell-based devices. *Biomaterials* 33, 8221–8227.
- Liu, Hong, Shaoan Cheng, et Bruce E. Logan. 2005. « Production of Electricity from Acetate or Butyrate Using a Single-Chamber Microbial Fuel Cell ». *Environmental Science & Technology* 39 (2): 658-62. <https://doi.org/10.1021/es048927c>.
- Liu, Hong, Stephen Grot, et Bruce E. Logan. 2005. « Electrochemically Assisted Microbial Production of Hydrogen from Acetate ». *Environmental Science & Technology* 39 (11): 4317-20. <https://doi.org/10.1021/es050244p>.
- Liu, M., Zhou, M., Yang, H., Zhao, Y., and Hu, Y. (2015). A cost-effective polyurethane based activated carbon sponge anode for high-performance microbial fuel cells. *RSC Adv.* 5, 84269–84275.
- Liu, M., Zhou, M., Yang, H., Ren, G., and Zhao, Y. (2016). Titanium dioxide nanoparticles modified three dimensional ordered macroporous carbon for improved energy output in microbial fuel cells. *Electrochimica Acta* 190, 463–470.
- Liu, X., Du, X., Wang, X., Li, N., Xu, P., and Ding, Y. (2013). Improved microbial fuel cell performance by encapsulating microbial cells with a nickel-coated sponge. *Biosens. Bioelectron.* 41, 848–851.
- Liu, Y., Harnisch, F., Fricke, K., Sietmann, R., and Schröder, U. (2008). Improvement of the anodic bioelectrocatalytic activity of mixed culture biofilms by a simple consecutive electrochemical selection procedure. *Biosens. Bioelectron.* 24, 1006–1011.
- Liu, Y., Harnisch, F., Fricke, K., Schröder, U., Climent, V., and Feliu, J.M. (2010). The study of electrochemically active microbial biofilms on different carbon-based anode materials in microbial fuel cells. *Biosens. Bioelectron.* 25, 2167–2171.
- Lloyd, Jon R, Ching Leang, Allison L Hodges Myerson, Maddalena V Coppi, Stacey Cuifo, Barb Methe, Steven J Sandler, et Derek R Lovley. 2003. « Biochemical and genetic characterization of PpcA, a periplasmic c-type cytochrome in *Geobacter sulfurreducens*. » *Biochemical Journal* 369 (Pt 1): 153-61. <https://doi.org/10.1042/BJ20020597>.
- Logan, B.E., and Regan, J.M. (2006). Electricity-producing bacterial communities in microbial fuel cells. *Trends Microbiol.* 14, 512–518.
- Logan, Bruce E., Bert Hamelers, René Rozendal, Uwe Schröder, Jürg Keller, Stefano Freguia, Peter Aelterman, Willy Verstraete, et Korneel Rabaey. 2006. « Microbial Fuel Cells: Methodology and Technology ». *Environmental Science & Technology* 40 (17): 5181-92. <https://doi.org/10.1021/es0605016>.
- Logan, Bruce, Shaoan Cheng, Valerie Watson, et Garrett Estadt. 2007. « Graphite Fiber Brush Anodes for Increased Power Production in Air-Cathode Microbial Fuel Cells ». *Environmental Science & Technology* 41 (9): 3341-46. <https://doi.org/10.1021/es062644y>.
- Logan, B.E. (2009). Exoelectrogenic bacteria that power microbial fuel cells. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 375–381.
- Logan, Bruce E., Maxwell J. Wallack, Kyoung-Yeol Kim, Weihua He, Yujie Feng, et Pascal E. Saikaly. 2015. « Assessment of Microbial Fuel Cell Configurations and Power Densities ». Review-article. 3 août 2015. <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.5b00180>.
- Lovley, Derek. 2002. « Dissimilatory Metal Reduction : From Early Life to Bioremediation ». *ASM News* 68 (5). https://works.bepress.com/derek_lovley/189/.
- Lovley, D.R. (2006). Bug juice: harvesting electricity with microorganisms. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 497–508.
- Lovley, D.R., 2011. Reach out and touch someone: potential impact of DIET (direct interspecies energy transfer) on anaerobic biogeochemistry, bioremediation, and bioenergy. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 10, 101–105. <https://doi.org/10.1007/s11157-011-9236-9>

- Lovley, Derek R. 2012. « Electromicrobiology ». *Annual Review of Microbiology* 66 (1): 391-409. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092611-150104>.
- Lowy, Daniel A., et Leonard M. Tender. 2008. « Harvesting energy from the marine sediment–water interface: III. Kinetic activity of quinone- and antimony-based anode materials ». *Journal of Power Sources* 185 (1): 70-75. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2008.06.079>.
- Lu, Na, Shun-gui Zhou, Li Zhuang, Jin-tao Zhang, et Jin-ren Ni. 2009. « Electricity generation from starch processing wastewater using microbial fuel cell technology ». *Biochemical Engineering Journal* 43 (3): 246-51. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.10.005>.
- Ludloff, Karl. 1895. « Untersuchungen über den Galvanotropismus ». *Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere* 59 (11-12): 525-54. <https://doi.org/10.1007/BF01789963>.
- M. Verwoorn. 1896. « Die Polare Erregung Der Lebendigen Substanz Durch Den Konstanten Strom ». *Pflüger's Arch. ges. Physiol.*, 65: 47-62.
- Macnab, R. M., et D. E. Koshland. 1972. « The Gradient-Sensing Mechanism in Bacterial Chemotaxis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 69 (9): 2509-12.
- Malvankar, Nikhil S., Sibel Ebru Yalcin, Mark T. Tuominen, et Derek R. Lovley. 2014. « Visualization of Charge Propagation along Individual Pili Proteins Using Ambient Electrostatic Force Microscopy ». *Nature Nanotechnology* 9 (12): 1012-17. <https://doi.org/10.1038/nnano.2014.236>.
- Marshall, Christopher W., Daniel E. Ross, Erin B. Fichot, R. Sean Norman, et Harold D. May. 2013. « Long-term Operation of Microbial Electrosynthesis Systems Improves Acetate Production by Autotrophic Microbiomes ». *Environmental Science & Technology* 47 (11): 6023-29. <https://doi.org/10.1021/es400341b>.
- Martin, Daniel Yves. 2011. « Développement de biopiles pour la valorisation énergétique du lisier de porc ». <https://corpus.ulaval.ca/jspui/handle/20.500.11794/23888>.
- Massazza, D., Parra, R., Busalmen, J.P., and Romeo, H.E. (2015). New ceramic electrodes allow reaching the target current density in bioelectrochemical systems. *Energy Environ. Sci.* 8, 2707–2712.
- McCaig, Colin D., Ann M. Rajnicek, Bing Song, et Min Zhao. 2005. « Controlling Cell Behavior Electrically: Current Views and Future Potential ». *Physiological Reviews* 85 (3): 943-78. <https://doi.org/10.1152/physrev.00020.2004>.
- Mehanna, Maha, Regine Basseguy, Marie-Line Delia, et Alain Bergel. 2009. « Role of direct microbial electron transfer in corrosion of steels ». *Electrochemistry Communications* 11 (3): 568-71. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2008.12.019>.
- Miceli, Joseph F., Prathap Parameswaran, Dae-Wook Kang, Rosa Krajmalnik-Brown, et César I. Torres. 2012. « Enrichment and Analysis of Anode-Respiring Bacteria from Diverse Anaerobic Inocula ». *Environmental Science & Technology* 46 (18): 10349-55. <https://doi.org/10.1021/es301902h>.
- Michaelidou, Urania, Annemiek ter Heijne, Gerrit Jan W. Euverink, Hubertus V. M. Hamelers, Alfons J. M. Stams, et Jeanine S. Geelhoed. 2011. « Microbial Communities and Electrochemical Performance of Titanium-Based Anodic Electrodes in a Microbial Fuel Cell ». *Applied and Environmental Microbiology* 77 (3): 1069-75. <https://doi.org/10.1128/AEM.02912-09>.
- Min, Booki, JungRae Kim, SangEun Oh, John M. Regan, et Bruce E. Logan. 2005. « Electricity generation from swine wastewater using microbial fuel cells ». *Water Research* 39 (20): 4961-68. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.09.039>.

- Min, Booki, et Bruce E. Logan. 2004. « Continuous Electricity Generation from Domestic Wastewater and Organic Substrates in a Flat Plate Microbial Fuel Cell ». *Environmental Science & Technology* 38 (21): 5809-14. <https://doi.org/10.1021/es0491026>.
- Mohamed, Hend Omar, Mohamed Obaid, Enas Taha Sayed, Mohammad Ali Abdelkareem, Mira Park, Yanan Liu, Hak-Yong Kim, et Nasser A. M. Barakat. 2017. « Graphite Sheets as High-Performance Low-Cost Anodes for Microbial Fuel Cells Using Real Food Wastewater ». *Chemical Engineering & Technology* 40 (12): 2243-50. <https://doi.org/10.1002/ceat.201700058>.
- Murvanidze, G. V., et A. N. Glagolev. 1982. « Electrical Nature of the Taxis Signal in Cyanobacteria ». *Journal of Bacteriology* 150 (1): 239-44.
- Mycielska, Maria E., et Mustafa B. A. Djamgoz. 2004. « Cellular Mechanisms of Direct-Current Electric Field Effects: Galvanotaxis and Metastatic Disease ». *J Cell Sci* 117 (9): 1631-39. <https://doi.org/10.1242/jcs.01125>.
- Nancharaiyah, Y. V., S. Venkata Mohan, et P. N. L. Lens. 2015. « Metals removal and recovery in bioelectrochemical systems: A review ». *Bioresource Technology*, Microbial Fuel Cells, 195 (novembre): 102-14. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.06.058>.
- Nealson, K. H., D. P. Moser, et D. A. Saffarini. 1995. « Anaerobic Electron Acceptor Chemotaxis in *Shewanella Putrefaciens* ». *Applied and Environmental Microbiology* 61 (4): 1551-54.
- Nevin, K. P., H. Richter, S. F. Covalla, J. P. Johnson, T. L. Woodard, A. L. Orloff, H. Jia, M. Zhang, et D. R. Lovley. 2008. « Power Output and Columbic Efficiencies from Biofilms of *Geobacter Sulfurreducens* Comparable to Mixed Community Microbial Fuel Cells ». *Environmental Microbiology* 10 (10): 2505-14. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01675.x>.
- Niessen, Juliane, Falk Harnisch, Miriam Rosenbaum, Uwe Schröder, et Fritz Scholz. 2006. « Heat treated soil as convenient and versatile source of bacterial communities for microbial electricity generation ». *Electrochemistry Communications* 8 (5): 869-73. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2006.03.025>.
- Nimje, Vanita Roshan, Chien-Cheng Chen, Hau-Ren Chen, Chien-Yen Chen, Min-Jen Tseng, Kai-Chien Cheng, Ruey-Chyuan Shih, et Young-Fo Chang. 2012. « A Single-Chamber Microbial Fuel Cell without an Air Cathode ». *International Journal of Molecular Sciences* 13 (3): 3933-48. <https://doi.org/10.3390/ijms13033933>.
- Oh, Sang Eun, et Bruce E. Logan. 2005. « Hydrogen and Electricity Production from a Food Processing Wastewater Using Fermentation and Microbial Fuel Cell Technologies ». *Water Research* 39 (19): 4673-82. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.09.019>.
- Oliot, Manon, Sylvain Galier, Hélène Roux de Balman, et Alain Bergel. 2016. « Ion transport in microbial fuel cells: Key roles, theory and critical review ». *Applied Energy* 183 (décembre): 1682-1704. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2016.09.043>.
- Oliot, Manon, Poehere Chong, Benjamin Erable, et Alain Bergel. 2017. « Influence of the electrode size on microbial anode performance ». *Chemical Engineering Journal* 327 (novembre): 218-27. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.06.044>.
- Oliot, M., Erable, B., Solan, M.-L.D., and Bergel, A. (2017b). Increasing the temperature is a relevant strategy to form microbial anodes intended to work at room temperature. *Electrochimica Acta* 258, 134-142.
- Oliot, M., Etcheverry, L., Mosdale, A., Basseguy, R., Délia, M.-L., and Bergel, A. (2017c). Separator electrode assembly (SEA) with 3-dimensional bioanode and removable air-cathode boosts microbial fuel cell performance. *J. Power Sources* 356, 389-399.
- Oliot, M. (2017). Bio-ingénierie pour les piles à combustible microbiennes (Toulouse, INPT).

- Oram, Joseph, et Lars J. C. Jeuken. 2017. « Shewanella oneidensis MR-1 electron acceptor taxis and the perception of electrodes poised at oxidative potentials ». *Current Opinion in Electrochemistry* 5 (1): 99-105. <https://doi.org/10.1016/j.coelec.2017.07.013>.
- Pandey, Prashant, Vikas N. Shinde, Rajendra L. Deopurkar, Sharad P. Kale, Sunil A. Patil, et Deepak Pant. 2016. « Recent advances in the use of different substrates in microbial fuel cells toward wastewater treatment and simultaneous energy recovery ». *Applied Energy* 168 (avril): 706-23. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2016.01.056>.
- Pant, Deepak, Gilbert Van Bogaert, Ludo Diels, et Karolien Vanbroekhoven. 2010. « A review of the substrates used in microbial fuel cells (MFCs) for sustainable energy production ». *Bioresour. Technology* 101 (6): 1533-43. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.10.017>.
- Park, D. H., et J. G. Zeikus. 2000. « Electricity Generation in Microbial Fuel Cells Using Neutral Red as an Electronophore ». *Applied and Environmental Microbiology* 66 (4): 1292-97.
- Park, J. H., H. J. Kang, K. H. Park, et H. D. Park. 2018. « Direct Interspecies Electron Transfer via Conductive Materials: A Perspective for Anaerobic Digestion Applications. » *Bioresour. Technology* 254 (avril): 300-311. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.095>.
- Parot, S. (2007). Biofilms électroactifs : formation, caractérisation et mécanismes (Toulouse, INPT).
- Parot, S., Délia, M.-L., and Bergel, A. (2008a). Forming electrochemically active biofilms from garden compost under chronoamperometry. *Bioresour. Technol.* 99, 4809-4816.
- Parot, S., Délia, M.-L., and Bergel, A. (2008b). Acetate to enhance electrochemical activity of biofilms from garden compost. *Electrochimica Acta* 53, 2737-2742.
- Patil, Sunil A., Venkata Prasad Surakasi, Sandeep Koul, Shrikant Ijmulwar, Amar Vivek, Y. S. Shouche, et B. P. Kapadnis. 2009. « Electricity generation using chocolate industry wastewater and its treatment in activated sludge based microbial fuel cell and analysis of developed microbial community in the anode chamber ». *Bioresour. Technology* 100 (21): 5132-39. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.05.041>.
- Patil, Sunil A., Falk Harnisch, Balasaheb Kapadnis, et Uwe Schröder. 2010. « Electroactive mixed culture biofilms in microbial bioelectrochemical systems: The role of temperature for biofilm formation and performance ». *Biosensors and Bioelectronics* 26 (2): 803-8. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.06.019>.
- Patil, Sunil A., Falk Harnisch, Christin Koch, Thomas Hübschmann, Ingo Fetzer, Alessandro A. Carmona-Martínez, Susann Müller, et Uwe Schröder. 2011. « Electroactive mixed culture derived biofilms in microbial bioelectrochemical systems: The role of pH on biofilm formation, performance and composition ». *Bioresour. Technology* 102 (20): 9683-90. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.07.087>.
- Peixoto, Luciana, Booki Min, Gilberto Martins, António G. Brito, Pablo Kroff, Pier Parpot, Irini Angelidaki, et Regina Nogueira. 2011. « In situ microbial fuel cell-based biosensor for organic carbon ». *Bioelectrochemistry* 81 (2): 99-103. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2011.02.002>.
- Pfennig, N., et H. Biebl. 1976. « Desulfuromonas Acetoxidans Gen. Nov. and Sp. Nov., a New Anaerobic, Sulfur-Reducing, Acetate-Oxidizing Bacterium ». *Archives of Microbiology* 110 (1): 3-12.
- Pierra, Mélanie, Alessandro A. Carmona-Martínez, Eric Trably, Jean-Jacques Godon, et Nicolas Bernet. 2015. « Specific and efficient electrochemical selection of *Geoalkalibacter subterraneus* and *Desulfuromonas acetoxidans* in high current-producing biofilms ». *Bioelectrochemistry*, Special Issue on « Biological fuel cells », 106 (décembre): 221-25. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2015.02.003>.
- Pocaznoi, D. (2012). Optimisation d'anodes microbiennes à partir de lixiviat de sol pour la conception de piles à combustible microbiennes (Toulouse, INPT).

- Pocaznoi, D., Calmet, A., Etcheverry, L., Erable, B., and Bergel, A. (2012). Stainless steel is a promising electrode material for anodes of microbial fuel cells. *Energy Environ. Sci.* 5, 9645–9652.
- Pocaznoi, Diana, Benjamin Erable, Marie-Line Delia, et Alain Bergel. 2012. « Ultra Microelectrodes Increase the Current Density Provided by Electroactive Biofilms by Improving Their Electron Transport Ability ». *Energy & Environmental Science* 5 (1): 5287–96. <https://doi.org/10.1039/C1EE01469B>.
- Pocaznoi, Diana, Benjamin Erable, Luc Etcheverry, Marie-Line Delia, et Alain Bergel. 2012. « Forming Microbial Anodes under Delayed Polarisation Modifies the Electron Transfer Network and Decreases the Polarisation Time Required ». *Bioresource Technology* 114 (juin): 334–41. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.03.042>.
- Popat, S.C., and Torres, C.I. (2016). Critical transport rates that limit the performance of microbial electrochemistry technologies. *Bioresour. Technol.* 215, 265–273.
- Prigent-Combaret, C., E. Brombacher, O. Vidal, A. Ambert, P. Lejeune, P. Landini, et C. Dorel. 2001. « Complex Regulatory Network Controls Initial Adhesion and Biofilm Formation in Escherichia Coli via Regulation of the CsgD Gene ». *Journal of Bacteriology* 183 (24): 7213–23. <https://doi.org/10.1128/JB.183.24.7213-7223.2001>.
- Qiao, Y., Bao, S.-J., Li, C.M., Cui, X.-Q., Lu, Z.-S., and Guo, J. (2008). Nanostructured polyaniline/titanium dioxide composite anode for microbial fuel cells. *ACS Nano* 2, 113–119.
- Qin, Jinyi, Xiaohui Sun, Yang Liu, Tom Berthold, Hauke Harms, et Lukas Y. Wick. 2015. « Electrokinetic Control of Bacterial Deposition and Transport ». *Environmental Science & Technology* 49 (9): 5663–71. <https://doi.org/10.1021/es506245y>.
- Rabaey, Korneel, Nico Boon, Steven D. Siciliano, Marc Verhaege, et Willy Verstraete. 2004. « Biofuel Cells Select for Microbial Consortia That Self-Mediate Electron Transfer ». *Applied and Environmental Microbiology* 70 (9): 5373–82. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.9.5373-5382.2004>.
- Rabaey, I., W. Ossieur, M. Verhaege, et W. Verstraete. 2005. « Continuous Microbial Fuel Cells Convert Carbohydrates to Electricity ». *Water Science and Technology: A Journal of the International Association on Water Pollution Research* 52 (1-2): 515–23.
- Rabaey, Korneel, Nico Boon, Monica Höfte, et Willy Verstraete. 2005b. « Microbial Phenazine Production Enhances Electron Transfer in Biofuel Cells ». *Environmental Science & Technology* 39 (9): 3401–8. <https://doi.org/10.1021/es048563o>.
- Rabaey, Korneel, Lars Angenent, Uwe Schroder, et Jurg Keller. 2009. *Bioelectrochemical Systems*. IWA Publishing.
- Read, S.T., Dutta, P., Bond, P.L., Keller, J., and Rabaey, K. (2010). Initial development and structure of biofilms on microbial fuel cell anodes. *BMC Microbiol.* 10, 98.
- Reeser, Ryan J., Robert T. Medler, Stephen J. Billington, B. Helen Jost, et Lynn A. Joens. 2007. « Characterization of Campylobacter Jejuni Biofilms under Defined Growth Conditions ». *Appl. Environ. Microbiol.* 73 (6): 1908–13. <https://doi.org/10.1128/AEM.00740-06>.
- Reguera, G., Pollina, R.B., Nicoll, J.S., and Lovley, D.R. (2007). Possible Nonconductive Role of Geobacter sulfurreducens Pilus Nanowires in Biofilm Formation. *J. Bacteriol.* 189, 2125–2127.
- Reimers, Clare E., Hilmar A. Stecher, John C. Westall, Yvan Alleau, Kate A. Howell, Leslie Soule, Helen K. White, et Peter R. Girguis. 2007. « Substrate Degradation Kinetics, Microbial Diversity, and Current Efficiency of Microbial Fuel Cells Supplied with Marine Plankton ». *Applied and Environmental Microbiology* 73 (21): 7029–40. <https://doi.org/10.1128/AEM.01209-07>.
- Ren, H., Tian, H., Gardner, C.L., Ren, T.-L., and Chae, J. (2016). A miniaturized microbial fuel cell with three-dimensional graphene macroporous scaffold anode demonstrating a record power density of over 10 000 W m⁻³. *Nanoscale* 8, 3539–3547.

- Rendueles, O., and Ghigo, J.-M. (2012). Multi-species biofilms: how to avoid unfriendly neighbors. *FEMS Microbiol. Rev.* 36, 972–989.
- Richter, Hanno, Kevin McCarthy, Kelly P. Nevin, Jessica P. Johnson, Vincent M. Rotello, et Derek R. Lovley. 2008. « Electricity Generation by *Geobacter Sulfurreducens* Attached to Gold Electrodes ». *Langmuir: The ACS Journal of Surfaces and Colloids* 24 (8): 4376–79. <https://doi.org/10.1021/la703469y>.
- Rimboud, M., D. Pocaznoi, B. Erable, et A. Bergel. 2014. « Electroanalysis of Microbial Anodes for Bioelectrochemical Systems: Basics, Progress and Perspectives ». *Physical Chemistry Chemical Physics* 16 (31): 16349–66. <https://doi.org/10.1039/C4CP01698J>.
- Rinaudi, Luciana, Nancy A. Fujishige, Ann M. Hirsch, Erika Banchio, Angeles Zorreguieta, et Walter Giordano. 2006. « Effects of nutritional and environmental conditions on *Sinorhizobium meliloti* biofilm formation ». *Research in Microbiology* 157 (9): 867–75. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2006.06.002>.
- Ringeisen, Bradley R., Emily Henderson, Peter K. Wu, Jeremy Pietron, Ricky Ray, Brenda Little, Justin C. Biffinger, et Joanne M. Jones-Meehan. 2006. « High Power Density from a Miniature Microbial Fuel Cell Using *Shewanella oneidensis* DSP10 ». *Environmental Science & Technology* 40 (8): 2629–34. <https://doi.org/10.1021/es052254w>.
- Rismani-Yazdi, Hamid, Sarah M. Carver, Ann D. Christy, Zhongtang Yu, Kyle Bibby, Jordan Peccia, et Olli H. Tuovinen. 2013. « Suppression of methanogenesis in cellulose-fed microbial fuel cells in relation to performance, metabolite formation, and microbial population ». *Bioresource Technology* 129 (février): 281–88. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.137>.
- Roden, Eric E., et Derek R. Lovley. 1993. « Dissimilatory Fe(III) Reduction by the Marine Microorganism *Desulfuromonas acetoxidans* ». *Applied and Environmental Microbiology* 59 (3): 734–42.
- Rodrigo, M. A., P. Cañizares, J. Lobato, R. Paz, C. Sáez, et J. J. Linares. 2007. « Production of electricity from the treatment of urban waste water using a microbial fuel cell ». *Journal of Power Sources*, CONAPPICE 2006, 169 (1): 198–204. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2007.01.054>.
- Rothballer, M., Picot, M., Sieper, T., Arends, J.B.A., Schmid, M., Hartmann, A., Boon, N., Buisman, C.J.N., Barrière, F., and Strik, D.P.B.T.B. (2015). Monophyletic group of unclassified γ -Proteobacteria dominates in mixed culture biofilm of high-performing oxygen reducing biocathode. *Bioelectrochemistry* 106, 167–176.
- Rousseau, R., Dominguez-Benetton, X., Délia, M.-L., and Bergel, A. (2013). Microbial bioanodes with high salinity tolerance for microbial fuel cells and microbial electrolysis cells. *Electrochem. Commun.* 33, 1–4.
- Rozendal, René A., Hubertus V. M. Hamelers, Korneel Rabaey, Jurg Keller, et Cees J. N. Buisman. 2008. « Towards practical implementation of bioelectrochemical wastewater treatment ». *Trends in Biotechnology* 26 (8): 450–59. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.04.008>.
- Santoro, Carlo, Catia Arbizzani, Benjamin Erable, et Ioannis Ieropoulos. 2017. « Microbial fuel cells: From fundamentals to applications. A review ». *Journal of Power Sources* 356 (juillet): 225–44. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2017.03.109>.
- Sato, Masayuki J., Michihito Ueda, Hiroaki Takagi, Tomonobu M. Watanabe, Toshio Yanagida, et Masahiro Ueda. 2007. « Input–output relationship in galvanotactic response of *Dictyostelium* cells ». *Biosystems*, BIOCAMP 2005: Selected papers presented at the International Conference - Diffusion Processes in Neurobiology and Subcellular Biology, 88 (3): 261–72. <https://doi.org/10.1016/j.biosystems.2006.06.008>.
- Sato, Masayuki J., Hidekazu Kuwayama, Wouter N. van Egmond, Airi L. K. Takayama, Hiroaki Takagi, Peter J. M. van Haastert, Toshio Yanagida, et Masahiro Ueda. 2009. « Switching Direction in Electric-Signal-Induced Cell Migration by Cyclic Guanosine Monophosphate and

- Phosphatidylinositol Signaling ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (16): 6667-72. <https://doi.org/10.1073/pnas.0809974106>.
- Schröder, U., Harnisch, F., Angenent, L.T., 2015. Microbial electrochemistry and technology: terminology and classification. *Energy Environ. Sci.* 8, 513-519. <https://doi.org/10.1039/C4EE03359K>
- Schweinitzer, Tobias, et Christine Josenhans. 2010. « Bacterial energy taxis: a global strategy? » *Archives of Microbiology* 192 (7): 507-20. <https://doi.org/10.1007/s00203-010-0575-7>.
- Scott, K., G. A. Rambu, K. P. Katuri, K. K. Prasad, et I. M. Head. 2007a. « Application of Modified Carbon Anodes in Microbial Fuel Cells ». *Process Safety and Environmental Protection* 85 (5): 481-88. <https://doi.org/10.1205/psep07018>.
- Scott, K., and Sun, Y.-P. (2007b). Approximate Analytical Solutions for Models of Three-Dimensional Electrodes by Adomian's Decomposition Method. In *Modern Aspects Of Electrochemistry*, (Springer, New York, NY), pp. 221-304.
- Scotto, V, et M. E Lai. 1998. « The ennoblement of stainless steels in seawater: a likely explanation coming from the field ». *Corrosion Science* 40 (6): 1007-18. [https://doi.org/10.1016/S0010-938X\(98\)00038-9](https://doi.org/10.1016/S0010-938X(98)00038-9).
- Sekoulov, I., et S. Brinke-Seiferth. 1999. « Application of biofiltration in the crude oil processing industry ». *Water Science and Technology* 39 (8): 71-76. [https://doi.org/10.1016/S0273-1223\(99\)00187-0](https://doi.org/10.1016/S0273-1223(99)00187-0).
- Shanley, Lynne J., Petr Walczysko, Mary Bain, David J. MacEwan, et Min Zhao. 2006. « Influx of Extracellular Ca²⁺ Is Necessary for Electrotaxis in Dictyostelium ». *Journal of Cell Science* 119 (Pt 22): 4741-48. <https://doi.org/10.1242/jcs.03248>.
- Shi, Liang, Thomas C. Squier, John M. Zachara, et James K. Fredrickson. 2007. « Respiration of Metal (Hydr)Oxides by Shewanella and Geobacter: A Key Role for Multihaem c-Type Cytochromes ». *Molecular Microbiology* 65 (1): 12-20. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05783.x>.
- Shi, W., B. A. Stocker, et J. Adler. 1996. « Effect of the Surface Composition of Motile Escherichia Coli and Motile Salmonella Species on the Direction of Galvanotaxis ». *Journal of Bacteriology* 178 (4): 1113-19.
- Shukla, A. K., P. Suresh, S. Berchmans, et A. Rajendran. 2004. « Biological Fuel Cells and Their Applications ». *Current Science* 87 (août): 455-68.
- Solano, C., Echeverz, M., and Lasa, I. (2014). Biofilm dispersion and quorum sensing. *Curr. Opin. Microbiol.* 18, 96-104.
- Somerscales, E. F. C., et Rensselaer Polytechnic Institute. 1981. *Fouling of Heat Transfer Equipment*. Hemisphere Pub. Corp.
- Soussan, Laurence, Benjamin Erable, Marie-Line Delia, et Alain Bergel. 2013. « The open circuit potential of Geobacter sulfurreducens bioanodes depends on the electrochemical adaptation of the strain ». *Electrochemistry Communications* 33 (août): 35-38. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2013.04.013>.
- Speight, James G., et Nour Shafik El-Gendy. 2018. « Chapter 10 - Bioremediation of Contaminated Soil ». In *Introduction to Petroleum Biotechnology*, 361-417. Boston: Gulf Professional Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805151-1.00010-2>.
- Srey, Sokunrotanak, Iqbal Kabir Jahid, et Sang-Do Ha. 2013. « Biofilm formation in food industries: A food safety concern ». *Food Control* 31 (2): 572-85. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.12.001>.
- Steidl, Rebecca J., Sanela Lampa-Pastirk, et Gemma Reguera. 2016. « Mechanistic Stratification in Electroactive Biofilms of Geobacter Sulfurreducens Mediated by Pilus Nanowires ». *Nature Communications* 7 (août): 12217. <https://doi.org/10.1038/ncomms12217>.

- Strycharz-Glaven, Sarah M., Rachel M. Snider, Anthony Guiseppi-Elie, et Leonard M. Tender. 2011. « On the Electrical Conductivity of Microbial Nanowires and Biofilms ». *Energy & Environmental Science* 4 (11): 4366-79. <https://doi.org/10.1039/C1EE01753E>.
- Strycharz, Sarah M., Anthony P. Malanoski, Rachel M. Snider, Hana Yi, Derek R. Lovley, et Leonard M. Tender. 2011b. « Application of Cyclic Voltammetry to Investigate Enhanced Catalytic Current Generation by Biofilm-Modified Anodes of *Geobacter Sulfurreducens* Strain DL1 vs. Variant Strain KN400 ». *Energy & Environmental Science* 4 (3): 896-913. <https://doi.org/10.1039/C0EE00260G>.
- Su, Wentao, Lixia Zhang, Daping Li, Guoqiang Zhan, Junwei Qian, et Yong Tao. 2012. « Dissimilatory Nitrate Reduction by *Pseudomonas Alcaliphila* with an Electrode as the Sole Electron Donor ». *Biotechnology and Bioengineering* 109 (11): 2904-10. <https://doi.org/10.1002/bit.24554>.
- Sun, Juan-Juan, Hua-Zhang Zhao, Qin-Zheng Yang, Juan Song, et An Xue. 2010. « A novel layer-by-layer self-assembled carbon nanotube-based anode: Preparation, characterization, and application in microbial fuel cell ». *Electrochimica Acta* 55 (9): 3041-47. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2009.12.103>.
- Sun, Y., Wei, J., Liang, P., and Huang, X. (2011). Electricity generation and microbial community changes in microbial fuel cells packed with different anodic materials. *Bioresour. Technol.* 102, 10886–10891.
- Sutherland, I. W. 2001. « The Biofilm Matrix--an Immobilized but Dynamic Microbial Environment ». *Trends in Microbiology* 9 (5): 222-27.
- Symposium, Society for General Microbiology, et Society for General Microbiology. 1990. *Biology of the Chemotactic Response*. Cambridge University Press.
- Tandukar, Madan, Samuel J. Huber, Takashi Onodera, et Spyros G. Pavlostathis. 2009. « Biological Chromium(VI) Reduction in the Cathode of a Microbial Fuel Cell ». *Environmental Science & Technology* 43 (21): 8159-65. <https://doi.org/10.1021/es9014184>.
- Tang, Xinhua, Kun Guo, Haoran Li, Zhuwei Du, et Jinglei Tian. 2011. « Electrochemical treatment of graphite to enhance electron transfer from bacteria to electrodes ». *Bioresour. Technol.* 102 (3): 3558-60. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.09.022>.
- Tao, Hu-Chun, Min Liang, Wei Li, Li-Juan Zhang, Jin-Ren Ni, et Wei-Min Wu. 2011. « Removal of copper from aqueous solution by electrodeposition in cathode chamber of microbial fuel cell ». *Journal of Hazardous Materials* 189 (1): 186-92. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.02.018>.
- Taylor, B. L., I. B. Zhulin, et M. S. Johnson. 1999. « Aerotaxis and Other Energy-Sensing Behavior in Bacteria ». *Annual Review of Microbiology* 53: 103-28. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.53.1.103>.
- Tender, Leonard M., Clare E. Reimers, Hilmar A. Stecher, Dawn E. Holmes, Daniel R. Bond, Daniel A. Lowy, Kanoelani Pilobello, Stephanie J. Fertig, et Derek R. Lovley. 2002. « Harnessing microbially generated power on the seafloor. » *Nature Biotechnology* 20 (Copyright (C) 2015 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 821-25. <https://doi.org/10.1038/nbt716>.
- Tender, Leonard M., Sam A. Gray, Ethan Groveman, Daniel A. Lowy, Peter Kauffman, Julio Melhado, Robert C. Tyce, Darren Flynn, Rose Petrecca, et Joe Dobarro. 2008. « The first demonstration of a microbial fuel cell as a viable power supply: Powering a meteorological buoy ». *Journal of Power Sources* 179 (2): 571-75. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2007.12.123>.
- Torres, César I., Andrew Kato Marcus, et Bruce E. Rittmann. 2008. « Proton Transport inside the Biofilm Limits Electrical Current Generation by Anode-Respiring Bacteria ». *Biotechnology and Bioengineering* 100 (5): 872-81. <https://doi.org/10.1002/bit.21821>.

- Torsvik, V., R. Sørheim, et J. Goksøyr. 1996. « Total Bacterial Diversity in Soil and Sediment Communities—A Review ». *Journal of Industrial Microbiology* 17 (3): 170-78. <https://doi.org/10.1007/BF01574690>.
- Trollinger, Donna R., R. Rivkah Isseroff, et Richard Nuccitelli. 2002. « Calcium Channel Blockers Inhibit Galvanotaxis in Human Keratinocytes ». *Journal of Cellular Physiology* 193 (1): 1-9. <https://doi.org/10.1002/jcp.10144>.
- Tsai, Hung-Yin, Chen-Chang Wu, Chi-Yuan Lee, et Eric Pierre Shih. 2009. « Microbial Fuel Cell Performance of Multiwall Carbon Nanotubes on Carbon Cloth as Electrodes ». *Journal of Power Sources* 194 (1): 199-205. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2009.05.018>.
- Venkata Mohan, S., G. Velvizhi, J. Annie Modestra, et S. Srikanth. 2014. « Microbial fuel cell: Critical factors regulating bio-catalyzed electrochemical process and recent advancements ». *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 40 (décembre): 779-97. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.07.109>.
- Verworn M. 1889. *Die polare Erregung der Protisten durch den galvanischen Strom*. Vol. 46. 267 vol. Pflugers Arch. Ges. Physiol. Menschen Tiere.
- Vladimirov, Nikita, et Victor Sourjik. 2009. « Chemotaxis: How Bacteria Use Memory ». *Biological Chemistry* 390 (11): 1097-1104. <https://doi.org/10.1515/BC.2009.130>.
- Wahlund, T. M., et M. T. Madigan. 1993. « Nitrogen Fixation by the Thermophilic Green Sulfur Bacterium *Chlorobium Tepidum* ». *Journal of Bacteriology* 175 (2): 474-78.
- Wahlund, T. M., et F. R. Tabita. 1997. « The Reductive Tricarboxylic Acid Cycle of Carbon Dioxide Assimilation: Initial Studies and Purification of ATP-Citrate Lyase from the Green Sulfur Bacterium *Chlorobium Tepidum*. » *Journal of Bacteriology* 179 (15): 4859-67. <https://doi.org/10.1128/jb.179.15.4859-4867.1997>.
- Wang, Gang, Liping Huang, et Yifeng Zhang. 2008. « Cathodic Reduction of Hexavalent Chromium [Cr(VI)] Coupled with Electricity Generation in Microbial Fuel Cells ». *Biotechnology Letters* 30 (11): 1959-66. <https://doi.org/10.1007/s10529-008-9792-4>.
- Wang, Jianlong, et Can Chen. 2009. « Biosorbents for heavy metals removal and their future ». *Biotechnology Advances* 27 (2): 195-226. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.11.002>.
- Wang, Xin, Shaoan Cheng, Yujie Feng, Matthew D. Merrill, Tomonori Saito, et Bruce E. Logan. 2009b. « Use of Carbon Mesh Anodes and the Effect of Different Pretreatment Methods on Power Production in Microbial Fuel Cells ». *Environmental Science & Technology* 43 (17): 6870-74. <https://doi.org/10.1021/es900997w>.
- Wang, H., Wang, G., Ling, Y., Qian, F., Song, Y., Lu, X., Chen, S., Tong, Y., and Li, Y. (2013). High power density microbial fuel cell with flexible 3D graphene-nickel foam as anode. *Nanoscale* 5, 10283–10290.
- Wang, Haiping, Sunny C. Jiang, Yun Wang, et Bo Xiao. 2013b. « Substrate removal and electricity generation in a membrane-less microbial fuel cell for biological treatment of wastewater ». *Bioresource Technology* 138 (juin): 109-16. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.03.172>.
- Wang, Heming, et Zhiyong Jason Ren. 2013c. « A comprehensive review of microbial electrochemical systems as a platform technology ». *Biotechnology Advances* 31 (8): 1796-1807. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.10.001>.
- Wang, Y.-Q., Huang, H.-X., Li, B., and Li, W.-S. (2015). Novelty developed three-dimensional carbon scaffold anodes from polyacrylonitrile for microbial fuel cells. *J. Mater. Chem. A* 3, 5110–5118.
- Wei, Jincheng, Peng Liang, et Xia Huang. 2011. « Recent progress in electrodes for microbial fuel cells ». *Bioresource Technology* 102 (20): 9335-44. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.07.019>.

- Weibull Claes. 1950. « Electrophoretic and Titrimetric Measurements on Bacterial Flagella. » *Acta Chemica Scandinavica* 4: 260–67. <https://doi.org/10.3891/acta.chem.scand.04-0260>.
- Wigginton, Nicholas S., Kevin M. Rosso, Brian H. Lower, Liang Shi, et Michael F. Hochella. 2007. « Electron tunneling properties of outer-membrane decaheme cytochromes from *Shewanella oneidensis* ». *Geochimica et Cosmochimica Acta* 71 (3): 543–55. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2006.10.002>.
- Wingender, Jost, Thomas R. Neu, et Hans-Curt Flemming, éd. 1999. *Microbial Extracellular Polymeric Substances: Characterization, Structure and Function*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag. <http://www.springer.com/la/book/9783642642777>.
- Wilke, C.R., and Chang, P. (1955). Correlation of diffusion coefficients in dilute solutions. *AIChE J.* 1, 264–270.
- Wrighton, Kelly C., Peter Agbo, Falk Warnecke, Karrie A. Weber, Eoin L. Brodie, Todd Z. DeSantis, Philip Hugenholtz, Gary L. Andersen, et John D. Coates. 2008. « A Novel Ecological Role of the Firmicutes Identified in Thermophilic Microbial Fuel Cells ». *The ISME Journal* 2 (11): 1146–56. <https://doi.org/10.1038/ismej.2008.48>.
- Xie, X., Yu, G., Liu, N., Bao, Z., Criddle, C.S., and Cui, Y. (2012a). Graphene–sponges as high-performance low-cost anodes for microbial fuel cells. *Energy Environ. Sci.* 5, 6862–6866.
- Xie, X., Meng, Y., and Yi, C. (2012b). Carbon nanotube-coated macroporous sponge for microbial fuel cell electrodes. 5265–5270.
- Xie, X., Criddle, C., and Cui, Y. (2015). Design and fabrication of bioelectrodes for microbial bioelectrochemical systems. *Energy Environ. Sci.* 8, 3418–3441.
- Xiao, Yong, Yue Zheng, Song Wu, En-Hua Zhang, Zheng Chen, Peng Liang, Xia Huang, et al. 2015. « Pyrosequencing Reveals a Core Community of Anodic Bacterial Biofilms in Bioelectrochemical Systems from China ». *Frontiers in Microbiology* 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01410>.
- Yamashita, T., Ishida, M., Asakawa, S., Kanamori, H., Sasaki, H., Ogino, A., Katayose, Y., Hatta, T., and Yokoyama, H. (2016). Enhanced electrical power generation using flame-oxidized stainless steel anode in microbial fuel cells and the anodic community structure. *Biotechnol. Biofuels* 9, 62.
- Yang, Y., Liu, T., Zhu, X., Zhang, F., Ye, D., Liao, Q., and Li, Y. (2016). Boosting Power Density of Microbial Fuel Cells with 3D Nitrogen-Doped Graphene Aerogel Electrode. *Adv. Sci.* 3.
- Yates, Matthew D, Patrick D Kiely, Douglas F Call, Hamid Rismani-Yazdi, Kyle Bibby, Jordan Peccia, John M Regan, et Bruce E Logan. 2012. « Convergent development of anodic bacterial communities in microbial fuel cells ». *The ISME Journal* 6 (11): 2002–13. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.42>.
- Yoshida, N., K. Yano, T. Morita, S. J. McNiven, H. Nakamura, et I. Karube. 2000. « A Mediator-Type Biosensor as a New Approach to Biochemical Oxygen Demand Estimation ». *Analyst* 125 (12): 2280–84. <https://doi.org/10.1039/B005995L>.
- Yoshizawa, Tomoya, Morio Miyahara, Atsushi Kouzuma, et Kazuya Watanabe. 2014. « Conversion of Activated-Sludge Reactors to Microbial Fuel Cells for Wastewater Treatment Coupled to Electricity Generation ». *Journal of Bioscience and Bioengineering* 118 (5): 533–39. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2014.04.009>.
- Yuan, Y., Zhou, S., Liu, Y., and Tang, J. (2013). Nanostructured macroporous bioanode based on polyaniline-modified natural loofah sponge for high-performance microbial fuel cells. *Environ. Sci. Technol.* 47, 14525–14532.
- Zeng, L., Zhao, S., and He, M. (2018). Macroscale porous carbonized polydopamine-modified cotton textile for application as electrode in microbial fuel cells. *J. Power Sources* 376, 33–40.

- Zhang, Xiaoyuan, Shaoan Cheng, Xin Wang, Xia Huang, et Bruce E. Logan. 2009. « Separator Characteristics for Increasing Performance of Microbial Fuel Cells ». *Environmental Science & Technology* 43 (21): 8456-61. <https://doi.org/10.1021/es901631p>.
- Zhang, Fang, Tomonori Saito, Shaoan Cheng, Michael A. Hickner, et Bruce E. Logan. 2010. « Microbial Fuel Cell Cathodes With Poly(dimethylsiloxane) Diffusion Layers Constructed around Stainless Steel Mesh Current Collectors ». *Environmental Science & Technology* 44 (4): 1490-95. <https://doi.org/10.1021/es903009d>.
- Zhang, T., L. Zhang, W. Su, P. Gao, D. Li, X. He, et Y. Zhang. 2011. « The Direct Electrocatalysis of Phenazine-1-Carboxylic Acid Excreted by Pseudomonas Alcaliphila under Alkaline Condition in Microbial Fuel Cells. » *Bioresource Technology* 102 (14): 7099-7102. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.04.093>.
- Zhang, Baogang, Chuanping Feng, Jinren Ni, Jing Zhang, et Wenli Huang. 2012a. « Simultaneous reduction of vanadium (V) and chromium (VI) with enhanced energy recovery based on microbial fuel cell technology ». *Journal of Power Sources* 204 (avril): 34-39. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2012.01.013>.
- Zhang, Li-Juan, Hu-Chun Tao, Xue-Yan Wei, Tao Lei, Jin-Bo Li, Ai-Jie Wang, et Wei-Min Wu. 2012b. « Bioelectrochemical Recovery of Ammonia-Copper(II) Complexes from Wastewater Using a Dual Chamber Microbial Fuel Cell ». *Chemosphere* 89 (10): 1177-82. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.08.011>.
- Zhang, G., Zhao, Q., Jiao, Y., Wang, K., Lee, D.-J., and Ren, N. (2012c). Biocathode microbial fuel cell for efficient electricity recovery from dairy manure. *Biosens. Bioelectron.* 31, 537–543.
- Zhang, Guodong, Qingliang Zhao, Yan Jiao, Kun Wang, Duu-Jong Lee, et Nanqi Ren. 2012d. « Efficient electricity generation from sewage sludge using biocathode microbial fuel cell ». *Water Research* 46 (1): 43-52. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.10.036>.
- Zhang, Jingxin, Yaobin Zhang, Xie Quan, Shuo Chen, et Shahzad Afzal. 2013. « Enhanced anaerobic digestion of organic contaminants containing diverse microbial population by combined microbial electrolysis cell (MEC) and anaerobic reactor under Fe(III) reducing conditions ». *Bioresource Technology* 136 (mai): 273-80. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.02.103>.
- Zhang, Xiaoyuan, Deepak Pant, Fang Zhang, Jia Liu, Weihua He, et Bruce E. Logan. 2014. « Long-Term Performance of Chemically and Physically Modified Activated Carbons in Air Cathodes of Microbial Fuel Cells ». *ChemElectroChem* 1 (11): 1859-66. <https://doi.org/10.1002/celc.201402123>.
- Zhao, Min, Huai Bai, Entong Wang, John V. Forrester, et Colin D. McCaig. 2004. « Electrical stimulation directly induces pre-angiogenic responses in vascular endothelial cells by signaling through VEGF receptors ». *Journal of cell science* 117 (Pt 3): 397-405. <https://doi.org/10.1242/jcs.00868>.
- Zhao, Feng, Nelli Rahunen, John R. Varcoe, Amreesh Chandra, Claudio Avignone-Rossa, Alfred E. Thumser, et Robert C. T. Slade. 2008. « Activated Carbon Cloth as Anode for Sulfate Removal in a Microbial Fuel Cell ». *Environmental Science & Technology* 42 (13): 4971-76. <https://doi.org/10.1021/es8003766>.
- Zhao, S., Li, Y., Yin, H., Liu, Z., Luan, E., Zhao, F., Tang, Z., and Liu, S. (2015). Three-dimensional graphene/Pt nanoparticle composites as freestanding anode for enhancing performance of microbial fuel cells. *Sci. Adv.* 1, e1500372.
- Zhu, Nengwu, Xi Chen, Ting Zhang, Pingxiao Wu, Ping Li, et Jinhua Wu. 2011. « Improved Performance of Membrane Free Single-Chamber Air-Cathode Microbial Fuel Cells with Nitric Acid and Ethylenediamine Surface Modified Activated Carbon Fiber Felt Anodes ». *Bioresource Technology* 102 (1): 422-26. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.046>.

Zobell, Claude E. 1943. « The Effect of Solid Surfaces upon Bacterial Activity¹ ». *Journal of Bacteriology* 46 (1): 39-56.

Annexes

ANNEXE 1 : « Supplementary Data » de l'article *Microbial anodes : what actually occurs inside pores ?*

Composition of the macronutrients solution	
NH ₄ Cl	28g/L
MgSO ₄ x 7H ₂ O	10g/L
CaCl ₂ x 2H ₂ O	0,57g/L
Composition of the micronutrients solution	
FeCl ₂ x 4H ₂ O	2g/L
CoCl ₂ x 6H ₂ O	1g/L
MnCl ₂ x 4H ₂ O	0,5g/L
ZnCl ₂ x 2H ₂ O	0,05g/L
H ₃ BO ₃	0,05g/L
CuCl ₂ x 2H ₂ O	0,04 g/L
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ x 4H ₂ O	0,07g/L
NiCl ₂ x 6H ₂ O	1g/L
Na ₂ SeO ₃ x 5H ₂ O	0,16g/l
HCl 37%	2mL/L
Composition of the vitamins solution	
Pyridoxine HCl	1g/L
Nicotinic acid	0,5g/L
Riboflavin	0,25g/L
Thiamin HCl	0,25g/L
Biotin	0,2g/L
Folic acid	0,2g/L
Cobalamin	0,01g/L

Figure S. 1: Chemical composition of the macronutrients, micronutrients and vitamins solutions.

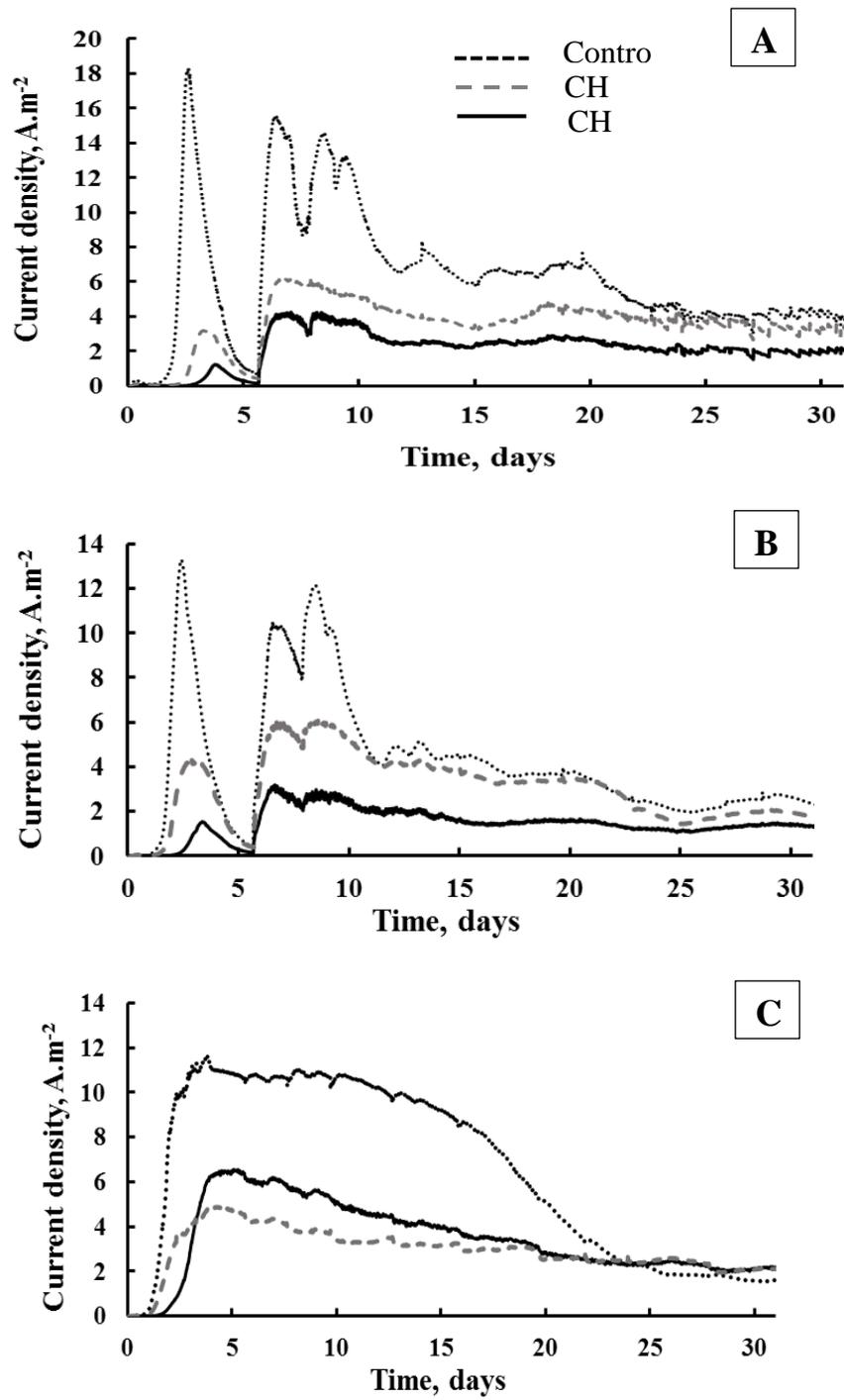


Figure S. 2 : Other results of experiments of 31 days

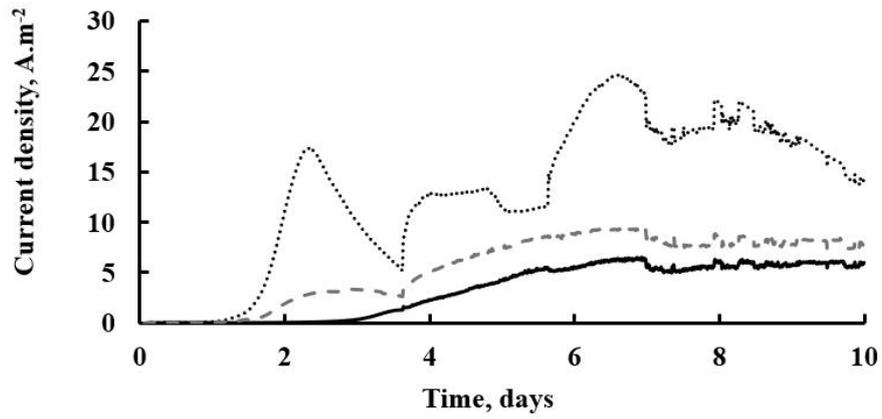
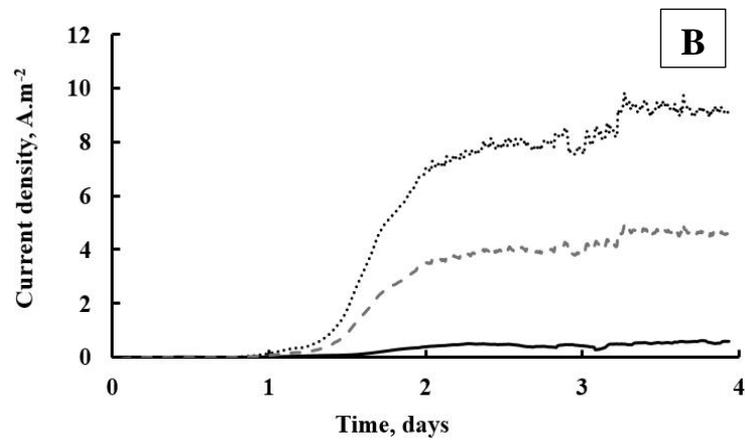
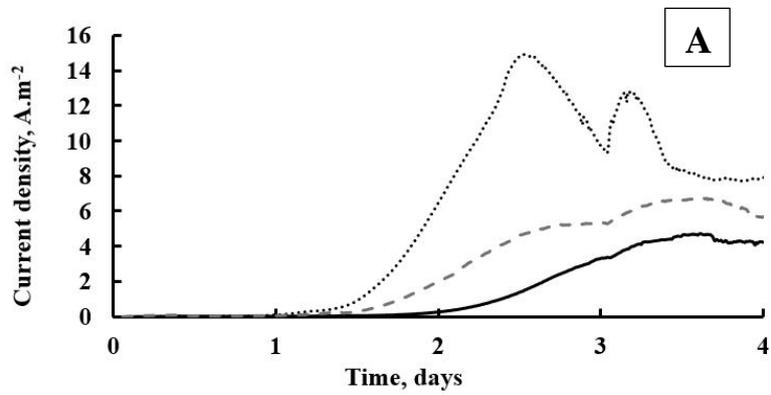


Figure S. 3 : Others results of experiments of 10 days



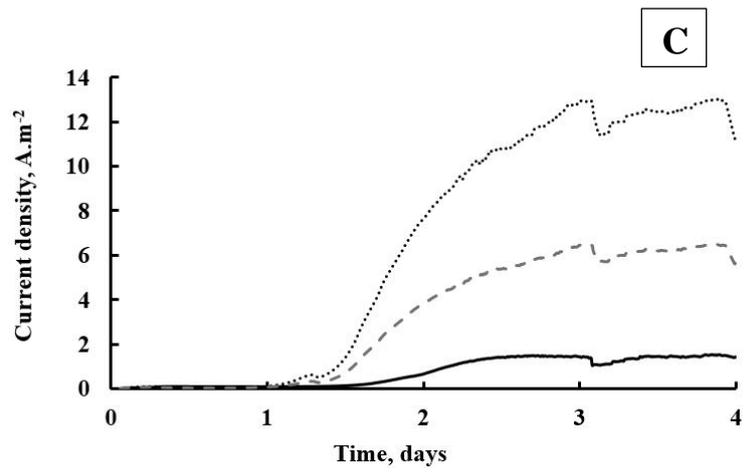


Figure S. 4 : Others results of experiments of 4 days

ANNEXE 2 : « Supplementary Data » de l'article *Is microbial electrotaxis an osmotaxis ?*

Composition of the macronutrients solution	
NH ₄ Cl	28g/L
MgSO ₄ x 7H ₂ O	10g/L
CaCl ₂ x 2H ₂ O	0,57g/L
Composition of the micronutrients solution	
FeCl ₂ x 4H ₂ O	2g/L
CoCl ₂ x 6H ₂ O	1g/L
MnCl ₂ x 4H ₂ O	0,5g/L
ZnCl ₂ x 2H ₂ O	0,05g/L
H ₃ BO ₃	0,05g/L
CuCl ₂ x 2H ₂ O	0,04 g/L
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ x 4H ₂ O	0,07g/L
NiCl ₂ x 6H ₂ O	1g/L
Na ₂ SeO ₃ x 5H ₂ O	0,16g/l
HCl 37%	2mL/L
Composition of the vitamins solution	
Pyridoxine HCl	1g/L
Nicotinic acid	0,5g/L
Riboflavin	0,25g/L
Thiamin HCl	0,25g/L
Biotin	0,2g/L
Folic acid	0,2g/L
Cobalamin	0,01g/L

Table S. 1: Chemical composition of the macronutrients, micronutrients and vitamins solutions.

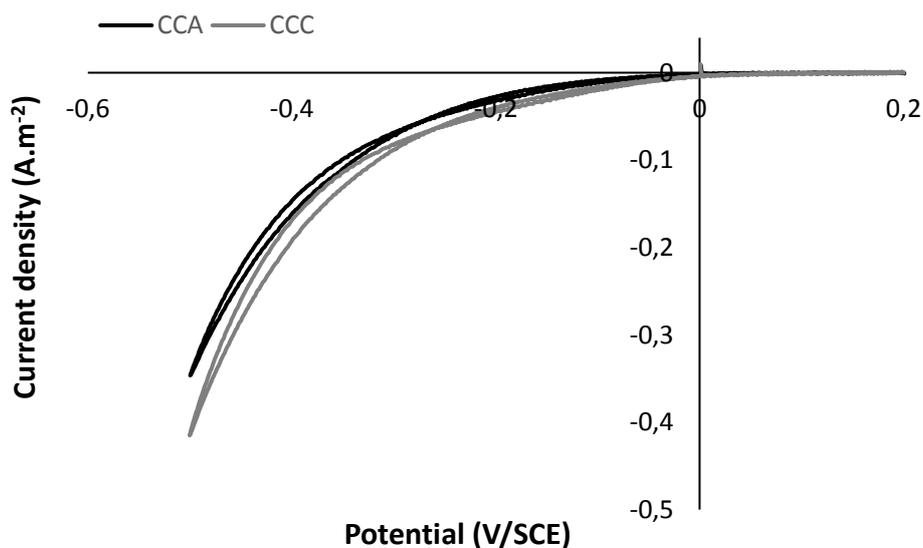


Figure S. 5 : Cyclic voltammeteries recorded at the end of the step 1 on the two carbon cloth electrodes.

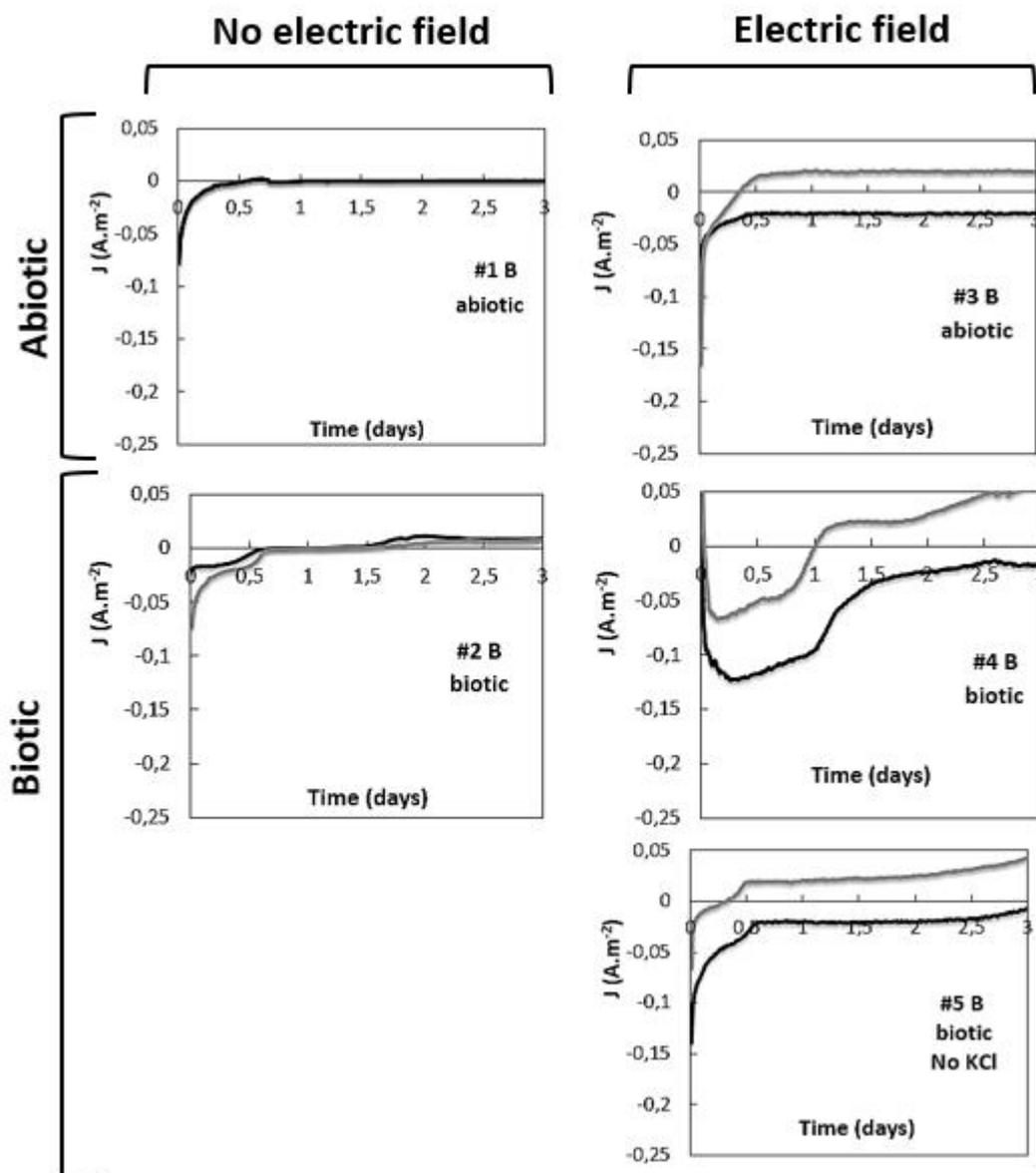


Figure S. 6 : First three days of chronoamperometry (-0.20 V/SCE) of the carbon cloth electrode, which was closer to the anode (CCA, black), and that closer to the cathode (CCC, grey) during exposure to the inoculum, according to the different experimental conditions recalled in Table 1.

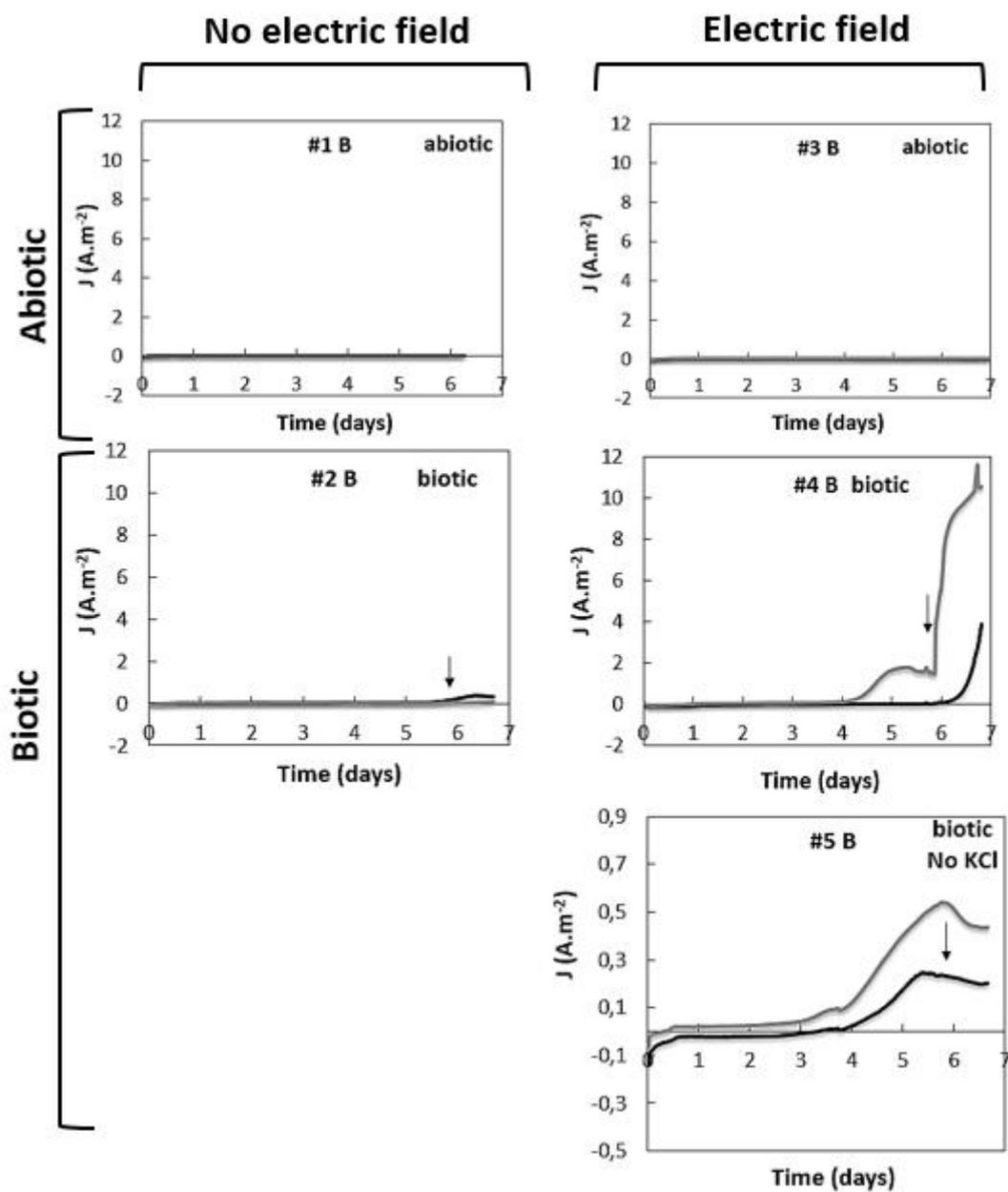


Figure S. 7 : 7-day chronoamperometry (-0.20 V/SCE) of the carbon cloth electrode, which was closer to the anode (CCA, black), and that closer to the cathode (CCC, grey) according to the different experimental conditions recalled in Table 1.